

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

ANALISIS CITOMETRICO DE PARAMETROS BIOQUIMICOS EN NUCLEOS DE CELULAS TUMORALES: VALOR PRONOSTICO DEL CONTENIDO EN DNA, PROTEINAS TOTALES Y ANTIGENO PCNA EN CARCINOMAS LARINGEOS.

Tesis Doctoral presentada por:

José Manuel Pelayo de Tomas

para optar al Grado de Doctor en Medicina

Directores:

Prof. Dr. José Enrique O'Connor Blasco
Prof. Dr. Rafael Barona de Guzmán
Prof. Dr. Alfredo Carrato Mena

Valencia, Junio de 1994



R. 51.183

UMI Number: U607470

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607470

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

BID.T 4259

FACULTAD MEDICINA

DEPARTAMENTO BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

Autor JOSE MANUEL PELAYO DE TOMAS

Título completo de la tesis

ANALISIS CITOMETRICO DE PARAMETROS BIOQUIMICOS
EN NUCLEOS DE CELULAS TUMORALES: VALOR PRONOSTICO
DEL CONTENIDO EN DNA, PROTEINAS TOTALES Y ANTIGENO
PCNA EN CARCINOMAS LARINGEOS.

Calificación APTO " CUM LAUDE " POR UNANIMIDAD

Fecha de lectura 23 DE SEPTIEMBRE DE 1994

Tribunal (Nombre y apellidos de los componentes)

Prof. Dr. JOSE CABO SOLER

Prof. Dra. EULALIA ALONSO IGLESIAS

Prof. Dr. ROBERT CALLAGHAN PITLIK

Prof. Dra. ANA ALONSO VARONA

Prof. Dr. ADOLFO CAMPOS FERRER

Director de la tesis

Prof. Dr. JOSE ENRIQUE O'CONNOR BLASCO

Prof. Dr. ALFREDO CARRATO MENA

Prof. Dr. RAFAEL BARONA DE GUZMAN

Dirección particular y teléf. del autor.

C/ Músico Ginés nº 31 puerta 38 (Valencia)

Tf. 3553600/3604002

D. José Enrique O'Connor Blasco, Doctor en Farmacia, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Valencia.

CERTIFICA:

Que el trabajo que presenta José Manuel Pelayo de Tomas para optar al grado de Doctor en Medicina y que lleva por título "**Análisis citométrico de parámetros bioquímicos en núcleos de células tumorales: Valor pronóstico del contenido en DNA, proteínas totales y antígeno PCNA en carcinomas laríngeos**", ha sido realizado bajo su dirección y reúne los requisitos necesarios para ser presentado y leído ante el tribunal competente.

Valencia, Junio de 1994.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'José Enrique O'Connor Blasco', written in a cursive style.

Fdo.: Prof. Dr. José Enrique O'Connor Blasco

D. Alfredo Carrato Mena, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Universidad de Alicante.

CERTIFICA:

Que el trabajo que presenta José Manuel Pelayo de Tomas para optar al grado de Doctor en Medicina y que lleva por título "**Análisis citométrico de parámetros bioquímicos en núcleos de células tumorales: Valor pronóstico del contenido en DNA, proteínas totales y antígeno PCNA en carcinomas laríngeos**", ha sido realizado bajo su dirección y reúne los requisitos necesarios para ser presentado y leído ante el tribunal competente.

Alicante, Junio de 1994.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'A Carrato', with a long horizontal line extending to the right from the end of the signature.

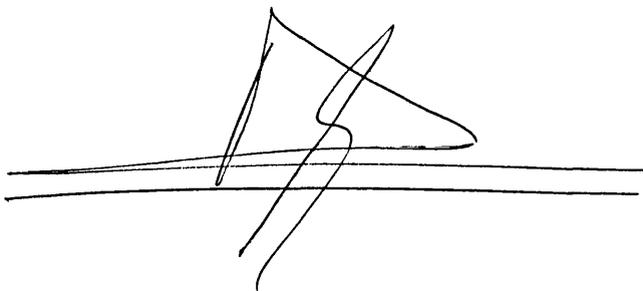
Fdo.: Prof. Dr. Alfredo Carrato Mena

D. Rafael Barona de Guzmán, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor Asociado Médico del Departamento de Cirugía de la Universidad de Valencia.

CERTIFICA:

Que el trabajo que presenta José Manuel Pelayo de Tomas para optar al grado de Doctor en Medicina y que lleva por título "**Análisis citométrico de parámetros bioquímicos en núcleos de células tumorales: Valor pronóstico del contenido en DNA, proteínas totales y antígeno PCNA en carcinomas laríngeos**", ha sido realizado bajo su dirección y reúne los requisitos necesarios para ser presentado y leído ante el tribunal competente.

Valencia, Junio de 1994.

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke at the bottom, positioned above two parallel horizontal lines.

Fdo.: Prof. Dr. Rafael Barona de Guzmán

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido subvencionado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (Ref. 92/0519) incluido dentro del proyecto: "Valor pronóstico del análisis multiparamétrico por Citometría de Flujo en el carcinoma de cabeza y cuello".

Al Prof. Dr. Rafael Barona de Guzmán, por su optimismo ante las adversidades. Por su dirección en el presente trabajo y su trato personal, me sentiré siempre afortunado.

Al Prof. Dr. Alfredo Carrato Mena, cuyo método de trabajo y seriedad me han sido de inestimable ayuda. Su inconformismo y el intento continuo de mejorar los resultados obtenidos me ayudaron a ir un poco más lejos cada vez.

Al Prof. Dr. José Enrique O'Connor Blasco, sus enseñanzas y consejos fueron fundamentales. La ilusión y constancia que mantiene por su trabajo y su entrega a las personas que le rodean fueron para mí el mejor ejemplo a seguir. Ha sido mi maestro.

A las Dras. Gloria Juan y Rosa Guasch, por haber sido unas magníficas compañeras. De ellas recibí muchos de mis conocimientos y un gran apoyo en los momentos buenos y malos.

A Simone, compañera de trabajo inseparable durante varios meses. Las horas delante del citómetro con ilusiones y desesperanzas fueron nuestras mejores aliadas.

Al Dr. José M. Barón, por su trabajo y colaboración desinteresada.

A las Dras. Dña. Albina Orduña y Ana Teruel, por su impecable realización de las técnicas inmunohistoquímicas.

Al Dr. D. Francisco Javier García, agradezco su compañerismo y ayuda cuando lo necesité.

A Carmen Rufete, por su amistad y excelente trabajo realizado en la preparación de las muestras.

A D. José Javier Sánchez, por el estudio estadístico del presente trabajo, por sus orientaciones y conocimientos.

A Izasa-Coulter, por proporcionarnos el soporte instrumental científico, sin el cual este trabajo probablemente no se hubiese llevado a cabo.

A mis familiares y amigos, que siempre permanecieron a mi lado.

A Blanca.

INDICE

INDICE

INTRODUCCION.

1. Bioquímica de la célula tumoral y pronóstico oncológico.....	1-4
2. Parámetros bioquímicos nucleares: DNA y proteínas.....	4-8
3. El ciclo celular.....	8-13
4. Citometría de flujo.....	14-17
5. Aplicaciones de la citometría de flujo en Oncología.....	18
6. Reactivos y marcadores fluorescentes.....	19-22
7. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo.....	22-25
8. Cáncer de laringe.....	26-31

OBJETIVOS.....	32
-----------------------	-----------

MATERIAL Y METODOS.

1. Material biológico.....	33
2. Instrumentación.....	33
3. Reactivos.....	33-34
4. Obtención de suspensiones nucleares.....	34-36
5. Determinación de los niveles de antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA).....	36-39
6. Citometría de flujo.....	40
7. Análisis de los datos.....	40-48
8. Estudio clínico.....	49
9. Estudio histológico.....	49-51
10. Estudio estadístico.....	52-56

RESULTADOS

1. Análisis citométrico de parámetros bioquímicos nucleares.....	67-79
2. Correlación entre parámetros bioquímicos nucleares y parámetros histológicos tumorales.....	80
3. Correlación entre parámetros bioquímicos nucleares y parámetros clínicos tumorales.....	80
4. Asociación de parámetros clínico-histológicos con el índice de DNA: Distribución de parámetros histológicos en los tumores diploides y aneuploides.....	81-96
5. Valor de los parámetros bioquímicos nucleares, clínicos e histológicos en la predicción de la supervivencia.....	97-109
6. Papel pronóstico de parámetros bioquímicos nucleares: Análisis estadístico multivariante.....	110-111

DISCUSION

1. Situación del presente estudio en el contexto del análisis pronóstico de los tumores de cabeza y cuello.....	112-122
2. Parámetros bioquímicos en los núcleos tumorales.....	122-134
3. Valor pronóstico de los parámetros clínicos e histológicos.....	135

CONCLUSIONES	136 - 137
---------------------------	-----------

BIBLIOGRAFIA	138-154
---------------------------	---------

INTRODUCCION

1. LA BIOQUIMICA DE LA CELULA TUMORAL EN EL PRONOSTICO ONCOLOGICO.

El cáncer es una enfermedad en que las células escapan a los mecanismos de control de crecimiento necesarios para mantener la estructura y función normales de los tejidos y órganos. Esto conduce a una proliferación celular incontrolada e invasión de tejidos circundantes y, consiguientemente, a la diseminación a órganos distantes mediante metástasis.

Las células transformadas continúan creciendo cuando las células normales dejan de hacerlo. Esto se debe a numerosas razones: (Herrera, 1991)

- En cultivo, las células tumorales pierden la dependencia de un soporte para crecer y no requieren adherencia. Como consecuencia de su menor adhesión presentan una morfología más redondeada y pueden formar masas "caóticas", de varias capas.

- La inhibición del crecimiento por contacto célula-célula desaparece.

- Las células transformadas tienen menor necesidad de factores de crecimiento en el medio de cultivo, pueden crecer a concentraciones de suero muy bajas, y continúan creciendo aún cuando uno de los nutrientes esté por debajo de una concentración crítica.

- El transporte de glucosa está aumentado, presentando un flujo glucolítico muy activo.

- La capa de fibronectina que cubre las células quiescentes en monocapa no aparece en las células transformadas.

- A nivel del citoesqueleto, las células transformadas presentan una pérdida de los microfilamentos de actina.

- Las células transformadas segregan proteasas, que pueden facilitar la penetración sobre otras células y explicar la invasibilidad de las células transformadas y tumorales.

- También segregan específicamente factores de crecimiento implicados en la transformación (TGFs), que permiten el crecimiento de suspensión de células no transformadas.

El pronóstico, predicción de la duración, curso y desenlace de la enfermedad en el paciente individualizado es esencial en la práctica médica y particularmente para los pacientes afectados de procesos neoplásicos. Según Page (1991), los requisitos que deberían reunir los factores pronóstico son los siguientes:

- a) Su determinación (clínica, radiológica o en laboratorio) debe ser estandarizable y reproducible.
- b) Deben tener una buena capacidad de discriminación.
- c) Deben ser fiables al dividir en categorías a los enfermos.
- d) Tienen que poder ser aplicados a todos los subgrupos de pacientes.
- e) El análisis de estos factores no debería consumir tejido tumoral necesario para efectuar otras pruebas.

Parámetros diagnósticos como el estado general del paciente, la extensión de la enfermedad o el estudio cito-histológico específico se han usado clásicamente para evaluar el pronóstico de los enfermos de cáncer. Por otra parte, tras la consideración del cáncer como enfermedad genética de células somáticas se han diseñado nuevas técnicas de análisis celular, más rápidas, fiables y objetivas. De todo ello se han beneficiado oncólogos, biólogos celulares y todos los facultativos implicados en el estudio y tratamiento del cáncer.

En el diagnóstico y pronóstico de esta patología celular las características más importantes son aquellas relacionadas con el núcleo, ya que en éste se encuentra el material genético que regula todas las funciones celulares. Los cambios en el contenido en DNA, así como otros componentes nucleares, fundamentalmente proteínas, reflejan los cambios cromosómicos que juegan un papel clave en el desarrollo y progresión del tumor.

Así, Arnold y Hanseman (1879) propusieron que las alteraciones en el DNA podrían ser la causa de la iniciación y progresión del proceso neoplásico. Boveri (1914), más de 40 años antes del establecimiento del número cromosómico correcto en el hombre, especuló que las anomalías cromosómicas podrían tener una relación con la aparición de neoplasias.

A raíz de estos estudios aparece por primera vez la correlación entre aneuploidía, variación en la dotación cromosómica normal, y desarrollo anormal de células somáticas. La génesis tumoral es considerada como el resultado final de múltiples accidentes genéticos en células somáticas, resultando en definitiva en un crecimiento celular autónomo y metástasis.

En los tumores sólidos, la identificación de cambios cromosómicos específicos tumorales es más difícil que en las anomalías hematológicas. Sin embargo, el análisis citogenético de tumores sólidos ha sido de gran ayuda en la localización de genes que se asocian a carcinogénesis (Bishop, 1991; Cairns, 1981; Heim y Mitelman, 1987). La identificación y descripción de estos genes (protooncogenes, oncogenes, genes supresores) en el genoma humano y, en particular, sus alteraciones en tumores humanos proporcionan una prueba adicional de que el cáncer es una enfermedad genética.

Los **protooncogenes** son genes celulares normales involucrados en el control positivo del crecimiento o desarrollo tumoral. En general, los cambios que activan los protooncogenes para llegar a ser verdaderos **oncogenes**, resultan del incremento irregular de una proteína o producto génico o la expresión no programada de la proteína o de mutaciones o deleciones en los dominios de regulación de los genes. Los **genes supresores** actúan de modo inverso, de manera que su expresión normal impide la aparición y crecimiento tumoral.

Los estudios iniciados por Caspersson (1950) y continuados por Leuchtenberger y Atkin (1952 y 1954) asociaron, por primera vez, la alteración en el contenido del DNA con la malignidad. Posteriormente, Zetterberg y Atkin (1980 y 1956), postularon la relación entre el contenido en DNA nuclear y el grado de diseminación y diferenciación del tumor, patente en el curso clínico. Los tumores de bajo grado de malignidad serían euploides en su mayoría (diploides o tetraploides) y los de alto grado de malignidad, aneuploides.

Las aberraciones del DNA en células cancerosas pueden ser estudiadas a niveles diferentes de organización genómica:

1) La cantidad total de DNA en células cancerosas puede rápidamente ser

evaluada por cualquiera de las técnicas de citometría de flujo o citometría de imagen.

2) Cuando las células entran en fase mitótica del ciclo celular, el DNA organizado en cromosomas puede ser estudiado por diferentes estrategias citogenéticas.

3) El análisis genético molecular permite investigar las células tumorales a nivel de genes individuales, incluso a nivel de simples pares de bases.

Es evidente que la búsqueda y utilización de nuevos parámetros objetivables relacionados con la aparición y progresión tumoral constituye un reto permanente encaminado a mejorar la prevención en la aparición de enfermedad y su evolución. Dentro de las modernas metodologías de estudio del cáncer, la citometría de flujo es una técnica de gran interés en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la enfermedad neoplásica. Por sus características, permite el análisis simultáneo de varios parámetros de la célula individual y, al mismo tiempo, la identificación de subpoblaciones celulares. Su amplio campo así como la capacidad de diversificación y utilidades permite avanzar en el análisis de la enfermedad neoplásica.

2. PARAMETROS BIOQUIMICOS NUCLEARES: DNA Y PROTEINAS.

El DNA es el principal componente genético de la célula y el que transmite la información codificada de una célula a la otra y de un organismo a otro. El DNA no se halla libre sino formando un complejo, la llamada cromatina.

2.1. La cromatina.

La cromatina puede aislarse separando los núcleos y tratándolos con soluciones hipotónicas. En estas condiciones aparece como una suspensión gelatinosa que contiene DNA, RNA, proteínas básicas (histonas) y proteínas ácidas (no histonas).

El DNA de todos los organismos se encuentra íntimamente asociado a

una amplia variedad de distintas proteínas que se unen al mismo. Estas proteínas actúan como enzimas o como proteínas estructurales, organizando el DNA dentro del núcleo celular. Tradicionalmente, las proteínas que se unen al DNA se han clasificado en dos grupos:

- a) Histonas, clase bien definida de proteínas estructurales (H1, H2A, H2B, H3, H4).
- b) No histonas, término colectivo que abarca a cientos o miles de proteínas diferentes con funciones muy diversas (RNA polimerasas, DNA polimerasas, proteínas reguladoras, etc.).

2.2. Histonas.

Son proteínas relativamente pequeñas con una proporción muy elevada de lisina y arginina, cuya carga positiva las ayuda a unirse fuertemente al DNA, independientemente de su secuencia de nucleótidos. Es probable que permanezcan unidas al DNA en todo momento y, por ello, es posible que desempeñen un importante papel en muchas de las reacciones que afecten al genoma.

Existen cinco tipos de histonas que se dividen en dos grupos principales. El primer grupo comprende las histonas nucleosómicas: H2A, H2B, H3, H4, semejantes en diversas especies y que se encuentran entre las proteínas más conservadas que se conocen. El segundo grupo está constituido por las histonas H1 de las que en cada célula existen diversas variedades, diferentes pero estrechamente relacionadas. (Alberts, 1990).

2.3. El nucleosoma como unidad de empaquetamiento del DNA.

La asociación de las histonas con el DNA conduce a la formación de los nucleosomas, las partículas unitarias de la cromatina. El nucleosoma confiere a la cromatina su aspecto al microscopio electrónico de "cuentas ensartadas" (de unos 11 nm de diámetro). Esta disposición, sin embargo, no representa la verdadera estructura sino un artificio como resultado de la pérdida de la histona H1.

La existencia del nucleosoma se demuestra por estudios bioquímicos. Por digestión enzimática con nucleasas se puede separar el nucleosoma de la larga cadena de DNA; se degrada el DNA situado entre las cuentas nucleosómicas apareciendo éstas como partículas discooidales. Cada cuenta nucleosómica posee dos copias de cada una de las 4 histonas nucleosómicas altamente conservadas: H2A, H2B, H3, H4. Estas moléculas forman un núcleo proteico alrededor del cual se enrolla el fragmento de DNA de doble hebra. En la cromatina no digerida, el DNA se extiende como un hilo desde un nucleosoma al siguiente. Esta región entre cuentas recibe el nombre de DNA espaciador. El DNA espaciador junto con la cuenta nucleosómica constituye el nucleosoma completo. (Alberts, 1990; Robertis De, 1972).

2.4. Estructuras de empaquetamiento de orden superior al nucleosoma.

Los nucleosomas están empaquetados entre sí generando estructuras regulares en las que el DNA está muy condensado. La forma básica de empaquetamiento de la cromatina suele recibir el nombre de fibra cromatínica de 30 nm. Las moléculas proteicas de histona H1 son las responsables de los empaquetamientos de los nucleosomas en la fibra de 30 nm. Cada molécula de H1 tiene una región central globular y dos brazos extendidos, correspondientes a las regiones amino- y carboxi-terminal, respectivamente.

La porción globular se une a un único punto en cada nucleosoma, y se cree que los brazos se extienden cubriendo al DNA espaciador cerca del punto en que éste se une a la cuenta nucleosómica, entrando también en contacto con los núcleos de histonas de los nucleosomas adyacentes. De esta manera, las H1 inducen a los nucleosomas a adoptar una disposición regular repetida.

La cromatina parece estar empaquetada en grandes unidades, las cuales pueden cambiar de estructura por descondensación cuando los genes contenidos en ellas son activados.

2.5. Proteínas no histónicas.

La transcripción y replicación del DNA, así como el mantenimiento de un estado dinámico de la cromatina durante el ciclo celular, diferenciación celular, reparación del DNA, etc, requiere la presencia de innumerables proteínas. El interés en el estudio de estas proteínas va en aumento, debido a que entre ellas se incluyen factores reguladores de la mayoría de las funciones esenciales de la célula.

La mayoría de estas proteínas no histónicas se hallan en cantidades muy reducidas, siendo muy difícil su aislamiento en cantidad suficiente para su estudio. Pese a ello, se han detectado cerca de 1500 proteínas distintas (Rabilloud et al., 1991). En la aplicación de los métodos de aislamiento nuclear, imprescindible para el estudio de estas proteínas, muchas de ellas se pierden. Por lo tanto, en la práctica, el término proteínas no histónicas define las proteínas que permanecen asociadas con la cromatina siguiendo al aislamiento nuclear (Van Holde, 1989; Johns, 1982; Denhardt et al., 1986).

Hasta no hace mucho tiempo, el criterio predominante era que, a excepción de la histonas, los índices de síntesis de proteínas específicas permanecían invariables durante el ciclo celular (Milcarek y Zhan, 1978; Elliot y McLoughlin, 1978). Sin embargo, numerosas publicaciones describen recientemente la existencia de cambios en los índices de transcripción de genes, variaciones en la traducción y estabilidad de mRNAs y alteraciones en la expresión de los productos génicos en relación con la progresión a través del ciclo celular (Darzymkiewicz, 1990).

Las proteínas cuya concentración varía durante el ciclo celular pueden dividirse en dos categorías:

- a) Proteínas que tienen una función reguladora del ciclo celular. Entre ellas productos de oncogenes o de anti-oncogenes, que funcionan como receptores de factores de crecimiento o segundos mensajeros, como proteína quinasas, etc...
- b) Proteínas o péptidos componentes de la maquinaria de la replicación celular o que están directamente relacionadas con la proliferación pero cuya función

no es, aparentemente, reguladora. Como ejemplos de este grupo, se incluyen enzimas y proteínas auxiliares de la replicación del DNA, núcleos de histonas de nucleosomas, proteínas asociadas a microtúbulos y otras proteínas estructurales.

2.6. Significado del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA).

Originariamente descrito por Tan et al., (1987) y descrito como "ciclina" por Celis et al., (1984), se trata de una proteína bien caracterizada de 36KD, identificada como una proteína auxiliar de la DNA polimerasa- δ . El gen responsable de su síntesis se localiza en el brazo corto del cromosoma 20 (Lopez et al., 1991; Tan et al., 1987; Prelich G. et al., 1987). El PCNA forma parte compleja de la replicación estando involucrado en la síntesis y reparación del DNA (Nishida et al., 1988).

La expresión del PCNA se incrementa en las células en ciclo, alcanzándose sus niveles máximos durante la fase S y observándose niveles mínimos durante la fase G1, con niveles intermedios durante las fases G2 y M (Landberg y Roos, 1991; Oyama et al., 1993; Yamanaka et al., 1993).

A diferencia de otros antígenos nucleares, como el Ki-67, el PCNA mantiene su antigenicidad en tejidos parafinados (García et al., 1989), aunque estudios detallados han indicado posibles alteraciones durante la fijación o el procesamiento tisular por la técnica de Hedley et al., (1983).

3. EL CICLO CELULAR.

3.1. Concepto fundamental.

El ciclo celular representa la integridad del periodo de división, es decir, el conjunto de acontecimientos bioquímicos y morfológicos responsables de la proliferación celular. Se ha dividido clásicamente en cuatro fases: G1, S, G2 (interfase) y M (mitosis más citodiéresis), en las que se producen fenómenos muy diferentes:

G1: Preparación de las células para la replicación del DNA.

S: Replicación del material genético.

G2: Preparación de las células para la mitosis.

M: División celular.

Cada fase se caracteriza por el desarrollo de un cierto número de procesos bioquímicos (Hochhauser et al., 1981). Antes de dividirse, una célula debe duplicar su masa, para que así las células hijas contengan los componentes que necesitan para iniciar su propio ciclo de crecimiento celular. Aparte de algunas excepciones actualmente conocidas (DNA, histonas y otras proteínas o enzimas nucleares implicados en la replicación del DNA), su síntesis tiene lugar continuamente, con unas tasas variables durante la interfase.

La principal diferencia entre las células que se dividen rápidamente y las que se dividen con lentitud depende de la duración del período G1. En cambio, el tiempo necesario para que una célula pase desde el inicio de la fase S hasta el final de la M es constante (Prescott, 1968). El punto de restricción o de no retorno se localiza hacia el final de G1. La duración de cada una de las fases S, G2 y M es relativamente constante. De hecho, la proporción de células en las fases S+G2+M es a menudo considerada como representativa del potencial proliferativo de esta población.

3.2. Ciclo de crecimiento y ciclo de replicación del DNA.

En condiciones fisiológicas, la mitosis constituye el estado final en la proliferación celular. Para acceder a esta fase, la célula ha de cumplir dos requisitos:

- Duplicar su masa, es decir, la cantidad de sus constituyentes.
- Asegurar fielmente la replicación de su material genético.

En el plano molecular, dos tipos de actividades metabólicas caracterizan el ciclo celular. Una de ellas, asegura la regulación del

crecimiento, a través de la síntesis de proteínas y otros componentes celulares. La segunda, es la que controla específicamente la replicación del DNA (síntesis de DNA). Estas actividades paralelas representan dos series de acontecimientos secuenciales en la vida de la célula: el ciclo de crecimiento y el ciclo de replicación del DNA o ciclo nuclear. Ambas convergen para dar lugar a la mitosis (Ronot et al., 1988).

El crecimiento y la replicación del DNA, íntimamente ligados, pueden implicar, sin embargo, mecanismos distintos de regulación. El equilibrio o crecimiento coordinado implica la sincronización de dos ciclos y la perturbación de uno de ellos, con progresión del crecimiento en ausencia de síntesis de DNA o viceversa, se traduce en el desequilibrio.

3.3. Compartimentación metabólica del ciclo celular.

La subdivisión tradicional del ciclo, basada en las variaciones del contenido en DNA por célula es excesivamente restrictiva. En efecto, la presencia de células temporalmente fuera del ciclo, la transición desde tal "quiescencia" hacia el ciclo, así como la velocidad y la heterogeneidad en la progresión a través del ciclo, no pueden ser detectadas por el análisis clásico del ciclo celular que interesa sólo el contenido en DNA. El análisis multiparamétrico del ciclo celular, basado en la medida simultánea de los contenidos de DNA y RNA (Traganos et al., 1977), de DNA y proteínas (Crissman y Steinkamp, 1982) o de DNA y otras moléculas intermediarias (Lacombe et al., 1986; Lacombe et al., 1987; Shaw et al., 1986), ha definido una clasificación más compleja de las células, que permite revelar diferentes estados funcionales en relación con el potencial de crecimiento de una población celular.

A) PROLIFERACION: las células se encuentran en multiplicación activa, atravesando las fases G1, S, G2 y M de forma sucesiva y continua, pero generalmente asincrónica.

El análisis multiparamétrico ha permitido diferenciar subcompartimentos en algunas de estas fases.

La fase G1 se descompone en dos subfases:

G1-A : también llamada G1pm, reagrupa la mayoría de células postmitóticas, en las que el contenido en RNA y en proteínas es inferior a los de las células al principio de la fase S. En este compartimento, determinado por el ciclo de replicación del DNA, se acumulan metabolitos hasta alcanzar una concentración umbral. La duración de G1-A es inversamente proporcional a la cantidad de los constituyentes heredados de la mitosis.

G1-B : denominada también G1ps, contiene las células aptas, al menos por su contenido en RNA y proteínas, para acceder a la fase S. Constituye una fase de preparación para la síntesis de DNA (Darzynkiewicz, 1984; Fantes, 1985).

Fase S: garantiza la replicación del DNA, siendo necesario un contenido mínimo en RNA y proteínas para poder entrar en esta fase (Baserga, 1984).

Fase G2: se caracteriza por un aumento del contenido en RNA y en proteínas y por la iniciación de las modificaciones en la conformación de la cromatina, anteriores a la mitosis. El contenido en proteínas nucleares permite una distinción en las células localizadas al comienzo (G2-A) o al final de G2 (G2-B).

Fase M: comprende la profase, la metafase, la anafase, la telofase y la citodiéresis. Las células hijas, salidas de la mitosis tienen diferentes contenidos en RNA y en proteínas, fenómeno relacionado con la heterogeneidad celular (De Robertis et al., 1972).

B) QUIESCENCIA: Representa la fase en la que las células salen temporalmente del ciclo, hasta que de nuevo se estimule su regreso al mismo. Ha sido observada principalmente en G1, pero no es específica de esta fase. Así, se definen las siguientes fases de quiescencia, en función del contenido en DNA de las células fuera del ciclo:

Fase G1-Q: representa las células que poseen un contenido 2C de DNA y una actividad metabólica mínima. El contenido en RNA y en proteínas es reducido y la cromatina está fuertemente condensada.

Fase SQ: está caracterizada por las células con un contenido en DNA comprendido entre 2C y 4C y un reducido contenido en RNA.

Fase G2-Q: corresponde a las células quiescentes con un contenido 4C de DNA.

C) TRANSICION: constituye un estado intermedio, de paso entre la quiescencia y la proliferación. Se define por las fases G1-T (DNA = 2C), (DNA entre 2 y 4C) y G2-T (DNA = 4C), siguiendo la relación con la fase concreta del ciclo.

D) DIFERENCIACION: correspondiente a la fase G1-D, que reagrupa las células que han abandonado definitivamente el ciclo celular con un contenido 2C de DNA. **(Figura 1)**.

EL CICLO CELULAR

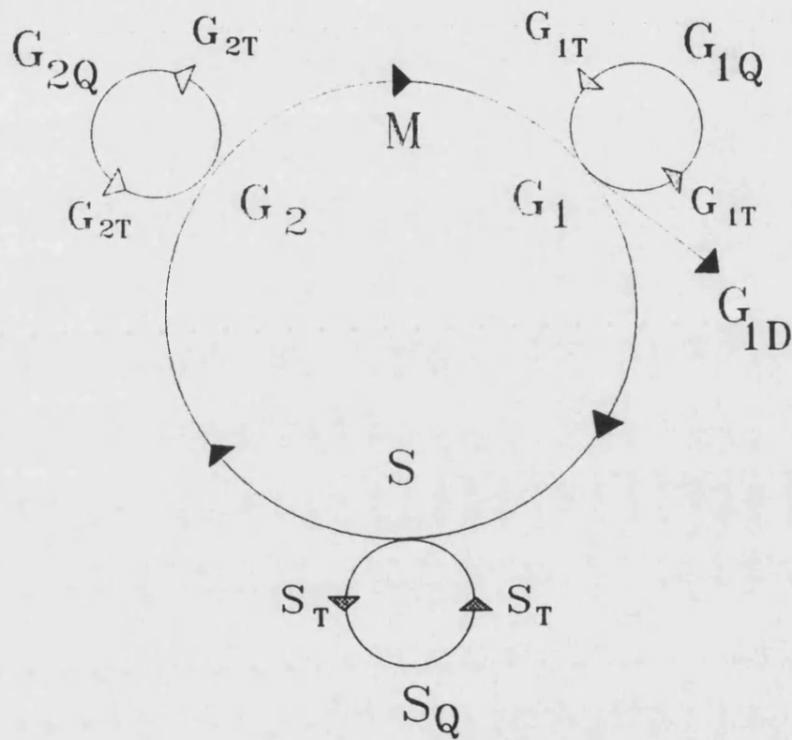


Figura 1. El ciclo celular.

4. CITOMETRIA DE FLUJO.

4.1. Introducción.

Según la definición de Howard Shapiro (1988): "La citometría de flujo es un proceso en el cual células aisladas u otras partículas biológicas pasan, de una en una en el interior de una corriente líquida, a través de un sensor, el cual mide sus características físicas o químicas".

El análisis se lleva a cabo mediante el paso de células a través de una cámara de análisis donde incide la luz de un láser. La interacción de la célula con el láser provoca una serie de dispersiones de luz que, recogidas por lentes situadas frontal y perpendicularmente al haz del láser, generan información sobre el tamaño celular y la consistencia del citoplasma. La medida de la cantidad de un determinado componente celular, se realiza a través de la excitación de fluorocromos naturales o incorporados a la célula, específicos para el parámetro biológico a valorar.

4.2. Características principales de la citometría de flujo.

La citometría de flujo es una técnica diseñada para el análisis de una o más propiedades de células o partículas biológicas en suspensión, de forma secuencial en el tiempo. Los resultados se presentan en forma de histogramas de distribución de la población celular con respecto a los parámetros individuales.

El interés en las aplicaciones de la citometría de flujo, deriva de la utilidad de los instrumentos para la definición y cuantificación de la heterogeneidad en poblaciones celulares, que aparecen como homogéneas al utilizar otros métodos de análisis.

4.3. El análisis por citometría de flujo.

Los aspectos básicos del proceso de medición mediante citometría de flujo, de un parámetro biológico, cuantificado por la emisión de fluorescencia natural o incorporada, se resumen en la **Figura 2**.

La incorporación por la célula de marcadores fluorescentes, específicos para el parámetro a analizar, se realiza fuera del citómetro. El proceso continúa en el instrumento, como análisis de la emisión de fluorescencia provocada por la excitación de los fluorocromos por el láser, debiendo establecerse las condiciones óptimas para asegurar que la emisión de fluorescencia sea proporcional a la concentración del componente celular analizado.

4.4. Estructura y fundamento de un citómetro de flujo.

En un citómetro de flujo típico se pueden distinguir los siguientes componentes principales:

- Sistema de flujo.
- Fuente de excitación.
- Sistema óptico de detección de fluorescencia y dispersión de luz.
- Sistema de digitalización y construcción de histogramas de distribución.

De forma esquemática, en un citómetro de flujo las partículas en suspensión son sometidas a una presión que las inyecta, a través de la cámara de flujo, en el centro de una vena líquida capilar, de modo que son conducidas, una a una, al punto donde se realiza el análisis. La interacción de las células con el láser provoca, por un lado, la dispersión de parte de la luz, que es recogida por lentes situadas enfrente y a 90^a del haz, y por otro, la emisión de fluorescencia debida a la excitación de fluorocromos naturales o incorporados a la célula. Esta emisión es recogida por un conjunto de lentes situado perpendicularmente al haz de luz (**Figura 3**). La luz emitida por cada partícula, recogida por las lentes se transforma, mediante fotomultiplicadores, en una señal individual de voltaje, amplificada de forma proporcional a la intensidad lumínica y al valor del parámetro biológico que se está analizando. Para cuantificar específicamente dicha fluorescencia es necesario separar la luz de excitación producida por los fluorocromos presentes en la célula y discriminar entre las distintas emisiones de los fluorocromos a través de un sistema de filtros o banco óptico.

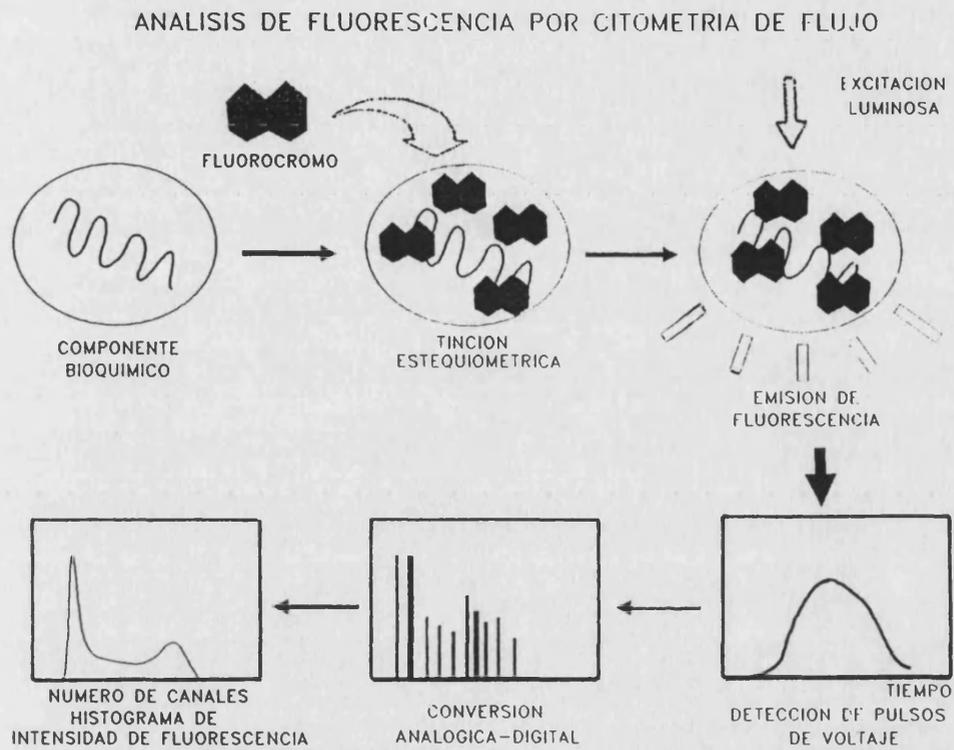


Figura 2. El análisis por citometría de flujo.

ESQUEMA GENERAL DE UN CITOMETRO DE FLUJO

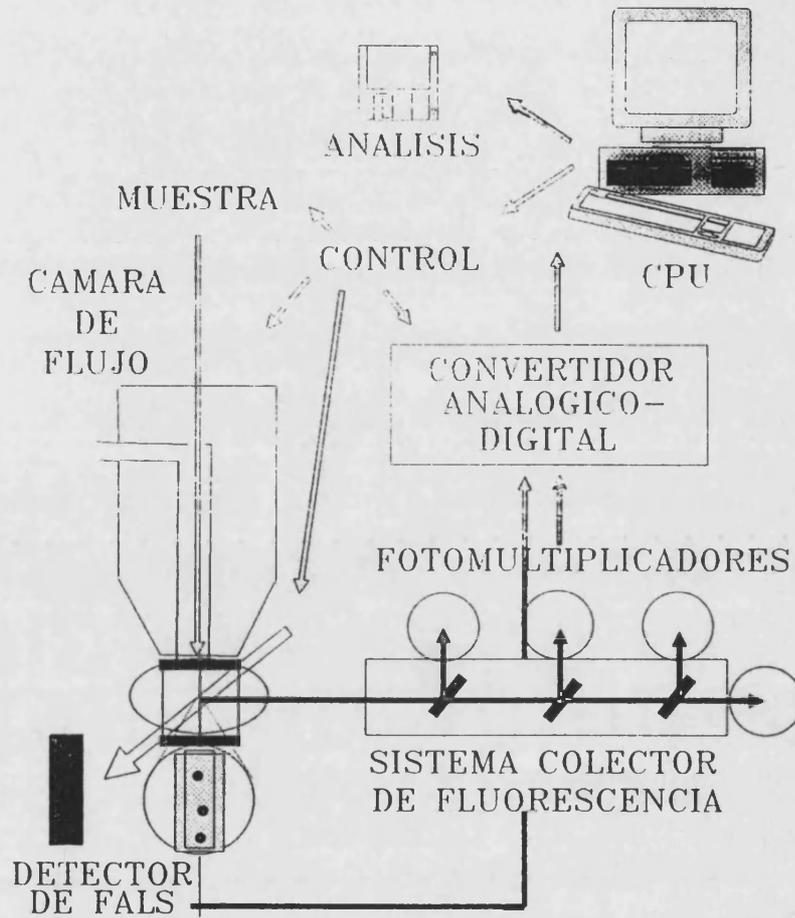


Figura 3. Sistema de flujo de un citómetro tradicional.

5. APLICACIONES DE LA CITOMETRIA DE FLUJO EN ONCOLOGIA.

Es prácticamente imposible mencionar todas las aplicaciones de la citometría de flujo. La citometría de flujo es un método adaptado al análisis de la mayoría de orgánulos celulares, dentro de la Biología Celular y su uso se ha ampliado en otros campos tales como la Biología Molecular, Bioquímica y Biotecnología.

La detección de células patológicas es la aplicación más desarrollada de la citometría de flujo. Una de las características más relevantes de las células neoplásicas es la alteración del contenido en DNA, respecto a la células normales. La posibilidad de determinar el contenido del DNA celular ha proporcionado un gran avance en el diagnóstico y pronóstico en un gran número de carcinomas humanos.

El análisis histopatológico y clínico no es siempre determinante del pronóstico de la enfermedad. En este sentido, la medida de contenido de DNA, es de gran ayuda en el estudio del diagnóstico y previsión del pronóstico, específicamente en aquellos casos de malignidad dudosa. Así, la citometría de flujo juega un papel muy importante en el estudio de la cinética tumoral y en la determinación de la ploidía en un gran número de tumores de diversa procedencia histológica.

Actualmente, la mayoría de estudios son aún de tipo monoparamétrico, en general retrospectivos, con material de archivo. Sin embargo, se debe tender a la realización de estudios multiparamétricos: análisis de la cantidad de DNA, medición del contenido nuclear en proteínas, proliferación celular, expresión de antígenos de proliferación, oncoproteínas, etc..., con el fin de correlacionar tales parámetros con variables clínicas, cito-histológicas, evolutivas, etc..., y así definir exhaustivamente el diagnóstico y pronóstico de determinadas neoplasias (Atkin y Richards, 1956; Barlogie, 1984; Mamo et al., 1986; Barlogie et al., 1982).

6. REACTIVOS Y MARCADORES FLUORESCENTES.

6.1. Introducción.

Los marcadores fluorescentes proporcionan un método sensible para obtener información acerca de la estructura y función celulares. La detección de la fluorescencia específica es la base del poder y versatilidad de la citometría de flujo y las sondas fluorescentes proporcionan la capacidad de clasificar células, determinando el contenido en componentes moleculares y analizando sus propiedades fisiológicas.

Las razones fundamentales de la utilidad de la fluorescencia en citometría de flujo son:

- a) Los marcadores fluorescentes poseen diferente grado de reactividad o de afinidad estructural hacia componentes celulares o presentan propiedades sensibles a su microentorno molecular.
- b) Sondas fluorescentes que emiten a diferente longitud de onda pueden ser usadas simultáneamente para el análisis multiparamétrico de cada célula.
- c) La emisión fluorescente de cada célula puede ser recogida en pocos microsegundos, a medida que las células pasan a través del haz de láser.

6.2. Análisis de los ácidos nucleicos con marcadores fluorescentes.

Los ácidos nucleicos, como otros componentes celulares, pueden ser estudiados "in situ" mediante citometría de flujo. El análisis de éstos se realiza mediante la tinción por fluorocromos específicos, que deben poseer ciertas características imprescindibles para ser utilizados: espectro de excitación compatible con la fuente luminosa, rendimiento cuántico suficiente, estabilidad de marcaje, y estequiometría de la tinción (Luyten et al., 1985; Ronot et al., 1986; Crissman et al., 1979; Taylor et al., 1980).

6.3. Fluorocromos marcadores de los ácidos nucleicos.

a) Fluorocromos de Feulgen: Los primeros fluorocromos utilizados en citometría de flujo fueron los colorantes de Feulgen, como la acriflavina y la auramina, que reaccionan con los grupos aldehído de las ribosas del ADN y ARN, formando las bases de Schiff. Estos colorantes son poco específicos y fueron sustituidos por fluorocromos intercalantes más fáciles de utilizar y con un mayor rendimiento gracias a su mayor especificidad.

b) Fluorocromos intercalantes: El bromuro de etidio (EB) y el yoduro de propidio (PI), derivados del fenantreno, se intercalan en los ácidos nucleicos de doble cadena. Son los más utilizados, en razón de su buen rendimiento cuántico, su amplio espectro de excitación y su buena absorción de la luz sintonizada a 488nm. Antes de teñir las células con estos fluorocromos, éstas han de ser permeabilizadas, mediante fijación, por choque hipotónico o por la acción de un detergente no iónico y, asimismo, se debe eliminar el RNA residual de doble cadena para estudiar el DNA.

El EB y el PI poseen dos bandas de excitación, una próxima al ultravioleta (300-380nm) y la otra a 480nm (luz azul), por fuentes de luz que emitan en estas longitudes de onda (laser de ión argón o kriptón y lámparas de gas frío). Cuando son excitados, estos fluorocromos emiten entre 590nm-620nm, siendo el pico máximo de emisión del PI a 620nm y a 605nm el del EB. Esta diferencia es aprovechada para realizar doble marcaje con isocianato de fluoresceína (FITC), que emite entre 500-600nm, teniendo su pico máximo en 550nm.

c) Fluorocromos específicos de los pares de bases A-T y C-G: Estos fluorocromos se fijan en el exterior de la doble hélice, unos en el par A-T, y otros en el par G-C. Su utilización es más limitada que la de los colorantes intercalantes, debido a que estos fluorocromos se excitan con laser ultravioleta. Por otra parte, su fijación es muy específica para el DNA, por lo que no se necesita tratamiento previo de eliminación del RNA (Hausser-Urfer, 1982; Kamiyana, 1968).

Los fluorocromos específicos de A-T más utilizados son el DAPI y el DIPI, derivados del fenil-indol y los colorantes de Hoechst, derivado del bis-benzimidazol. Los fluorocromos específicos de G-C son antibióticos fluorescentes, como la cromomicina o la mitramicina.

6.4. Estandarización de la tinción fluorescente de los ácidos nucleicos.

El análisis de los ácidos nucleicos mediante citometría de flujo requiere el marcaje de éstos mediante colorantes fluorescentes que, en condiciones experimentales permiten mantener las estructuras celulares en buen estado en forma monodispersada. La fluorescencia emitida será proporcional a la cantidad de ácido nucleico de las células.

En la mayoría de estudios en oncología es indispensable utilizar estándares que permitan determinar el nivel de ploidía y verificar la anomalía de contenido de DNA de las células analizadas.

La utilización de estándares es una necesidad inherente a la citometría de flujo. Estos se pueden analizar antes o después de la muestra problema o incluirlos dentro de la muestra a analizar. En el análisis del contenido de DNA, la calibración se puede realizar con microesferas de fluorescencia conocida o con estándares biológicos, que son los más utilizados (Miglierina, 1986). Las más comúnmente utilizadas son las células hemáticas como linfocitos humanos los timocitos de buey, los eritrocitos de trucha o de pollo (Iversen y Laerun, 1987; Vindelov et al., 1988; Pierrez y Ronot, 1991).

6.5. Determinación del contenido en proteínas por marcaje fluorescente.

El contenido total de proteínas, en células fijadas o permeabilizadas, así como en núcleos celulares aislados, se puede estimar con una variedad de colorantes ácidos que se unen covalente y específicamente a los residuos cargados positivamente en las proteínas. En la mayoría de los casos, se emplean fluorocromos cuya molécula contiene el grupo reactivo isotiocianato, que reacciona con los grupos amino libres de las proteínas. El ejemplo clásico es el isotiocianato de fluoresceína (FITC). Otros fluorocromos, como la

sulforhodamina 101 (SR101) presentan reactividad para los grupos tiólicos libres de las proteínas.

En la mayoría de aplicaciones, la tinción de proteínas no se usa sólo, sino combinada con fluorocromos de DNA. Así, Freeman y Crissman (1975), tras examinar varias sondas adecuadas para la excitación con laser de argón a 457 ó 488 nm, seleccionaron el FITC como colorante de proteínas, en combinación con el PI para DNA (Crissman y Steinkamp, 1973).

Stöhr et al., (1978) propusieron la combinación del DAPI para el marcaje de DNA y la SR101 para colorear proteínas usando excitación ultravioleta.

7. ANALISIS DEL CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUJO.

7.1. El contenido de DNA celular como marcador de la posición en el ciclo celular.

La mayor parte de los estudios clínicos del ciclo celular utilizan la valoración de un solo parámetro, el contenido de DNA. Su medida permite una estimación rápida de la cantidad de células que se encuentran en las diferentes fases del ciclo.

Debido a que durante la fase S las células duplican su contenido en DNA y que, durante la mitosis, las células hijas heredan la mitad del contenido en DNA de la célula madre, la posición de las células en el ciclo puede ser estimada mediante la medida de su contenido en DNA. Las células en G1 tienen una unidad de DNA, las células en G2 dos unidades y las células en fase S tienen valores de DNA entre uno y dos unidades.

Los histogramas de frecuencia muestran el contenido individual de DNA de las células de una población dada. También representan la distribución de las células con respecto a su posición en el ciclo y, con ciertas limitaciones, informan de las propiedades cinéticas de la población analizada.

Una de las principales aplicaciones de la citometría de flujo es el estudio cuantitativo del DNA, que permite dividir las neoplasias en dos grandes grupos:

a) tumores con DNA diploide: aquellos en los que todas las células tienen un contenido normal de DNA.

b) tumores con DNA aneuploide: aquellos en los que aparece alguna línea celular con contenido anormal de DNA.

7.2. Limitaciones del análisis monoparamétrico de DNA.

Varias limitaciones son inherentes a todos los métodos de evaluación del ciclo celular de poblaciones basados en la medida monoparamétrica del DNA. Una limitación obvia es la imposibilidad de discriminar entre células en G2 y M, ya que ambas tienen idéntico contenido en DNA. Por otra parte la cromatina de las células en fase M está más condensada y la accesibilidad de los fluorocromos al DNA y, por tanto, su tinción del DNA, es a menudo menor en M que en G2 (Crissman et al., 1984). De esta forma, en los histogramas de frecuencia del DNA, las células mitóticas pueden superponerse a la fase S. Por otra parte, en el caso de mediciones empleando núcleos aislados, las células mitóticas, carentes de membrana nuclear, se pueden perder en el conjunto (Darzynkiewicz et al., 1981).

Otra limitación es la imposibilidad de discriminar entre G0 quiescente y G1. En un gran número de sistemas celulares, las células entran en quiescencia con un contenido en DNA idéntico al de G1, de forma que estas células no pueden ser distinguidas de las G1 en ciclo.

Los histogramas de frecuencia de DNA, por otra parte, no proporcionan ninguna información directa sobre la cinética celular, de modo que dos poblaciones con tiempo de doblaje diferente pueden ser representadas por idénticos histogramas de frecuencia de DNA (Darzynkiewicz et al., 1980).

Otra desventaja en el análisis monoparamétrico es la imposibilidad de discriminar diferentes subpoblaciones celulares, que pueden estar presentes en la muestra. Un ejemplo es la mezcla de células tumorales diploides y tejido estromal y/o de infiltración normal celular. Tal mezcla está presente en las biopsias y resecciones tumorales. La presencia de células normales en estas muestras impide la estimación de la distribución del ciclo celular de las poblaciones diploides tumorales. Incluso cuando el tumor es aneuploide, la

superposición de los contenidos de DNA de las células diploides normales en las fases S y G2+M, con los de las células tumorales, complica el análisis del ciclo.

7.3. Estudios multiparamétricos del ciclo celular.

El análisis multiparamétrico hace posible la resolución de algunas de las limitaciones del análisis monoparamétrico del contenido en DNA. Así, éste sería el método de elección para estudiar la relación entre el crecimiento celular (analizando el contenido en DNA y RNA o proteínas), la diferenciación (mediante el análisis simultáneo del contenido del producto específico de diferenciación) o la progresión a través del ciclo celular. El método también puede estimar el momento y cantidad en que aparece un constituyente particular específico.

Se pueden utilizar tres estrategias en los estudios multiparamétricos del ciclo celular.

La primera es el análisis estático de la población celular. Este es el enfoque más común, en el que una medida simple revela la relación entre el estado metabólico y la fase del ciclo celular. Basándose en este análisis, se pueden distinguir subcompartimentos dentro de las fases tradicionales del ciclo celular. Las células de estos subcompartimentos tendrían características metabólicas diferentes y estarían caracterizadas por propiedades cinéticas diferentes (Darzynkiewicz et al., 1980; Darzynkiewicz y Traganos, 1990; Darzynkiewicz, 1984).

La segunda estrategia representa la combinación de la citometría multiparamétrica con las medidas cinéticas de la población celular. En este enfoque las observaciones estáticas, que no contienen ninguna información cinética per se, pueden ser relacionadas con el índice de progresión celular a través del ciclo celular. La progresión de poblaciones sincronizadas puede ser medida secuencialmente en el tiempo, de forma que se pueda calcular los índices de células que entran en S, que progresan a través de esta fase y que entran en G2 (Traganos et al., 1987).

La tercera estrategia se basa en la medición de la replicación del DNA usando ensayos que implican la detección inmunológica (Gratzner, 1982; Dolbeare et al., 1983) de la incorporación del análogo de la timidina, 5-bromodeoxiuridina (BrdUrd), revelada por el marcaje con un anticuerpo específico contra dicha molécula.

7.4. Detección de proteínas específicas asociadas con la proliferación celular.

La detección de proteínas y su estimación cuantitativa gracias a los métodos inmunohistoquímicos (Bauer, 1990), simultánea a la medida del DNA y otros marcadores del metabolismo celular, por análisis multiparamétrico con citometría de flujo, puede ser una herramienta importante para caracterizar el estado proliferativo de muchos tipos tumorales (Gerdes et al., 1984; Clevenger et al., 1987; Bauer, 1990; Engelhard et al., 1989; Engelhard et al., 1991; Van Bockstaele et al., 1991).

La mayor parte del material tumoral archivado son tumores parafinados, que pueden ser analizados adecuadamente por citometría de flujo utilizando la técnica descrita por Hedley et al. (1983), para la extracción de estos tejidos. El núcleo obtenido en el procedimiento de desparafinado puede proporcionar información que es útil en la determinación del curso de la enfermedad. Sin embargo, es necesario determinar previamente qué antígenos nucleares no se alteran significativamente durante el proceso de fijación, desparafinado, rehidratación y digestión enzimática (Lincoln y Bauer 1989; Bauer et al., 1986).

8. CANCER DE LARINGE.

8.1. Incidencia y etiología.

El cáncer de laringe representa el 4-5 % de todas las neoplasias malignas, el 25 % de los cánceres de las vías aéreas superiores (Kleinsasser, 1988) y el 53 % de todas las neoplasias otorrinolaringológicas (Karim, 1977).

Ya que el 80-90% de los casos son producidos por agentes cancerígenos químicos, existe la posibilidad de prevenir este tipo de cáncer mediante la educación y la adopción de normas.(Arthur, 1987).

Este tipo de cáncer se ha relacionado con el consumo excesivo de tabaco y con el alcoholismo, sólo o en combinación, apareciendo un sinergismo entre ambos factores. El riesgo de desarrollar cáncer de cabeza y cuello en los individuos con alcoholismo aumenta casi 100 veces en los fumadores en exceso. (Arthur, 1987).

Los factores de riesgo relacionados con la exposición a sustancias nocivas parecen desempeñar también una función importante en el desarrollo de las neoplasias de laringe. Personas expuestas a ácido sulfúrico, resinas termoplásticas, pesticidas y otros agentes químicos tienen un alto riesgo de padecer cáncer laríngeo (Maier et al., 1991). Este efecto explicaría porqué las ciudades industrializadas muestran una incidencia 2-3 veces superior a las poblaciones rurales.

Es interesante destacar que se ha relacionado la localización del tumor con la sustancia de exposición. Así, el cáncer de epiglotis se ha asociado con la exposición a aceite, grasa y cemento, mientras que el cáncer de glotis se ha asociado con la exposición a colorantes artificiales (Cauvin et al., 1990).

La irradiación de cabeza y cuello en individuos jóvenes también ha sido implicada en el desarrollo posterior de cánceres de laringe (Rabbet, 1965).

Por último, se ha encontrado una historia familiar previa de cáncer, en casi la mitad de los pacientes con cáncer de laringe, pero sólo una pequeña parte de estos antecedentes se había localizado en la laringe (Iwamoto, 1975).

8.2. Histopatología del carcinoma de laringe.

El tipo histológico más frecuente es el carcinoma epidermoide o de células escamosas (más del 90 % de todos los tumores malignos de laringe) y principalmente observado en grandes fumadores, aunque recientes investigaciones indican también que el virus del papiloma humano puede jugar un papel importante (Zardo et al., 1988; Kulski et al., 1990; Watts, 1991). Dentro del carcinoma epidermoide, la variedad más frecuente es el carcinoma invasor, que es el que se estudiará a continuación, aunque existen otras variedades, cuyo origen establecerá las diferencias en la sintomatología clínica, en las variedades histológicas y el comportamiento clínico de los pacientes.

8.3. Carcinoma invasor.

Macroscópicamente, estos tumores pueden presentarse de diferentes maneras. A menudo tienen el aspecto de infiltración difusa de la cuerda vocal, pálida o enrojecida, engrosada e inmóvil. En otras ocasiones el tumor es excrecente, papilomatoso o polipoide, mientras en otros casos el tumor se encuentra ulcerado e infiltra gran parte del tejido cercano. La ulceración ocurre principalmente en estadios posteriores de la evolución del tumor.

Histológicamente crecen formando masas sólidas o bien en forma de cordones celulares. La formación de queratina por estas células tumorales indicado por disqueratosis, paraqueratosis y la presencia de gránulos de queratohialina así como el aumento de puentes intercelulares son un índice de buena diferenciación.

La evaluación de la localización del tumor es de gran importancia ya que influye en el pronóstico. Así, debemos considerar tres áreas anatómicas en las neoplasias de laringe y cuatro grupos tumorales: tumores glóticos, tumores supraglóticos, tumores subglóticos, tumores transglóticos.

a) Tumores glóticos: Se localizan en las cuerdas vocales, comisura anterior y comisura posterior. Por su localización, dan cambios en la voz, diagnosticándose en estadios iniciales, careciendo, en general, de metástasis en el momento del diagnóstico al no haber vasos linfáticos en el borde libre de la cuerda.

Predominan en este área los carcinomas epidermoides queratinizantes bien diferenciados, que pueden presentar morfología macroscópica exofítica, ulcerada o hiperqueratósica (Bauer, 1976). Son tumores de crecimiento lento, localizándose la mayor parte de las veces en la mitad anterior de la cuerda vocal.

Tienen un buen pronóstico, con un alto índice de supervivencia sin recurrencia o metástasis.

b) Tumores supraglóticos: Pueden asentar en la epiglotis, la banda ventricular y el ángulo entre ambas estructuras (Kleinsasser, 1961). Pueden verse formas queratinizantes y no queratinizantes, siendo esta última más frecuente. Macroscópicamente pueden ser exofíticos o endofíticos y la ulceración es menos frecuente que en los queratinizantes glóticos (Bauer, 1976).

La extensión ganglionar es más frecuente en los carcinomas supraglóticos que en los glóticos dada la mayor riqueza linfática de la zona.

Por su localización no suelen dar clínica temprana, siendo el diagnóstico tardío y en estadios avanzados.

c) Tumores subglóticos: Se originan entre la cuerda vocal y el primer cartílago traqueal, son poco frecuentes.

d) Tumores transglóticos: Atraviesan el ventrículo verticalmente y se asocian a fijación de la cuerda vocal.

8.4. Clasificación T.N.M.

La clasificación T.N.M. se basa en el estudio del tumor primario (T), de los ganglios regionales (N) y de la existencia o no de metástasis (M). Basada en el criterio T.N.M., la Unión Internacional contra el Cáncer (UICC) estableció, en 1989, la clasificación vigente de los cánceres de laringe (Hermanek y Sobin, 1987; Bears et al., 1987; T.N.M. atlas, 1990), como se describe a continuación:

T.- Tumor primario.

SUPRAGLOTIS.

Tis: Carcinoma preinvasor o in situ.

T-1: Tumor limitado a la región con movilidad normal.

T-2: Tumor de la epiglotis y/o ventrículos, que se extiende hacia la glotis sin fijación.

T-3: Tumor limitado a la laringe con fijación u otra evidencia de infiltración profunda.

T-4: Tumor con extensión directa más allá de la laringe.

GLOTIS

Tis: Carcinoma preinvasor o in situ.

T-1: Tumor limitado a la región con movilidad normal.

T-1a: Tumor limitado a una cuerda.

T-1b: Tumor que compromete a ambas cuerdas.

T-2: Tumor limitado a la laringe con extensión a la supraglotis o a la subglotis con movilidad normal o disminuída

T-3: Tumor limitado a la laringe con extensión a la supraglotis o subglotis, con fijación de una o ambas cuerdas.

T-4: Tumor que se extiende más allá de la laringe por extensión directa.

SUBGLOTIS

Tis: Carcinoma preinvasor o in situ.

T-1: Tumor limitado a la región con movilidad normal.

T-2: Tumor que afecta a la región subglótica y que se extiende a una o ambas cuerdas vocales con movilidad normal o disminuída.

T-3: Tumor limitado a la laringe con fijación de una o ambas cuerdas vocales.

T-4: Tumor que se extiende más allá de la laringe.

N.- Ganglios linfáticos regionales.

N-0: No existe evidencia de ganglios linfáticos comprometidos.

N-1: Hay evidencia de metástasis en un ganglio linfático homolaterales hasta 3 cm de diámetro.

N-2: Hay evidencia de metástasis en un ganglio linfático homolateral de 3 a 6 cm de diámetro, o múltiples ganglios homolaterales,ninguno de más de 6 cm de diámetro, o contralaterales o bilaterales, ninguno de más de 6 cm de diámetro máximo.

N-3: Metástasis en un ganglio linfático de más de 6 cm de diámetro máximo.

M. Metástasis a distancia.

M-0: No hay evidencia de metástasis a distancia.

M-1: Hay evidencia de metástasis a distancia.

La combinación de los tres parámetros, el tumor, los ganglios y la existencia o no de metástasis, permiten clasificar los tumores de laringe en cuatro estadios: **(TABLA 1)**.

TABLA 1. CLASIFICACION DE LOS TUMORES SEGUN EL ESTADIO T.N.M.

ESTADIO I	T1	N0	M0
ESTADIO II	T2	N0	M0
ESTADIO III	T3 T1, T2, T3	N0 N1	M0 M0
ESTADIO IV	T4 Cualquier T Cualquier T	N0, N1 N2, N3 Cualquier N	M0 M0 M1

OBJETIVOS

1. Estudiar por citometría de flujo la correlación entre el contenido de DNA y la concentración de proteínas en núcleos tumorales diploides y aneuploides procedentes de secciones fijadas y parafinadas de carcinomas laríngeos, con el fin de comprobar si el nivel de proteínas nucleares totales proporciona información adicional sobre la agresividad del tumor.
2. Estudiar por citometría de flujo la correlación entre la ploidía nuclear, el contenido en proteínas totales y la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), proteína específica, auxiliar de la DNA polimerasa- δ , con el fin de valorar la potencia del análisis multiparamétrico en la determinación de la agresividad tumoral.
3. Correlacionar, mediante análisis estadístico multivariante los anteriores parámetros bioquímicos nucleares con otros parámetros clínicos e histopatológicos tumorales, con el fin de determinar el valor pronóstico de la adición de parámetros bioquímicos fácilmente analizables por citometría de flujo a los factores pronóstico de uso habitual.

MATERIAL Y METODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO.

Muestras tisulares, fijadas e incluidas en parafina, de 163 tumores laríngeos. Las muestras, en forma de secciones de 50 μm de espesor, procedían de los archivos de Anatomía Patológica del Hospital General Universitario de Valencia (85 tumores) y del Hospital General de Elche (78 tumores).

Los pacientes de nuestro estudio tuvieron un seguimiento no inferior a 8 años con un rango de 16 años, no habiéndose sometido a ningún tratamiento previo que pudiera desvirtuar la evolución posterior o alterar las características histológicas del material archivado. Los bloques de tumores fueron incluidos en parafina. Del estudio por citometría de flujo fueron eliminados los que no obtuvieron un conteo mínimo de 5000 núcleos y aquellos cuyo coeficiente de variación del pico G0 fue $> 10\%$.

2. INSTRUMENTACION.

- Citofluorímetros de Flujo EPICS Profile II y EPICS Elite (Coulter Electronics, Inc., Hialeah, FL, USA).
- Sistema DNA-PREP (Coulter Electronics, Inc., Hialeah, FL, USA) de preparación automatizada de muestras para análisis del contenido en DNA
- Baño termostático.
- Centrífuga clínica.

3. REACTIVOS.

3.1. Reactivos para la obtención de suspensiones de núcleos:

- Xilol absoluto (Panreac).
- Etanol absoluto (Panreac).
- Pepsina (Boehringer Mannheim).
- Tampón salino de fosfatos (PBS) ajustado a pH 1.5 con CIH 1N.

3.2. Reactivos del sistema DNA-Prep para tinción de DNA:

- DNA-Prep LPR.
- DNA-Prep Stain.
- DNA-Prep Reference.

3.3. Reactivos para tinción de proteínas nucleares:

- Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Lambda Fluoreszenz-technologie, GmbH, Graz, Austria).

3.4. Otros productos.

- Filtros de nytex de diferente diámetro de poro (Maissa, S.A., Barcelona).
- Microesferas fluorescentes DNA-Check (Coulter Electronics, Inc.) para alineamiento del citómetro.
- Solución salina isotónica para citometría de flujo Isoton II (Coulter Electronics, Inc.).

4. OBTENCION DE SUSPENSIONES NUCLEARES.

Los bloques de parafina que contenían los tumores fueron numerados y registrados, detallando los datos clínicos e histológicos. De cada bloque, mediante microtomo, se realizaron tres cortes sucesivos. El primero de 4 micras, el segundo de 50 micras y el tercero de 4 micras. Los cortes de 4 micras se tiñeron con hematoxilina-eosina para confirmar la existencia de tumor en ambas secciones. Cada corte de 50 micras se introdujo en un tubo de vidrio numerado.

Para el estudio de estos tumores hemos utilizado la técnica de Hedley (1983) (**Figura 4**). Esta sigue una serie de etapas o pasos a seguir que podemos sintetizar en:

- a) Desparafinado.
 - b) Rehidratación.
 - c) Obtención de la suspensión nuclear.
 - d) Tinción específica.
- a) Los cortes se desparafinaron añadiendo 10 ml de xilol, realizando dos cambios de diez minutos cada uno a temperatura ambiente.
- b) Una vez desparafinado, se rehidrató el tejido utilizando etanol a concentraciones decrecientes de la siguiente forma :
- 100 %.....5 minutos.
- 100 %.....5 minutos.
- 95 %.....5 minutos.
- 70 %.....10 minutos.
- 50 %.....10 minutos.

Tras estos pases se mantuvo el tejido en agua destilada durante 8 horas.

- c) Se retiró cuidadosamente el agua sobrante, depositando el tejido sobre un porta-objetos, para disgregar mecánicamente las piezas con ayuda de tijeras finas o bisturí.

A continuación se procedió a la disgregación enzimática del homogenado obtenido. Para ello, se incubó cada homogenado con 4 ml de pepsina al 0,5 % en cloruro sódico al 0.9%, ajustado a pH 1,5 con ClH 2N. La incubación se mantuvo a 37°C durante 30 minutos, con agitación intermitente con vórtex. La acción de la pepsina se detuvo añadiendo a cada tubo 2 ml de PBS e introduciendo los tubos de ensayo en una cubeta con hielo. Con el fin de retirar agregados celulares y restos fibrilares de tejido, se filtra la suspensión a través de un filtro de nytex de 50 micras de diámetro. La solución resultante fue centrifugada 10 minutos a 2000 rpm en centrífuga clínica, desechando el sobrenadante.

- d) El sedimento nuclear obtenido fue procesado mediante el sistema automatizado DNA-PREP. Este sistema dispensa inicialmente 100 microlitros de un reactivo de lisis y permeabilización, compuesto por un detergente no

iónico y un agente fijador. Los núcleos estabilizados fueron teñidos a continuación con 2 ml de una solución de yoduro de propidio (50 microgramos/ml) en presencia de RNasa (1mg/ml). Las suspensiones se dejaron durante la noche a 4°C, en oscuridad y, a continuación, tras llevarlas a temperatura ambiente, fueron teñidas con 1 microgramo/ml de FITC durante una hora en oscuridad.

5. DETERMINACION DEL PCNA.

5.1. Técnica inmunohistoquímica.

En el material parafinado se realizaron cortes de 4 micras para la tinción con hematoxilina-eosina.

Igualmente se practicaron secciones de 4 micras de grosor que se adhirieron a portaobjetos pretratados y se secaron a temperatura ambiente durante 1 hora.

Para la inmunotinción se utilizó el método de la avidina-biotina peroxidasa (ABC) según Hsu et al. (1982), que comporta una serie de maniobras preparatorias:

- a) Desparafinación de las muestras mediante 3-6 baños sucesivos en xileno de 5 minutos cada uno a temperatura ambiente.
- b) Hidratación: por 3-5 pases sucesivos de 5 minutos cada uno en alcohol etílico de 100° para eliminar el xileno, inmersión de las piezas en alcohol de 70° y finalmente en agua corriente.

La inmunotinción se desarrolló a temperatura ambiente, en las siguientes etapas:

- a) Inhibición de la peroxidasa endógena: Se trataron las secciones con agua oxigenada al 1% en metanol durante 20 a 30 minutos.
- b) Lavado de las preparaciones con tres cambios de tampón (a 25 ml de solución acuosa stock 1M de Tris-hidroximetil aminometano, se añadieron 500 ml de suero salino fisiológico, ajustándose el pH a 7.5-7.7 con ácido clorhídrico concentrado) durante 5 minutos cada cambio.

- c) Se bloqueó la unión inespecífica de las inmunoglobulinas al colágeno con suero plasmático de caballo (Oxoid) diluido al 20% en suero salino fisiológico durante 20 minutos.
- d) Incubación con el inmunosuero primario: Se empleó el anticuerpo monoclonal PC-10 frente al PCNA comercializado por Dako, Dinamarca. Se incubó durante 45 minutos a una concentración de 1:20.
- e) Lavado de las preparaciones con tres cambios de Tris-salino de durante 5 minutos cada uno.
- f) Incubación del inmunosuero secundario: Se cubrieron las preparaciones con suero de conejo, a una concentración de 1:200 durante 45 minutos.
- g) Lavado de las preparaciones con tres cambios de Tris-salino durante 5 minutos cada pase.
- h) Incubación con inmunosueros terciarios: Se utilizó una solución de avidina-biotina-peroxidasa preparada extemporáneamente (a 1 ml de suero de caballo al 10% en suero fisiológico se le añaden 10 microgramos de avidina y 2.5 microgramos de biotina peroxidasa).
- i) Lavado de las preparaciones con tres pases por Tris-salino de 5 minutos cada uno.
- j) Revelado de la actividad peroxidásica: Se realizó con una solución de diaminobencidina preparada extemporáneamente. Se preparó disolviendo 50 mg. de diaminobencidina de 100 ml. de tampón Tris 0.2 M a pH=7.4. En el momento del empleo, se añaden, agitando enérgicamente, 30-50 microlitros de agua oxigenada de 110 volúmenes. La solución se filtra sobre las preparaciones, incubándose en oscuridad durante 5-7 minutos.
- k) Contraintinción: Las preparaciones se contrastaron con hematoxilina, lavando bien a continuación con agua corriente y agua destilada.
- l) Montaje: Tras deshidratación con alcoholes de concentración creciente y 3-5 pases por xileno, se montaron con una resina sintética (Entellan, Merck).

5.2. Valoración de los resultados.

Una vez teñidas las preparaciones, se contaron al menos 1000 núcleos de cada caso. Se excluyeron las zonas necróticas, las zonas de densa queratinización con núcleos picnóticos o zonas anucleadas y las áreas marginales de la preparación, sobre todo en los casos en los que la tinción fue irregular.

Se valoró el porcentaje de núcleos teñidos según la fórmula:

$$\text{INDICE DE PCNA} = \frac{\text{N}^{\circ}\text{de núcleos teñidos}}{\text{N}^{\circ}\text{de núcleos contados}} \times 100$$

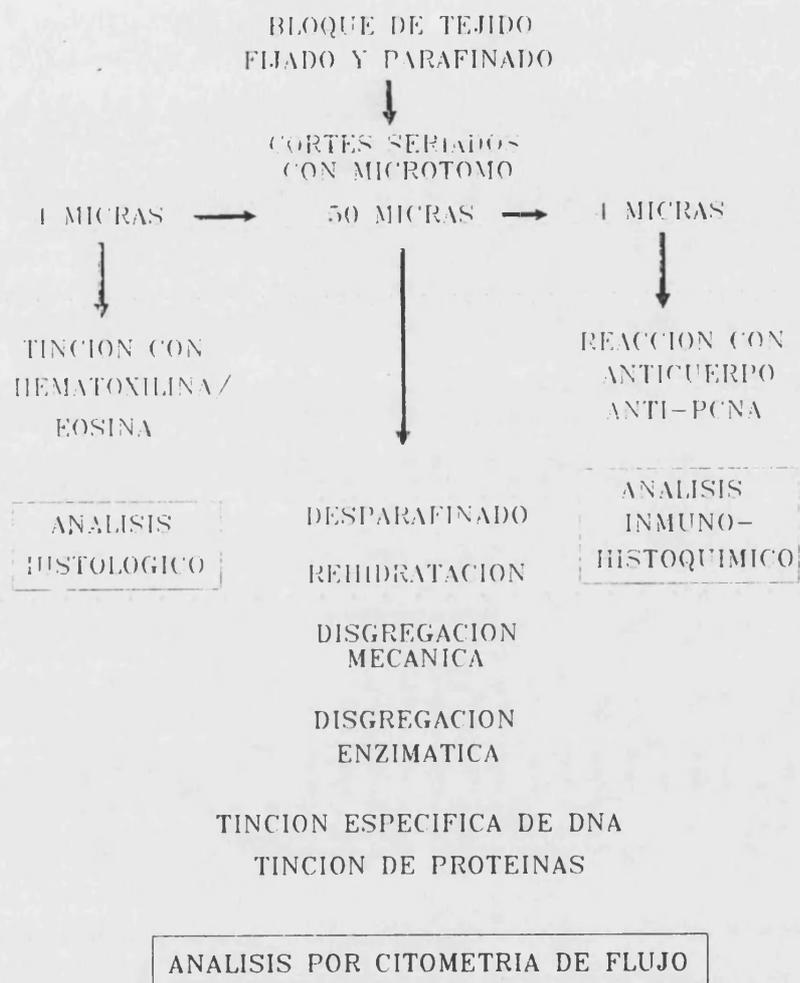


Figura 4. Protocolo del estudio histológico, inmunohistoquímico y por citometría de flujo.

6. CITOMETRIA DE FLUJO.

Para el presente estudio se ha utilizado fundamentalmente el citómetro de flujo EPICS Elite, del Centro de Referencia de Citometría Coulter, con sede en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de Valencia, así como el citómetro de flujo EPICS Profile II, del Servicio de Oncología del Hospital General de Elche. En ambos casos se utilizó como fuente de iluminación un láser de Argón de 15 mW de potencia sintonizado a 488 nmW. El conjunto de filtros para la medida simultánea de DNA y proteínas nucleares constó de los siguientes elementos: 488 DL + 488 BP (para medir la dispersión lateral en el fotomultiplicador 1); 488 BK (para bloquear el exceso de luz laser); 550 DL + 525 BP (para medir la fluorescencia verde del FITC en el fotomultiplicador 2); 600 DL + 575 BP (para medir la fluorescencia naranja del PI en el fotomultiplicador 3).

7. ANALISIS DE LOS DATOS.

Para cada muestra se adquirieron los datos correspondientes a 5000 núcleos, almacenados en el ordenador del citómetro en forma de histogramas previamente seleccionados:

a) Histogramas monoparamétricos de DNA: representación de la concentración de DNA en núcleos individuales, (eje de abscisas, dividido en 1024 canales de fluorescencia), frente al número de núcleos en cada canal. Estos histogramas se utilizan para el análisis de la ploidía del ciclo celular.

(Figuras 5A y 6A).

b) Histogramas biparamétricos de DNA frente a proteínas nucleares: representación de la concentración de DNA frente a la concentración de proteínas nucleares, en núcleos individuales, sobre ejes cartesianos de 1024 canales de resolución. Cada punto está definido por un valor de DNA y proteínas. La distribución numérica de la población se visualiza mediante curvas de nivel o proyección isométrica tridimensional. Estos histogramas se

utilizan para el estudio de la concentración proteica en las distintas ploidías nucleares, así como el nivel de proteínas a lo largo del ciclo celular. **(Figuras 5B y 6B).**

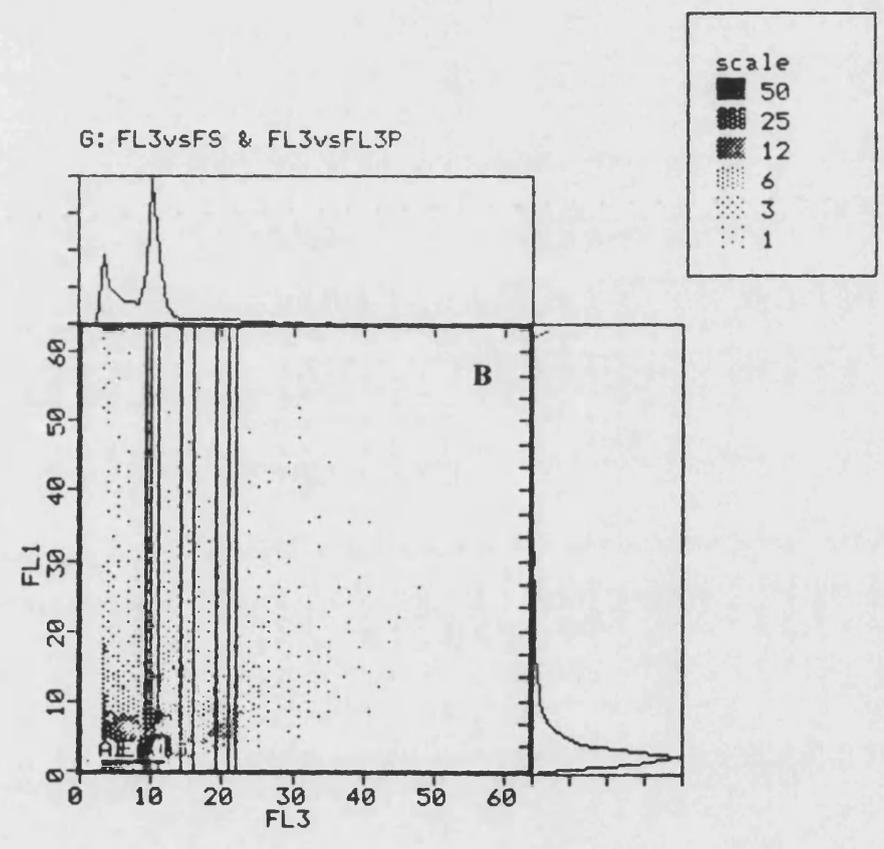
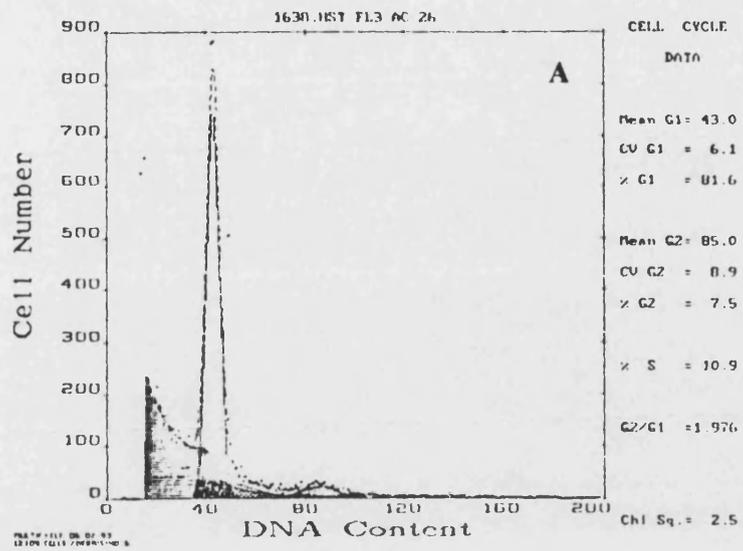


Figura 5. A: Histograma monoparamétrico de DNA de un tumor diploide;
B: Histograma biparamétrico DNA/Proteína nuclear de un tumor diploide.

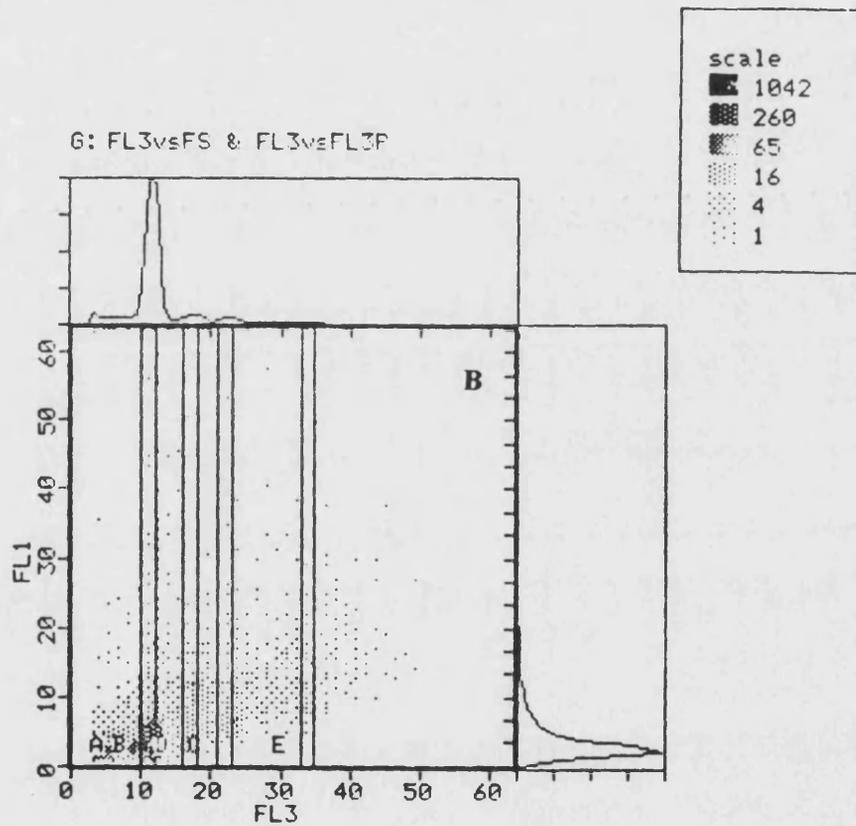
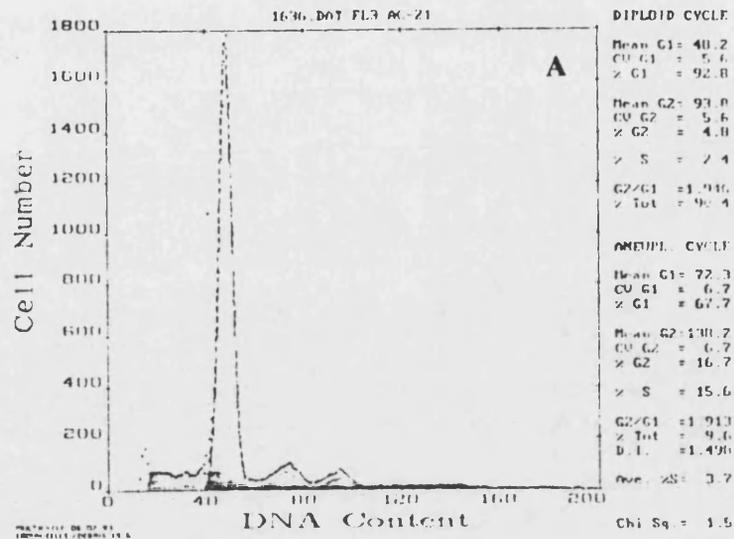


Figura 6. A: Histograma monoparamétrico de DNA de un tumor aneuploide;
B: Histograma biparamétrico DNA/Proteína nuclear de un tumor aneuploide.

7.1. Histogramas monoparamétricos de DNA.

Para el análisis de los histogramas monoparamétricos de DNA se utilizó el programa de ordenador MultiCycle (Phoenix Flow Systems; San Diego, CF, USA). Este programa utiliza modelos matemáticos complejos, aplicados a:

- a) Distinguir entre poblaciones diploides o aneuploides.
- b) Eliminar el ruido de fondo, situado a la izquierda del histograma y originado por la acumulación de detritus celular o núcleos seccionados.
- c) Calcular las características estadísticas de las distribuciones de los picos diploides o aneuploides presentes en el histograma:
 - Coeficiente de variación (CV) de cada pico.
 - Posición media de cada pico.
 - Porcentaje de células en cada una de las distintas fases.
 - Índice de DNA (DI).
 - El valor de Chi-Cuadrado para cada análisis estadístico.

7.1.1. Coeficiente de variación.

Este parámetro caracteriza la amplitud de la distribución de una curva. En citometría de flujo, su interés radica básicamente en la información que aporta respecto a la optimización de la medida, alineamiento del citómetro, calidad de la muestra y de la tinción. En el presente trabajo, se rechazaron los histogramas en los que el CV del pico diploide fuese mayor de 10 (Guo et al., 1989; Kaplan et al., 1986).

$$COEFICIENTE DE VARIACION = \frac{Desviación\ Stándard}{Media} \times 100$$

7.1.2. Índice de DNA.

En tumores diploides es igual a 1 y en tumores aneuploides siempre diferente a 1. En tumores aneuploides se calcula del cociente entre el canal modal del pico G0/G1 aneuploide y el canal modal del pico G0/G1 diploide.

7.1.3. Porcentaje de células en fase S.

Corresponde al área del histograma comprendida entre los picos G0/G1 y G2/M. En general, se produce el solapamiento de la fase S con la fase G0/G1 al principio del área y con la fase G2/M al final. Este hecho, unido a la presencia de un grado variable de detritus celulares, puede dar lugar a resultados dispares en este parámetro en una misma muestra analizada. Para evitar o disminuir estos problemas se han diseñado diversos programas de ajuste matemático de la fase S (modelos polinomial, exponencial, etc...). El uso de cada uno de estos modelos depende de las características de la muestra a analizar.

7.1.4. Índice de proliferación.

Este índice proporciona información sobre la cantidad de células que se encuentran en fase proliferativa. La suma del porcentaje de núcleos en la fase S, en la fase G2 y en la fase M, con respecto al número total de núcleos analizados (Prescott, 1968).

7.1.5. Chi cuadrado.

Es el parámetro estadístico que permite cuantificar la bondad del ajuste de las distribuciones calculadas para el ciclo celular con respecto a la curva original del histograma. Los valores del Chi-Cuadrado elevados representan pobres ajustes y bajos Chi-Cuadrado buenos ajustes (Bevington, 1969).

7.1.6. Ajuste del ruido de fondo: Efecto de los núcleos seccionados.

Todas las suspensiones nucleares empleadas para el análisis del DNA por citometría de flujo contienen fragmentos nucleares, de tamaño variable, que resultan en un componente adicional del histograma, fundamentalmente visible a la izquierda del pico de la fase G1 diploide.

En el análisis de DNA a partir de células en suspensión y, en menor caso, a partir de tumores sólidos en fresco, el ruido de fondo es pequeño, y no significativo en la región del histograma ocupada por el ciclo celular. Desafortunadamente, esto no es lo habitual en el análisis de DNA a partir de material de archivo, y para sustraer los efectos del ruido de fondo, se hace imprescindible el incluir modelos matemáticos de análisis de la curva de detritus (Rabinovitch, 1991).

El modelo exponencial, más sencillo, (**Figura 7A**) ha sido el más utilizado

en los primeros estudios citométricos de DNA. En la actualidad ha disminuído su utilización debido a la aparición de nuevos y mejores métodos de compensación tales como el de corte único y de corte múltiple. El modelo de distribución de corte único se representa en la **Figura 7B**. El modelo de distribución en corte múltiple (**Figura 7C**), es utilizado para compensar la fragmentación de núcleos, consecuencia inevitable de las técnicas de preparación. Este modelo se recomienda para histogramas de DNA obtenidos a partir de tejidos frescos o congelados.

El mejor ajuste del ruido de fondo en los histogramas procedentes de tumores parafinados se obtiene con el modelo conocido como de núcleos cortados, ("sliced nuclei"). Este modelo es una combinación de los modelos de corte único y de corte múltiple y ajusta todas las partes de la curva de detritus (**Figura 8**), siendo además insensible a los puntos finales elegidos para el ajuste de la región.(Rabinovitch, 1993; Kallioniemi, 1991).

7.2. Histogramas biparamétricos: DNA/Proteína nuclear.

En estos histogramas se representó en el eje de abscisas la cantidad de DNA y en el eje de ordenadas las proteínas nucleares, expresados como unidades arbitrarias de fluorescencia, con un rango de 0 a 64. Tras acotar las áreas de interés mediante cursores, se registraron, cuando la distribución del contenido en DNA permitía discernir claramente las áreas de interés, los valores correspondientes a:

- a) Proteínas nucleares totales.
- b) Proteínas nucleares en el pico G0/G1 diploide
- c) Proteínas nucleares en el pico G0/G1 aneuploide.
- d) Proteínas nucleares en la zona media de la fase S.
- e) Proteínas nucleares en las fases S+G2/M del ciclo diploide.
- f) Proteínas nucleares en las fases S+G2M del ciclo aneuploide
- g) Proteínas nucleares del pico G2/M diploide.
- h) Proteínas nucleares del pico G2/M aneuploide

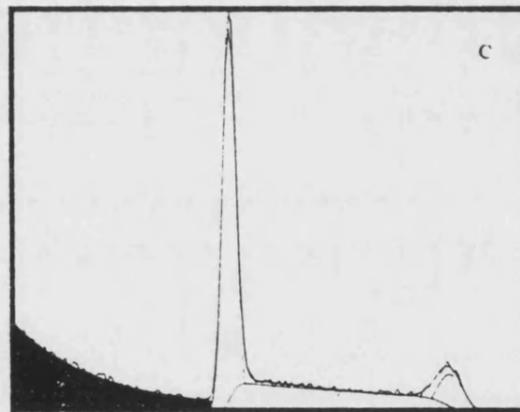
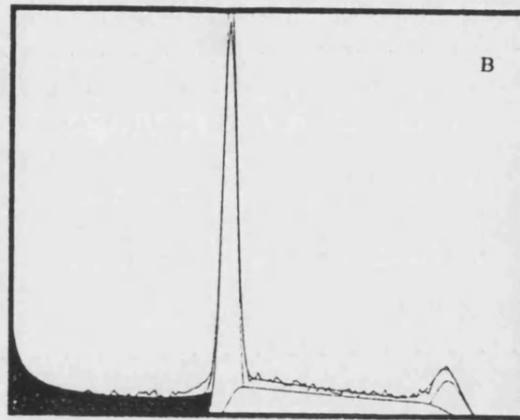
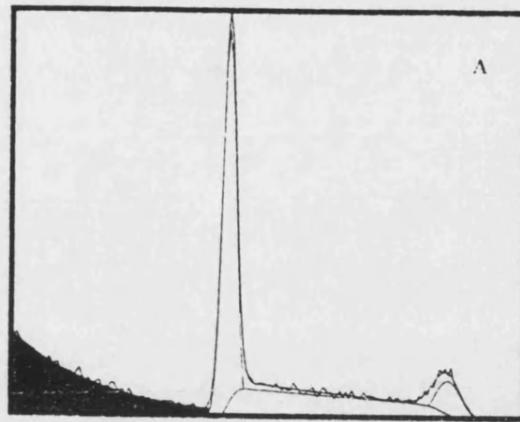


Figura 7. A: Modelo exponencial ; **B:** Modelo de corte único ; **C:** Modelo de corte múltiple.

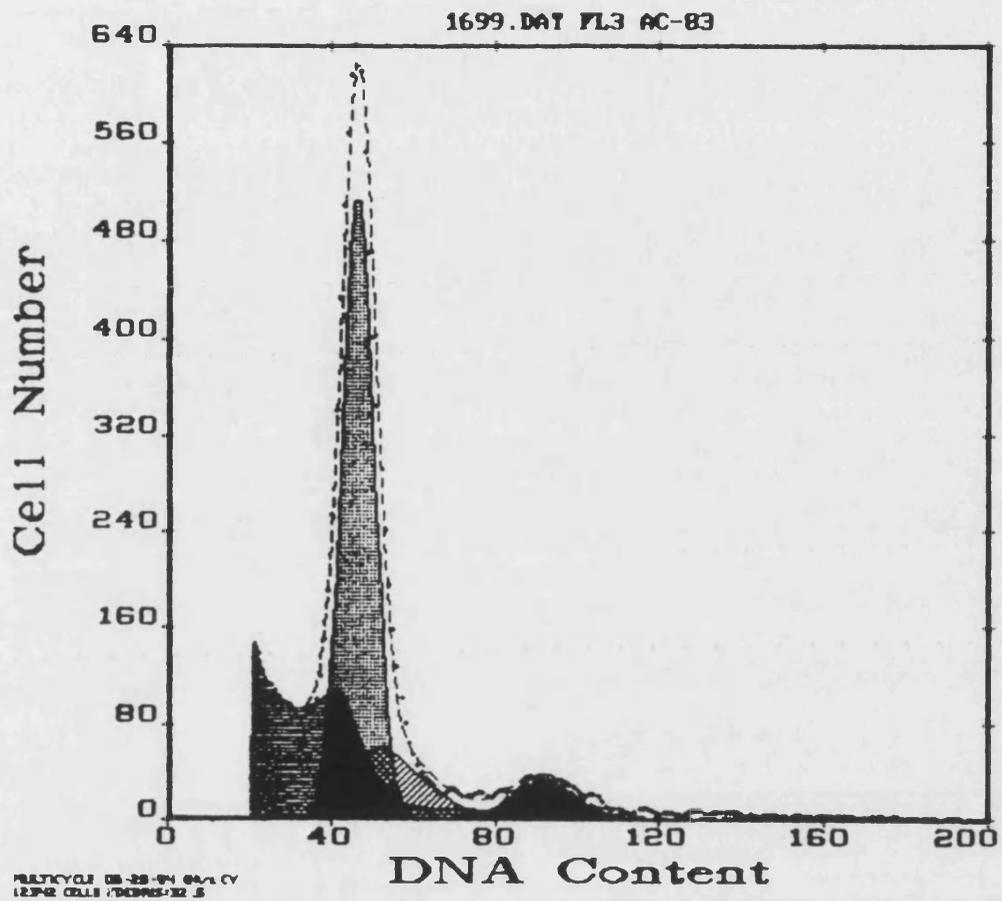


Figura 8. Modelo de ajuste utilizado para el análisis de los histogramas obtenidos a partir de muestras de tejidos parafinados.

8. ESTUDIO CLINICO.

8.1. Clasificación según factores clínicos.

Para cada paciente, se registraron los siguientes factores referidos a su enfermedad, estableciéndose las siguientes clasificaciones:

Identificación: Número de Historia clínica o número de biopsia.

Edad: Se clasificó a los pacientes en cinco grupos: menores de 40 años, de 40 a 50 años, de 50 a 60 años, de 60 a 70 años y mayores de 70 años.

Localización anatómica del tumor: Se dividieron los tumores en supraglóticos, glóticos y subglóticos.

Estadio T.N.M.: Los pacientes se reestadiaron siguiendo las normas de la U.I.C.C. (1989), definidas y desarrolladas en las páginas 29-31.

Recidivas locorregionales y metástasis a distancia: En el caso de producirse se calculó el tiempo transcurrido en meses desde la fecha de la intervención hasta la recaída tumoral.

Supervivencia: Se constató el estado de los pacientes según se encontrasen en la fecha de actualización (Mayo de 1994): vivo con o sin enfermedad, muerto por la enfermedad y perdidos o muertos por otra causa durante el seguimiento. Se averiguó la fecha de la muerte y se definió como supervivencia al tiempo transcurrido desde el diagnóstico hasta la última fecha de seguimiento.

9. ESTUDIO HISTOLOGICO.

Se estudiaron las características histológicas del tumor, dividiéndolas en dos grandes grupos: macroscópicas y microscópicas. Estas últimas, a su vez, se clasificaron en tres grandes grupos, según correspondieran a la histopatología del tumor, la infiltración tumoral de tejidos vecinos o la infiltración ganglionar.

9.1. Características histológicas macroscópicas.

Ulceración: Se clasificó a los tumores según la existencia o no de ulceración macroscópica.

Patrón de crecimiento: Se diferenciaron tres patrones: exofítico, endofítico y mixto.

9.2. Características microscópicas del tumor.

Estructura: Se dividieron los tumores en cuatro grupos:

- Sólido: Con crecimiento en nidos de bordes netos en frondas.
- Cordonal: Crecimiento en cordones o filas de células.
- Mixto: Sólido-cordonal.
- Acantolítico: Con hendiduras por acantolisis.

Queratinización: Se dividieron los tumores en tres grupos según el número de perlas de queratina que se observaron. (Escaso, moderado, marcado).

Polimorfismo celular: Según el tamaño, forma y relación núcleo-citoplasma, se clasificaron los tumores como de polimorfismo marcado, moderado o escaso.

Índice mitótico: Se clasificaron los tumores en tres grupos:

- Escaso (0-10 mitosis en 10 campos de alto aumento)
- Moderado (11-20 mitosis)
- Alto (más de 20 mitosis)

Grado de diferenciación: Se obtiene del estudio del grado de queratinización, polimorfismo celular y número de mitosis. Se dividieron los tumores en tres grupos: escaso, moderado y marcadamente diferenciados.

Necrosis: Se dividió a los tumores según el área de necrosis en:

- Menor de 1/3 del tumor.
- Entre 1/3 y 2/3 del área del tumor.
- Mayor de los 2/3 del área del tumor.

9.3. Características microscópicas de la infiltración tumoral.

Respuesta linfoplasmocitaria: Según el grado de infiltración linfocítica y de células plasmáticas inflamatorias se dividió a los tumores como de escasa, moderada y marcada respuesta celular.

Lesiones marginales: Según la presencia de lesiones en la zona exterior del frente tumoral, se pudieron clasificar los tumores en: de margen normal, metaplasia, displasia y carcinoma in situ.

Modo de infiltración: Se establecieron los grupos de tumores con borde neto y tumores con borde mal definido.

Grado de infiltración: Fue definido por la extensión de la infiltración tumoral de la pared laríngea en relación a sus estructuras histológicas.

Invasión vascular: Se determinó la existencia de invasión hemática, linfática, de ambas o la inexistencia de invasión.

Márgenes quirúrgicos: Según infiltran o no los márgenes quirúrgicos.

9.4. Características microscópicas de la infiltración ganglionar.

La existencia o no de **infiltración metastásica** de los mismos.

Número de adenopatías metastásicas.

Número de ganglios extraídos en la intervención quirúrgica.

Patrón de invasión de las mismas: no invasión, invasión focal o masiva.

Existencia o no de **rotura capsular en las adenopatías metastásicas.**

Tipo de reacción ganglionar, dividido en cuatro grupos:

- Hiperplasia folicular, cuando existió aumento de los folículos corticales y medulares contenidos en los centros germinales.
- Histiocitosis sinusoidal, cuando se encontró al menos de 3 a 6 histiocitos sincitiales con núcleo ovoide y citoplasma eosinófilo entre los sinusoides medulares de los ganglios linfáticos.
- Hiperplasia folicular con histiocitosis sinusoidal.
- Sin reacción ganglionar.

10. ESTUDIO ESTADISTICO.

10.1. Elaboración de la base de datos.

Con los datos clínicos, histológicos y citométricos obtenidos de cada tumor se estableció la siguiente base de datos, de la que se indican los campos individuales y, entre paréntesis, el número de caracteres asignados a los parámetros de clasificación indicados en cada caso.

0. Hª CLINICA.

1. NUMERO. (000).

2. EDAD (00). En años.

3. FECHA DE LA CIRUGIA INICIAL. (00/00/00).

4. TIPO DE CIRUGIA. (0).

1. Cordectomía. 2. Laringuectomía Supraglótica. 3. Laringuectomía total.

5. TIPO DE VACIAMIENTO. (0).

1. No vaciamiento. 2. Vaciamiento del mismo lado.

3. Vaciamiento contralateral. 4. Vaciamiento bilateral.

6. RADIOTERAPIA. (0).

1. Sí. 2. No.

7. QUIMIOTERAPIA. (0).

1. Sí. 2. No.

8. LOCALIZACION. (0).

1. Supraglótica. 2. Glótica. 3. Subglótica.

9. GRADO DE T. (0).

1. T1. 2. T2. 3. T3. 4. T4. 5. Tx.

10. GRADO DE N. (0).

0. N0. 1. N1. 2. N2. 3. N3. 4. Nx.

11. GRADO DE M. (0).

0. No. 1. Sí.

12. ESTADIO T.N.M. (0).

1. I. 2. II. 3. III. 4. IV.

13. FECHA DE RECIDIVA 00/00/00.

14. ESTADO ACTUAL. SUPERVIVENCIA. (0)

1. Vivo con enfermedad. 2. Vivo sin enfermedad.
3. Perdido en el seguimiento (Muerto por otra causa). 4. Muerto por la enfermedad.

15. ULCERACION MACROSCOPICA. (0).

1. Sí. 2. No.

16. PATRON DE CRECIMIENTO MACROSCOPICO. (0).

1. Exofítico. 2. Endofítico. 3. Mixto.

17. MARGENES QUIRURGICOS. (0).

1. Infiltrados. 2. No infiltrados.

18. ESTRUCTURA. (0).

1. Sólido. 2. Cordonal. 3. Mixto. 4. Acantolítico.

19. GRADO DE QUERATINIZACION. (0).

1. Escaso. 2. Moderado. 3. Marcado.

20. POLIMORFISMO CELULAR. (0).

1. Escaso. 2. Moderado. 3. Marcado.

21. NUMERO DE MITOSIS POR CAMPO. (0).

1. Escaso. 2. Moderado. 3. Alto.

22. GRADO DE DIFERENCIACION. (0).

1. Escaso. 2. Moderado. 3. Marcado.

23. NECROSIS. (0).

1. Menor de 1/3. 2. Entre 1/3 - 2/3. 3. Mayor de 2/3.

24. RESPUESTA LINFOPLASMOCITARIA. (0).

1. Escasa. 2. Moderada. 3. Marcada.

25. LESIONES ASOCIADAS A MARGENES. (0).

1. Carcinoma in situ. 2. Displasia. 3. Metaplasia. 4. Normal.

26. MODO DE INFILTRACION. (0).

1. Borde neto. 2. Borde mal definido. 3. Difuso.

27. GRADO DE INFILTRACION. (0).

1. Microcarcinoma. 2. Infiltración glandular.
3. Pericondrio. 4. Cartílago

28. INVASION VASCULAR. (0).

0. No hay invasión. 1. Invasión linfática. 2. Invasión vascular.
3. Invasión vásculo-linfática. 4. NS-NC.

29. ADENOPATIAS METASTASICAS. (0).

1. Sí. 2. No.

30. NUMERO DE ADENOPATIAS METASTASICAS. (00).

31. NUMERO DE GANGLIOS OBTENIDOS EN LA INTERVENCION QUIRURGICA. (00).

32. TIPO DE INVASION DE LAS ADENOPATIAS METASTASICAS. (0).

0. No hay invasión. 1. Invasión focal.
2. Invasión masiva. 3. Invasión y rotura capsular.

33. TIPO DE REACCION GANGLIONAR. (0).

1. Hiperplasia folicular. 2. Histiocitosis sinusoidal.
3. Hiperplasia folicular e histiocitosis sinusoidal. 4. No hay reacción.

34. INDICE DE DNA. (0,00).

35. INDICE DE PROLIFERACION. (00,0).

36. PROTEINAS NUCLEARES TOTALES. (00,0).

37. PROTEINAS NUCLEARES EN FASE G0/G1. (00,0).

38. PROTEINAS NUCLEARES EN FASE S + G2/M. (00,0).

39. PROTEINAS NUCLEARES EN FASE S. (00,0).

40. PROTEINAS NUCLEARES EN FASE G2/M. (00,0).

41. INDICE DE PROLIFERACION DEL CICLO DIPLOIDE EN TUMOR CON CICLO ANEUPLOIDE. (00,0).

42. PROTEINAS NUCLEARES EN FASE G0/G1 DIPLOIDE EN CICLO ANEUPLOIDE. (00,0).

43. PROTEINAS NUCLEARES EN FASE G2/M DIPLOIDE EN CICLO ANEUPLOIDE. (00,0).

44. PORCENTAJE DE CELULAS PCNA +. (00,0).

10.2. Análisis estadístico de los resultados.

Los resultados del estudio fueron grabados sobre soporte magnético, diseñándose para tal efecto un fichero que recogería los datos del estudio, haciendo uso del SGBD, conocido bajo el nombre de Dbase IV. Una vez grabados los datos y efectuado un control de calidad mediante la técnica de doble entrada, se procedió a efectuar el análisis estadístico, según los siguientes apartados:

- a) Estadística descriptiva.
- b) Análisis univariante (bivariante)
- c) Análisis multivariante.

Los resultados de la estadística descriptiva se expresaron según valores de tendencia central (media, mediana) y de dispersión (desviación estándar).

En el análisis univariante y bivalente se utilizaron los test de Chi-Cuadrado, para analizar dependencia u homogeneidad entre dos variables, o bien, se utilizaron las curvas de supervivencia actuarial, calculadas según el método del producto-límite (Kaplan y Meier, 1958). La prueba del Chi-Cuadrado fue empleada para analizar la asociación entre parámetros clínicos e histológicos y el índice de DNA. Los test para comparar las posibles diferencias estadísticas entre dos o más curvas fueron: Mantel-Cox, Tarone-Ware, Peto-Prentice y Wilcoxon.

Para la comparación de medias muestrales entre variables cuantitativas se utilizaron los siguientes test:

- Prueba de la t: se empleó para comparar dos medias muestrales de variables cuantitativas bioquímicas según el índice de DNA (tumores diploides y aneuploides).
- Coeficiente de correlación de Pearson: se empleó para obtener el grado de relación existente entre dos variables cuantitativas. Tras el análisis se obtiene un número comprendido entre +1 y -1. Se considera que las variables están relacionadas cuando el valor obtenido está próximo a +1 ó -1.

El modelo multivariante elegido para el análisis de la interacción sobre el tiempo de supervivencia de más de un factor pronóstico, fue el modelo de regresión de Cox (Cox, 1972).

Para la realización del análisis estadístico se utilizó el paquete de programas estadístico BMDP (Dixon).

RESULTADOS

1. ANALISIS CITOMETRICO DE PARAMETROS BIOQUIMICOS NUCLEARES.

1.1. Análisis del contenido de DNA: ploidía nuclear.

De los 163 tumores del estudio, fue posible analizar el contenido nuclear de DNA en 144 (88.4%). El resto de muestras no presentaron picos reconocibles de DNA o el CV del pico G0 fue superior al 10%.

El 65.3% de los tumores fueron diploides y el 34.7%, aneuploides, no habiéndose observado ningún tumor multiploide. La relativa abundancia de tumores diploides hizo que el índice de DNA medio de la serie completa fuera relativamente bajo, 1.21 ± 0.35 . Como cabía esperar, cuando se consideró exclusivamente el grupo de tumores aneuploides, el índice de DNA aumentó significativamente hasta 1.63 ± 0.31 , con un rango de 1.17 a 2.48.

Como muestra la **Figura 9**, la distribución de los valores individuales de índice de DNA en los tumores aneuploides, aunque heterogénea, resultó ser bimodal, con un 68% de los casos formando una amplia gaussiana centrada alrededor del índice 1.50 correspondiente al tumor triploide, mientras que un 18% de los tumores aneuploides se agrupó estrechamente en torno a un índice modal de DNA de 1.85, muy ligeramente inferior al índice de DNA del tumor tetraploide.

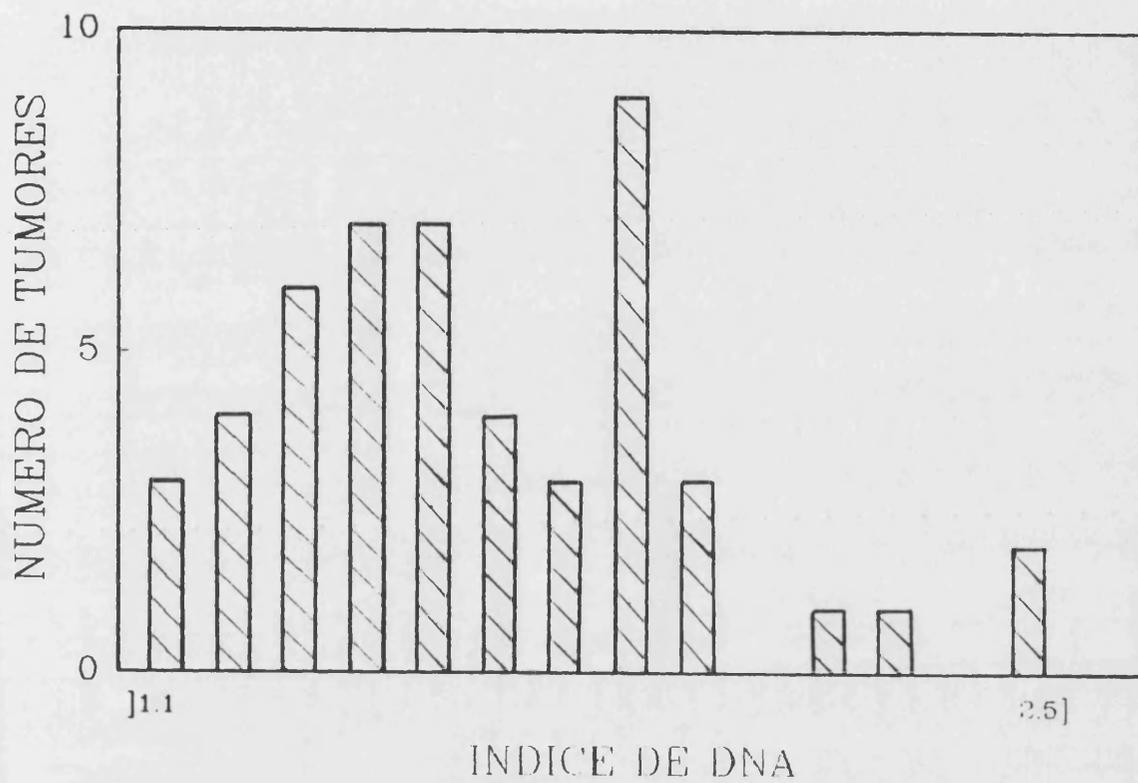


Figura 9. Distribución de los valores individuales del índice de DNA en los tumores aneuploides. Cada barra representa un intervalo de 0.1.

1.2. Análisis del contenido de DNA: índice de proliferación.

Además de la información inmediata con respecto a la ploidía, el análisis por citometría de flujo del contenido de DNA en núcleos individuales permite estimar la capacidad proliferativa potencial de la población tumoral, mediante el cómputo del porcentaje de núcleos que se encuentran en las fases S+G2+M del ciclo, parámetro conocido como índice de proliferación.

El índice de proliferación pudo ser calculado en el 88.2% de la serie válida total. En los tumores diploides, este índice se calculó para el 100% de los casos, mientras que en el 34% de los tumores aneuploides, fue imposible calcularlo, debido a una excesiva superposición de los ciclos diploide y aneuploide del mismo tumor.

El índice de proliferación medio fue 25.84 ± 12.84 , que correspondió a una distribución heterogénea de los valores individuales, como muestra la **Figura 10**. La separación entre tumores diploides y aneuploides no indujo variaciones significativas en el índice de proliferación medio, que fue de 25.48 ± 13.21 en los tumores diploides y de 26.84 ± 11.83 en los aneuploides (n.s., $p > 0.05$). Sin embargo, la heterogeneidad de la distribución de los valores individuales fue mayor en los tumores aneuploides, como indica la **Figura 10**. Dada la heterogénea distribución presentada por el índice de DNA en los tumores aneuploides, se analizó la posible correlación entre ambos índices, no habiéndose encontrado, sin embargo, ninguna correlación estadísticamente significativa (**Tabla 2**).

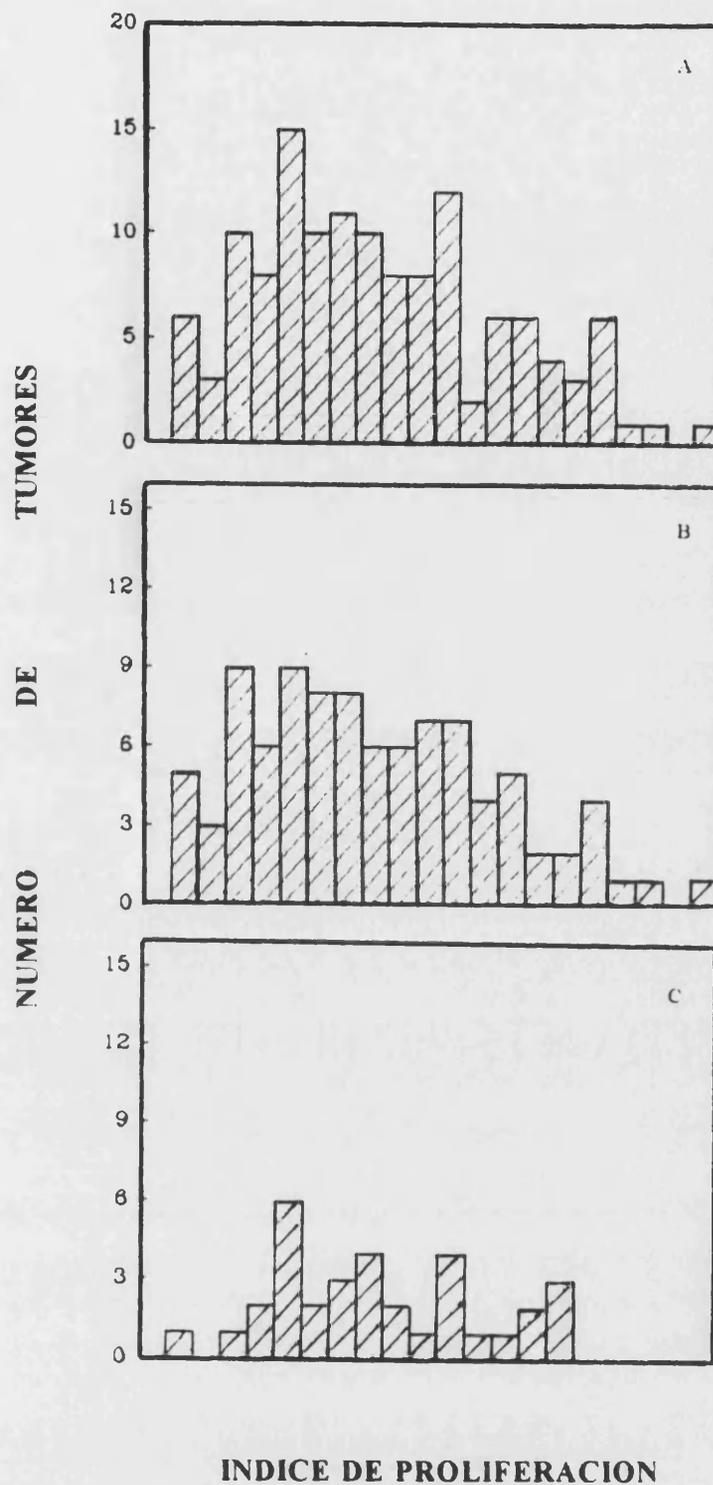


Figura 10. Distribución del índice de proliferación en la serie total (A); serie diploide (B); serie aneuploide (C).

1.3. Análisis por citometría de flujo del contenido en proteínas nucleares: relación con la ploidía nuclear y el índice de DNA.

La tinción con FITC permite evaluar el contenido total en proteínas en núcleos individuales en suspensión, mediante la reacción covalente del fluorocromo con los grupos amino libres de algunos residuos aminoácidos.

La **Figura 11** muestra la distribución del contenido en proteínas en los núcleos individuales de los tumores analizados. Este parámetro bioquímico pudo ser analizado en el 99% de los tumores diploides y en el 96% de los aneuploides. Como puede observarse, la distribución es marcadamente heterogénea, con un valor, expresado en unidades arbitrarias de fluorescencia, de 19.76 ± 12.48 . Dentro del grupo total de tumores analizados, no se observó correlación significativa entre el contenido medio de proteínas nucleares y el índice de DNA (**Tabla 2**). Consistente con este dato, la separación de los tumores en diploides y aneuploides mostró un grado similar de heterogeneidad en el contenido proteico nuclear individual en ambos grupos, así como un valor medio que no difirió significativamente (18.40 ± 11.57 en el grupo diploide; 22.40 ± 13.83 en el grupo aneuploide, $p > 0.05$).

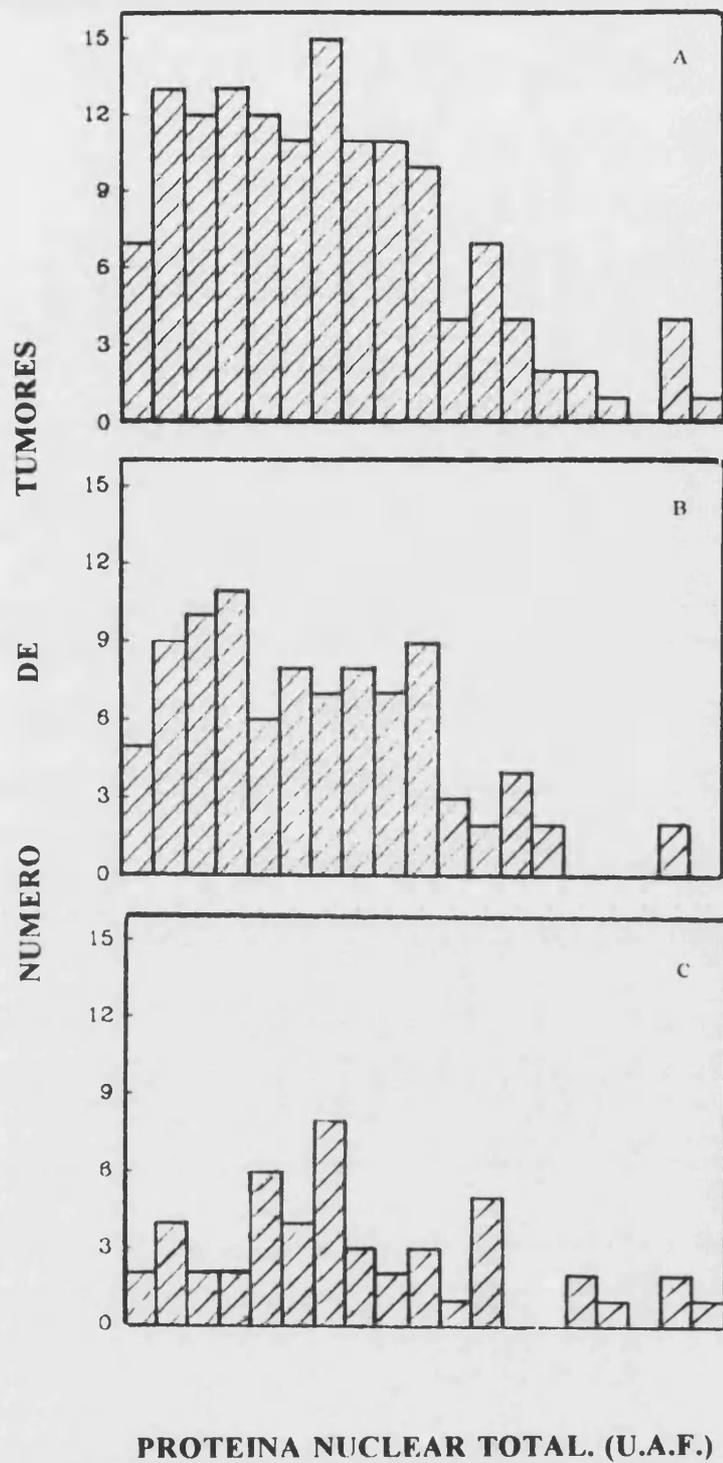


Figura 11. Distribución del contenido en proteínas en los núcleos individuales en la serie total (A); serie diploide (B); serie aneuploide (C).

1.4. Relación entre proteínas nucleares y contenido en DNA: Distribución de proteínas nucleares en el ciclo celular.

Una de las principales ventajas del análisis por citometría de flujo es su capacidad para determinar la expresión de un parámetro biológico en subpoblaciones definidas por la expresión de otro. El marcaje simultáneo de DNA y proteínas nucleares permite el análisis del contenido de proteínas en núcleos de células situadas en diferentes fases del ciclo celular, como se indica en Material y Métodos.

La **Figura 12** muestra la distribución de las proteínas nucleares en los núcleos en fase G0/G1 diploide (A) y aneuploide (B). En ambos casos, la distribución resultó más homogénea que la de las proteínas en el total de las fases, como cabría esperar por la mayor restricción en la población analizada. El contenido en proteínas fue, además, significativamente menor en la fase G0 diploide que en la aneuploide (13.38 ± 9.52 frente a 20.21 ± 14.96 , $p = 0.005$). La **Figura 13** presenta la distribución de proteínas en los núcleos correspondientes a las fases proliferativas S+G2+M en los núcleos de las poblaciones diploides (A) y de las aneuploides (B). La determinación de las proteínas en dicho conjunto de fases del ciclo no fue posible cuando se produjo un solapamiento significativo entre los ciclos diploide y aneuploide coexistentes en algunos tumores. De esta forma, el análisis fue posible en el 99% de los ciclos diploides y en el 66% de los aneuploides. El valor medio de ambas distribuciones fue significativamente diferente, menor en las fases S+G2+M diploides que en las aneuploides (25.80 ± 15.14 frente a 35.13 ± 12.89 , $p = 0.002$).

La distribución de los niveles de proteínas nucleares en las fases proliferativas diploides y aneuploides presentó, además, una marcada heterogeneidad, que podría depender del amplio rango de contenido en DNA en los núcleos seleccionados para el análisis. Por ello, se determinó por separado el nivel de proteínas en núcleos situados exactamente en la mitad de la fase S y en el punto medio de la región en la que se sitúan las fases G2 y M de los ciclos diploides y aneuploides. La **Figura 14** indica que los niveles de proteína

en el punto medio de la fase S, aún presentando heterogeneidad, fueron significativamente mayores en la fase S aneuploide que en la diploide (diploides: 29.23 ± 14.57 ; aneuploides: 41.57 ± 14.55 , $p = 0.0001$). Igualmente, la **Figura 15** muestra que el nivel de proteínas en las fases G2+M fue significativamente mayor en los ciclos aneuploides que en los diploides (diploides: 29.93 ± 16.58 ; aneuploides: 42.66 ± 13.56 , $p < 0.0001$).

Cabe destacar que, a pesar de la extrema restricción en la población de núcleos seleccionados por su contenido de DNA en estas últimas medidas, la dispersión en los niveles de proteínas fue siempre amplia, sugiriendo que este parámetro bioquímico es intrínsecamente heterogéneo en los núcleos que pertenecen a células en fase proliferativa.

Los resultados obtenidos muestran, en todos los casos, que los niveles de proteínas nucleares fueron más altos en los núcleos aneuploides que en los diploides. Por razón del método analítico empleado, todos los picos y ciclos aneuploides de la serie se consideran hiperdiploides, convención que acarrea un mínimo error, puesto que, estadísticamente, sólo un 5% de los carcinomas laríngeos son hipodiploides (Barona, 1991). Por ello, en nuestro estudio, la comparación entre aneuploides-hiperdiploides y diploides implica siempre una diferencia positiva en el contenido de DNA. De esta forma, el mayor contenido de proteínas en las subpoblaciones aneuploides de los núcleos tumorales podría, simplemente, reflejar el mayor contenido en DNA, como se ha demostrado claramente en poblaciones proliferantes estudiadas por citometría de flujo (Darzynkiewicz, 1990).

Para determinar esta posibilidad, se representaron en la **Figura 16(A)** los cocientes proteínas en S / proteínas en G0/G1 y proteínas en G2+M/proteínas en G0/G1, frente al contenido de DNA en tumores diploides y, de forma paralela (**Figura 16(B)**), se representaron los puntos individuales correspondientes al cociente entre las proteínas en el pico G0/G1 aneuploide y las proteínas en el pico G0/G1 diploide del mismo tumor. Por analogía con el concepto de índice de DNA (cociente entre la cantidad de DNA en el pico G0/G1 aneuploide y la cantidad de DNA en el pico G0/G1 diploide), se propone el nombre de "índice de

proteínas" para este cociente. De esta forma se puede observar si el contenido en proteínas de un núcleo G0/G1 aneuploide hiperdiploide es igual o distinto al esperable en un núcleo diploide de igual contenido en DNA.

Los resultados muestran que, en los núcleos diploides, los niveles de proteínas totales se duplican al llegar a la mitad de la fase S y se mantienen constantes desde dicho punto hasta el contenido de DNA correspondiente al de las fases G2 y M. La superposición de los valores correspondientes a los núcleos aneuploides en G0/G1 muestra dos grupos bien diferenciados: en uno de ellos, los valores del cociente se encuentran dentro del rango de variación de los ciclos diploides, mientras que en otro grupo, más abundante, el contenido en proteínas es menor del esperable, en función del contenido de DNA.

El análisis matemático de la distribución de ambas subpoblaciones mostró que en la población de menor cociente, dicho cociente era aproximadamente constante para cualquier valor del contenido en DNA del pico G0 y, por lo tanto, aparentemente independiente del índice de DNA del tumor. En la subpoblación de mayor cociente, éste presentó una débil correlación con el contenido en DNA del pico G0 ($r = 0.720$).

Dada la aparente clasificación de los tumores aneuploides en dos grupos distintos según el cociente empleado, es decir, según un parámetro relacionado directamente con la concentración de proteínas en los núcleos en fase G0/G1, se planteó el estudiar la distribución de los principales parámetros clínicos, histológicos y citométricos tumorales en cada subpoblación. De esta forma, y aunque el escaso número de datos en la subpoblación de mayor cociente impedía el análisis estadístico riguroso, se intentó obtener información acerca del hipotético valor predictivo de la anterior observación citométrica.

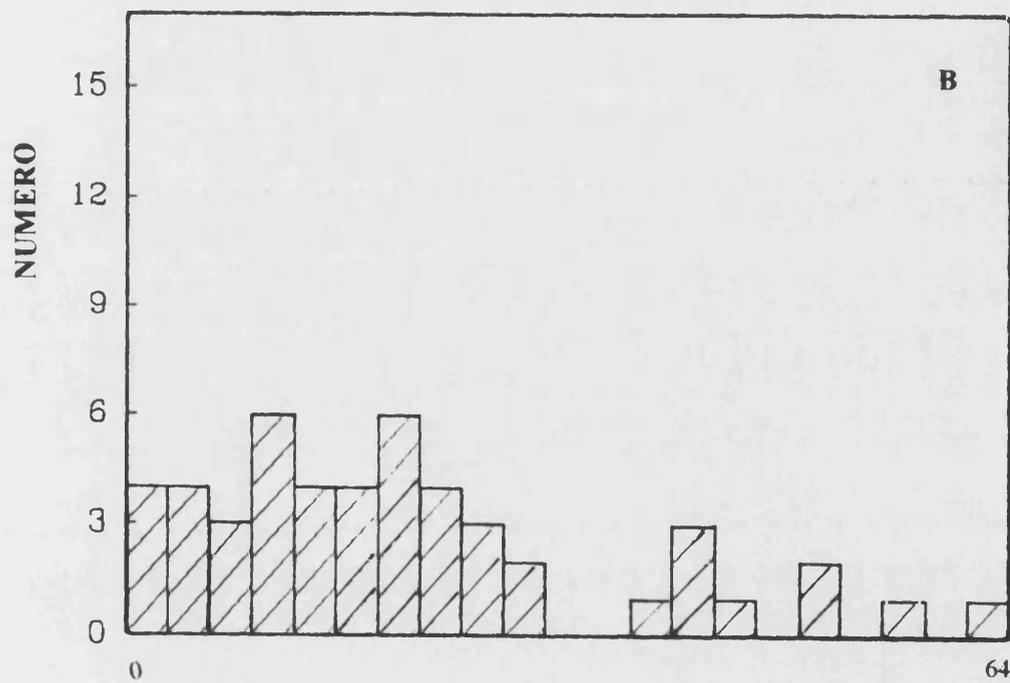
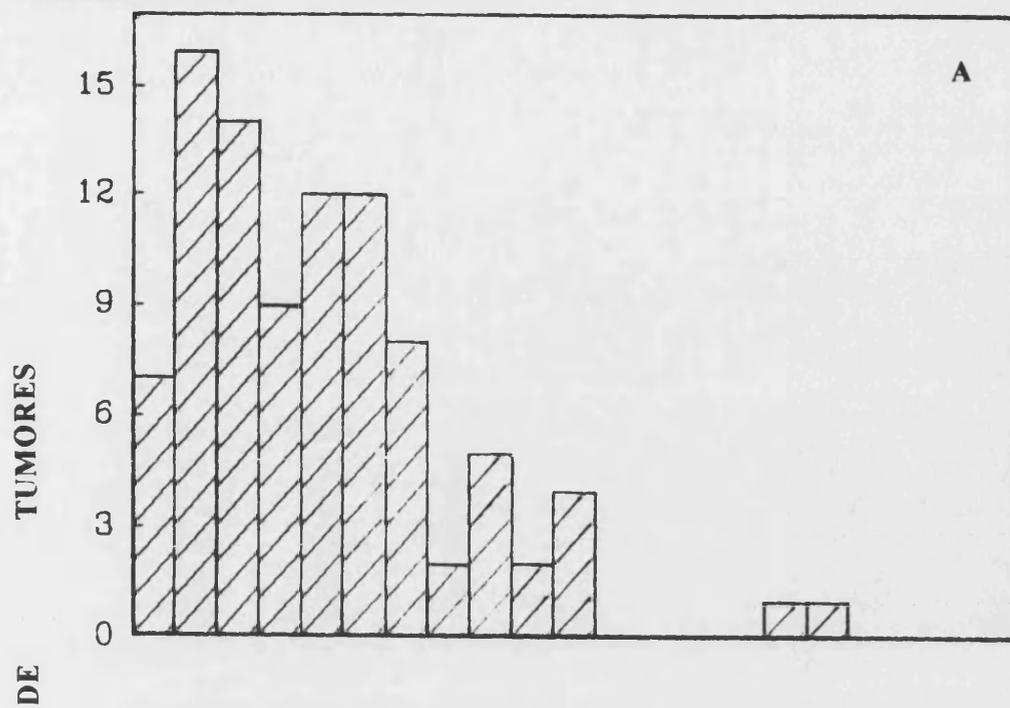
Se compararon entre ambos subgrupos los siguientes parámetros clínicos: localización del tumor, grado de T, grado de N, estadio T.N.M., estado actual de supervivencia; así como los parámetros histológicos: ulceración, patrón de crecimiento, infiltración de márgenes quirúrgicos, estructura tumoral, polimorfismo celular, número de mitosis, grado de diferenciación y los parámetros citométricos: índice de proliferación e índice de PCNA.

No presentaron diferencias significativas entre ambos grupos los parámetros clínicos: grado de T, grado de N, estado actual de supervivencia; los parámetros histológicos: patrón de crecimiento y estructura tumoral ni ninguno de los parámetros citométricos comparados.

Entre los parámetros clínicos, la localización tumoral mostró diferencia significativa entre ambos grupos (**Figura 17(A)**). Así en la población de mayor cociente, el porcentaje relativo de tumores supraglóticos fue mayor que en la población de menor cociente. La población de mayor cociente presentó, además, un mayor porcentaje de tumores de máximo grado de T que la población de tumores de menor cociente (**Figura 17(B)**).

Entre los parámetros histológicos, el porcentaje de tumores con ulceración fue (significativamente) mayor en la población de mayor cociente, como muestra la **Figura 17(C)**. Asimismo, la población de mayor cociente mostró una mayor tendencia que la población de menor cociente hacia las formas de mayor polimorfismo celular (**Figura 17(D)**). El número de mitosis tendió a ser más elevado entre los tumores de mayor cociente que entre los tumores de cociente menor (**Figura 17(E)**). Así, cabe destacar que ninguno de los tumores de la población de mayor cociente presentó escaso número de mitosis. El grado de diferenciación, por su parte, tendió a ser escaso con más frecuencia entre los tumores de cociente mayor que entre los de cociente menor (**Figura 17(F)**).

Los anteriores resultados sugieren la posibilidad de que las subpoblaciones definidas por el cociente de proteínas G0/G1 aneuploide divididas por proteínas G0/G1 diploide representen subpoblaciones tumorales con distintas características clínicas e histológicas.



PROTEINA NUCLEAR EN FASE G0/G1. (U.A.F.)

Figura 12. Distribución de las proteínas en los núcleos en fase G0/G1 en poblaciones diploides **(A)** y aneuploides **(B)**.

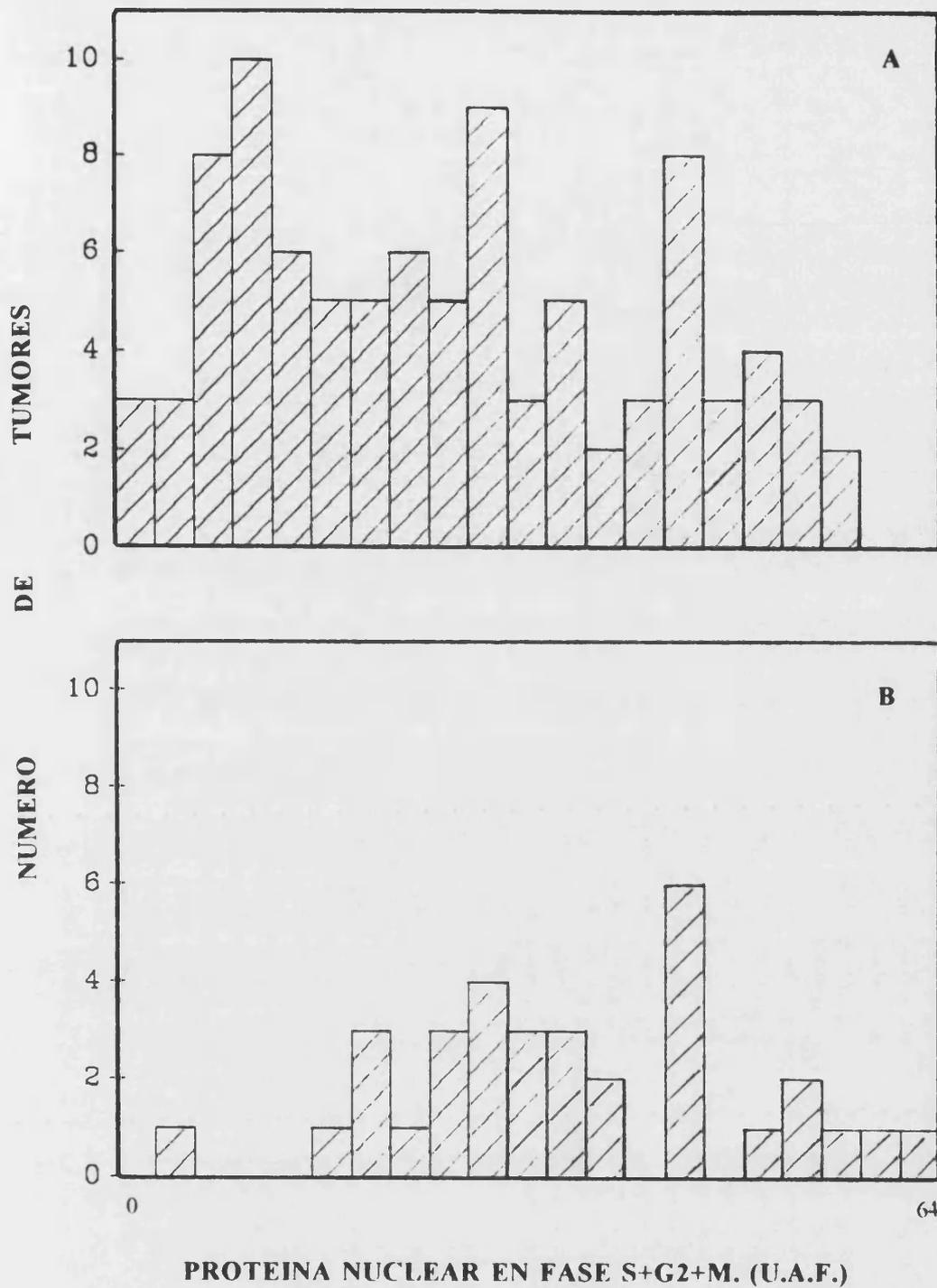


Figura 13. Distribución de las proteínas en los núcleos correspondientes a las fases proliferativas S+G2+M en las poblaciones diploides (A) y aneuploides (B).

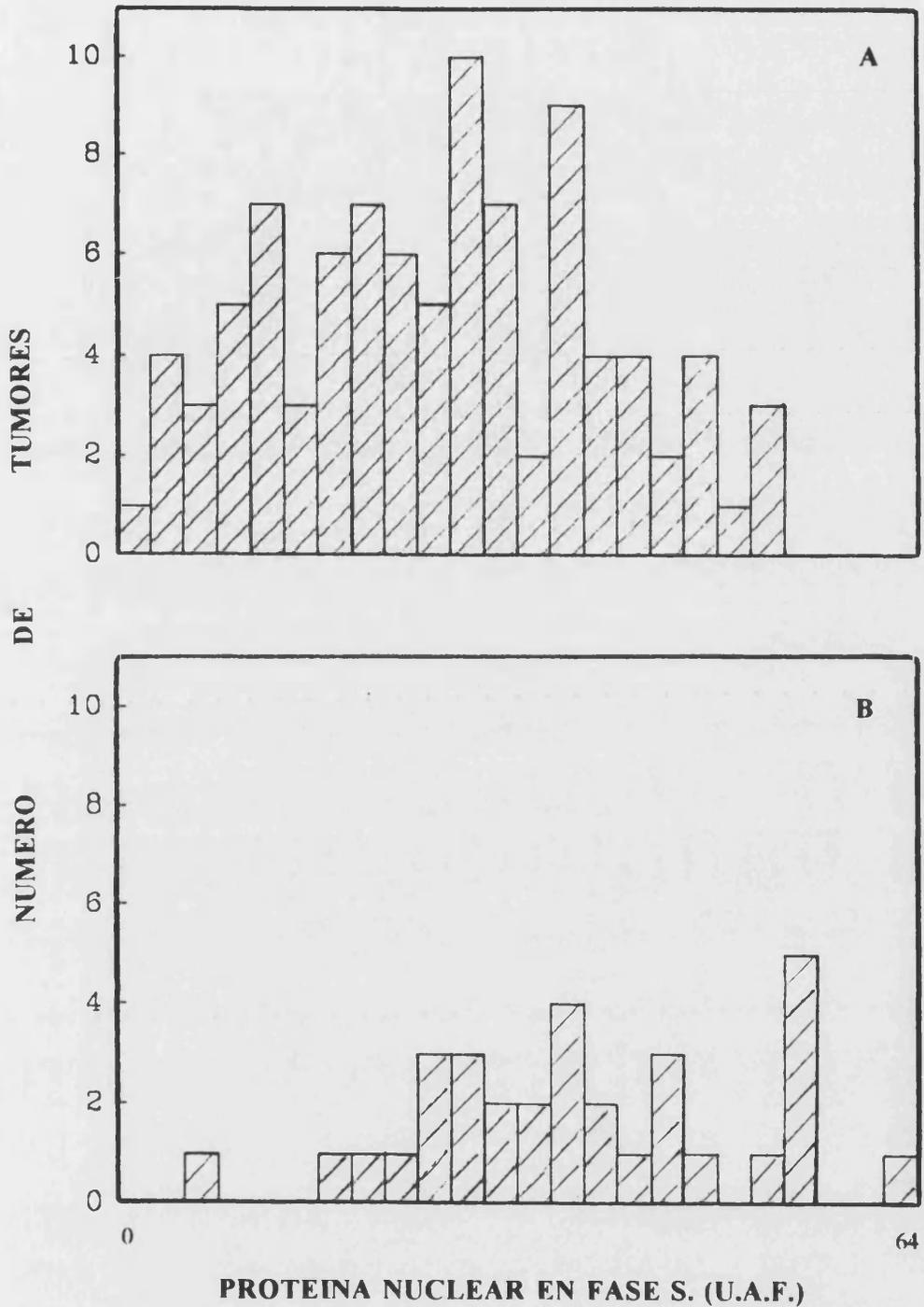


Figura 14. Distribución de las proteínas en núcleos en fase S en poblaciones diploides (A) y aneuploides (B).

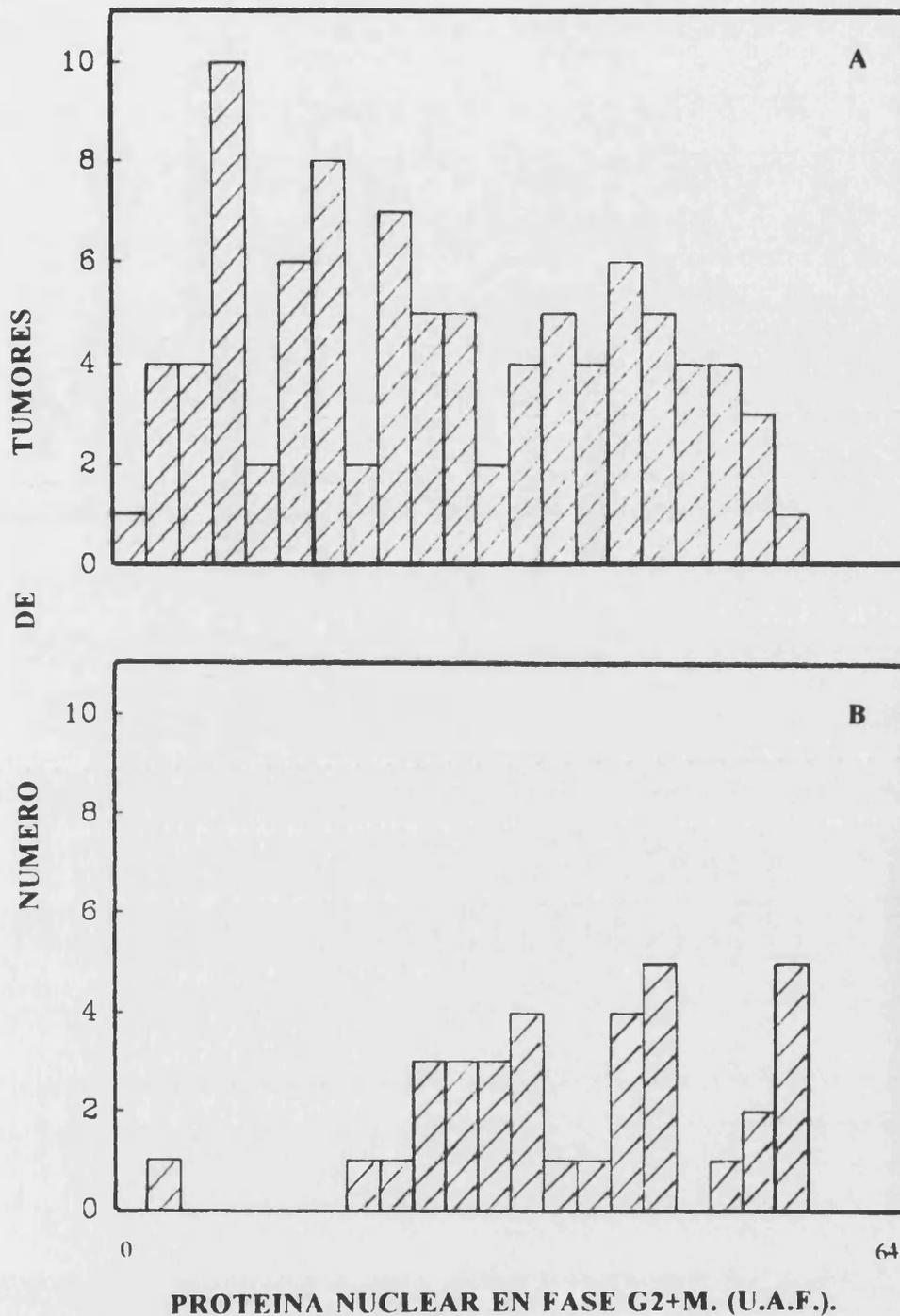


Figura 15. Distribución de las proteínas en los núcleos en las fases G2+M en poblaciones diploides (A) y aneuploides (B).

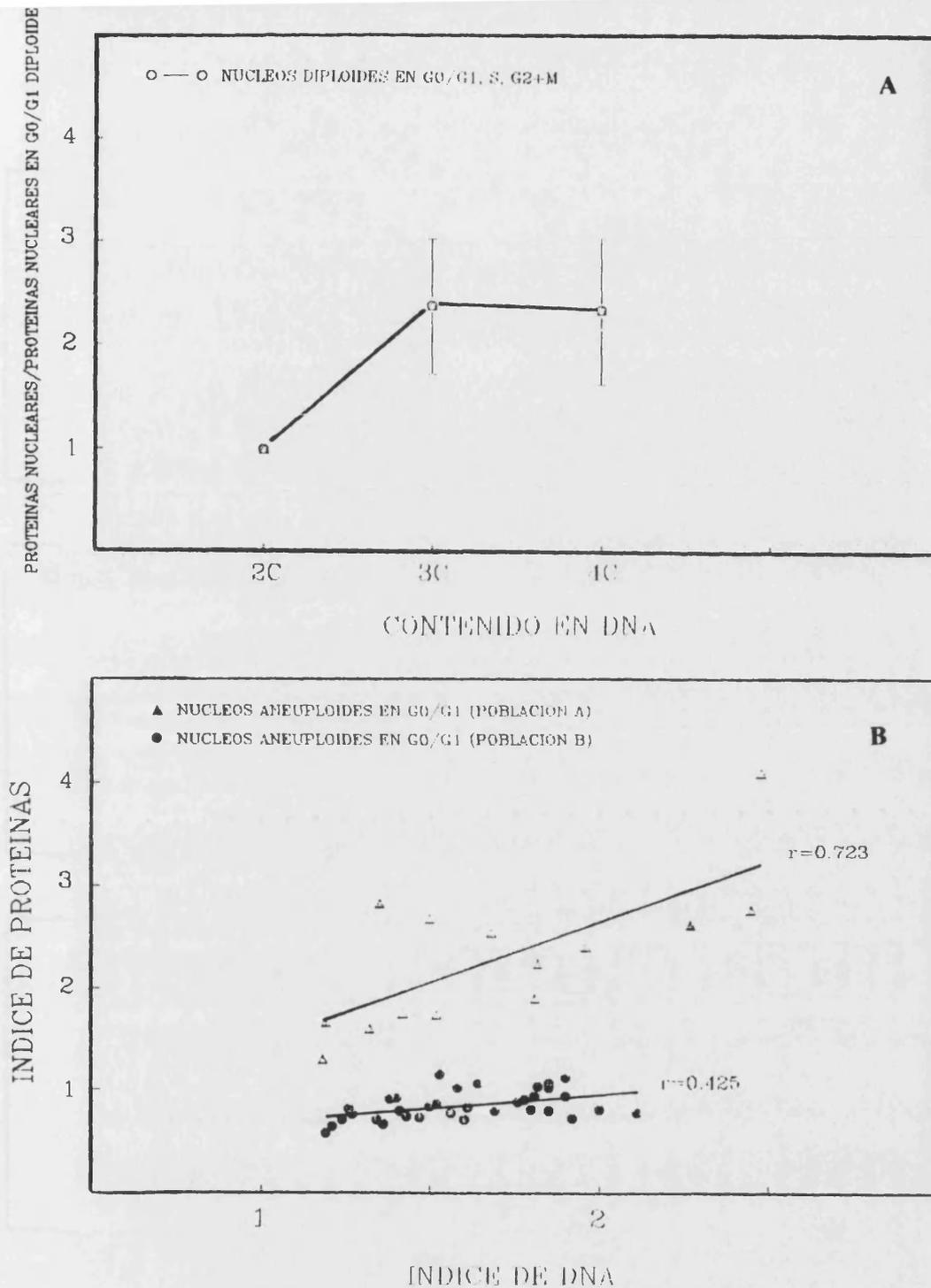


Figura 16. (A): Representación del cociente proteínas nucleares/proteínas nucleares en G0/G1 diploide frente al contenido en DNA en tumores diploides. Los símbolos representan la media \pm d.s. de todos los tumores diploides de la serie ($n = 94$). (B): Correlación entre el índice de proteínas y el índice de DNA en tumores aneuploides. Son evidentes dos poblaciones (A y B), con diferentes grados de correlación.

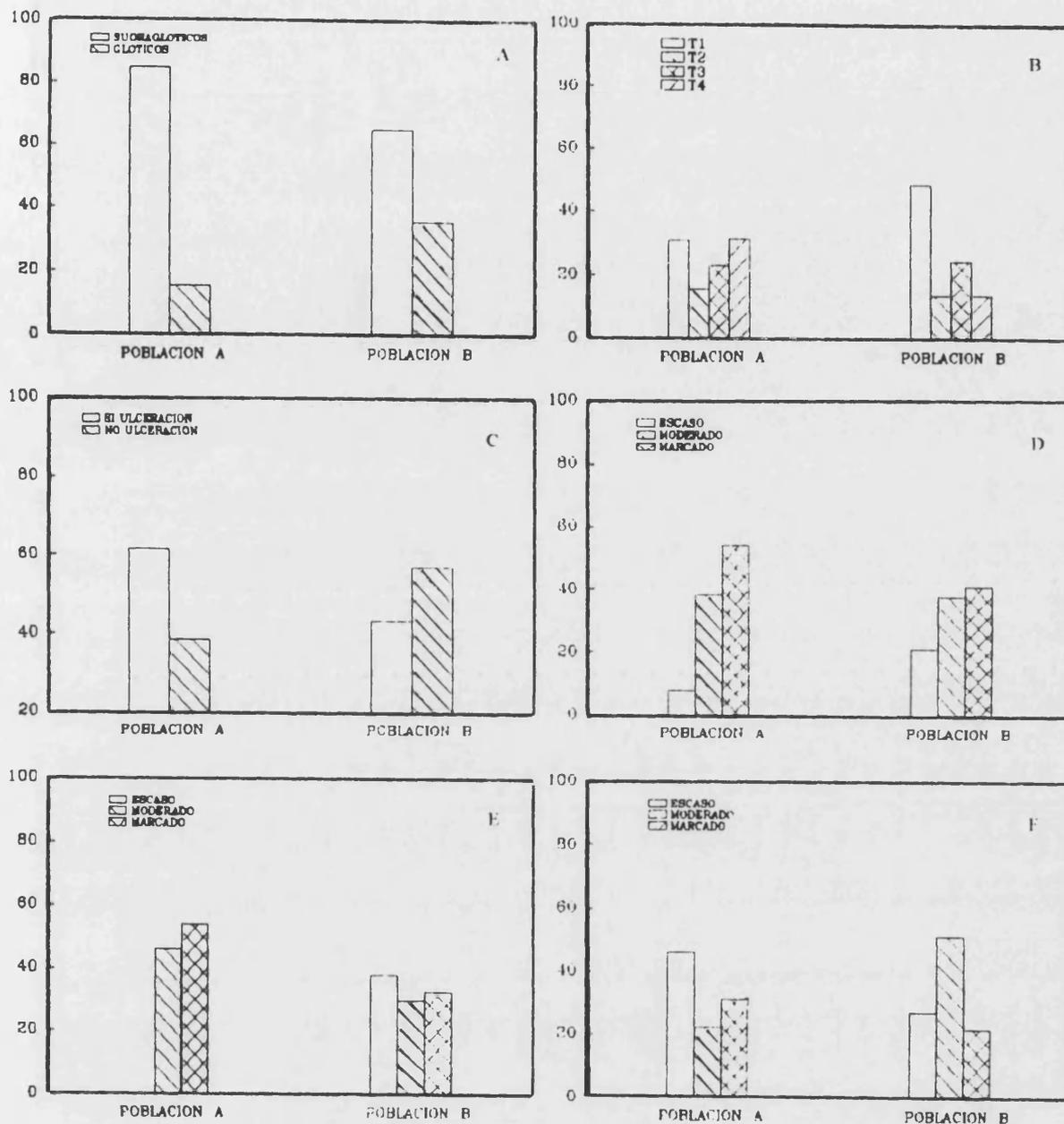


Figura 17 (A-F): Distribución de parámetros clínicos e histológicos en las subpoblaciones A y B de tumores aneuploides definidas en la figura 16. (A: localización; B: grado de T; C: ulceración macroscópica; D: polimorfismo celular; E: número de mitosis; F: grado de diferenciación).

1.5. Correlación entre los contenidos de proteína en núcleos en diferentes fases del ciclo celular.

El análisis estadístico correspondiente mostró una fuerte correlación positiva entre los niveles de proteína de núcleos en diferentes fases del ciclo celular, tanto en la serie total (**Tabla 2**), como en las series separadas de tumores diploides (**Tabla 3**) y aneuploides (**Tabla 4**). Las correlaciones más significativas se dieron en las series total y diploide, con unos niveles de significación muy semejantes en ambas, al comparar los mismos parámetros.

En la serie total (**Tabla 2**), cabe destacar las correlaciones máximas observadas al comparar las proteínas en S+G2+M con G2+M; S con G2+M; S con S+G2+M; S con el ciclo total. Un nivel algo menor de significación correspondió a las comparaciones de las proteínas en todo el ciclo con las proteínas en G0, con G2 y con S. El menor nivel para la correlación significativa se dió al comparar las proteínas en G0 con S+G2+M; con G2 y con S.

En la serie diploide (**Tabla 3**), el nivel máximo de significación correspondió también a la comparación de las proteínas en S+G2+M con G2+M, con muy buenos niveles para las correlaciones S con S+G2+M y S con G2+M. En esta serie alcanzó un alto nivel de significación la correlación de las proteínas nucleares totales con las proteínas en G0; en S+G2+M; y en G2+M.

En la serie aneuploide (**Tabla 4**), los niveles de significación en las correlaciones fueron algo más bajos que en las series total y diploide, siendo, de nuevo, la correlación más significativa la observada entre las proteínas en S+G2+M con G2+M, con un grado algo menor para S con S+G2+M y con G2+M y para la comparación de las proteínas en todo el ciclo con las de la fase G0.

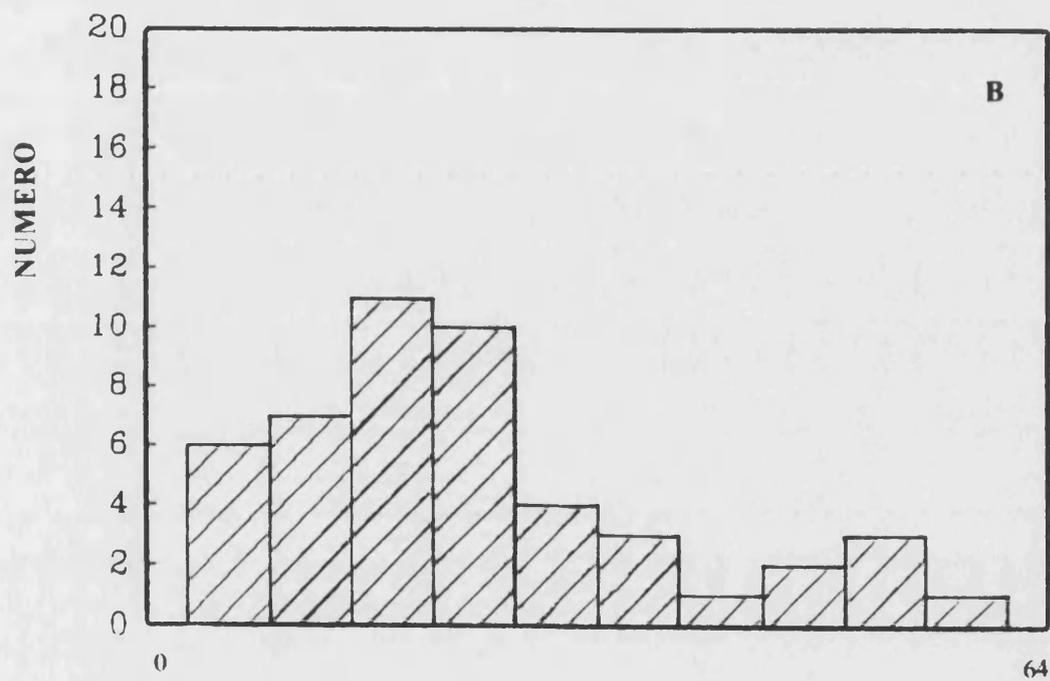
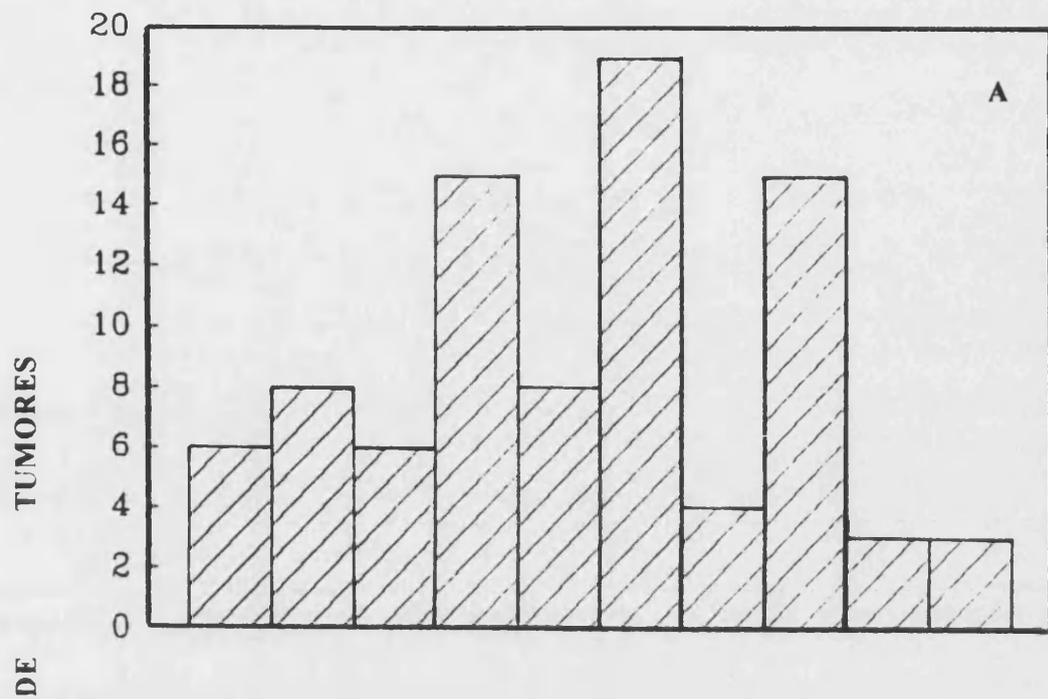
1.6. Determinación inmunohistoquímica de la expresión de PCNA: Relación con la ploidía nuclear e índice de DNA.

La utilización de anticuerpos monoclonales permite la detección de proteínas nucleares específicas, de carácter funcional. El uso de técnicas inmunohistoquímicas de detección permite correlacionar la cantidad e intensidad de expresión de determinadas proteínas con las características morfológicas de las células individuales y los tejidos donde se expresan. El análisis complementario por citometría de flujo aporta la posibilidad de establecer, además, la correlación con parámetros bioquímicos determinados en poblaciones de núcleos individuales y la información que de ellos deriva.

El PCNA es una proteína funcional claramente relacionada con la proliferación celular y que, en algunos casos, puede tener valor pronóstico de la malignidad tumoral (Calabuig, 1993). Su determinación se puede efectuar convenientemente en secciones de tejido parafinado, por lo que se ha incluido en el presente estudio, con el fin de evaluar el papel pronóstico de una proteína de función específica.

La **Figura 18** muestra el resultado del análisis del porcentaje de expresión de PCNA en secciones histológicas de los carcinomas laríngeos parafinados. El 94% de los casos de la serie total presentó células con expresión nuclear de PCNA. Al dividir la serie según su ploidía, el 92% de los tumores diploides y el 96% de los aneuploides resultaron positivos para dicha molécula.

En cuanto al porcentaje de células tumorales que expresaron el PCNA fue del 41.89 ± 27.87 en la serie completa. Cuando se separaron las series diploide y aneuploide no se observó diferencia significativa entre ambas: la serie diploide presentó un porcentaje de positividad del 50.35 ± 25.94 y la serie aneuploide, del 45.83 ± 25.21 .



DISTRIBUCION DE % DE EXPRESION DE PCNA.

Figura 18. Distribución del porcentaje de expresión de PCNA en poblaciones diploides **(A)** y aneuploides **(B)**.

1.7. Relación de la expresión de PCNA con el contenido de proteínas nucleares totales.

Como se indica en las **Tablas 2, 3 y 4**, no se observó correlación alguna entre el porcentaje de células que expresaban el PCNA, analizado por técnica inmunohistoquímica, y el nivel de proteína total en los núcleos aislados de las mismas muestras, analizados por citometría de flujo, tanto cuando se consideran los núcleos de forma independiente a su posición en el ciclo celular, como cuando se diferencian las distintas fases del ciclo, en función del contenido en DNA, como, por otra parte, cabría esperar dada la ausencia de correlación entre expresión de PCNA e índice de DNA o entre PCNA e índice de proliferación en la serie total.

TABLA 2. CORRELACIONES ENTRE PARAMETROS BIOQUIMICOS EN LA SERIE TOTAL.

	Indice de DNA	Indice de proliferación	Proteína nuclear total	Proteína en fase G0	Proteína en fase S+G2+M	Proteína en fase S	Proteína en fase G2M
Indice de proliferación	0.056						
Proteína nuclear total	0.145	0.351					
Proteína en fase G0/G1	0.269	0.295	0.919*				
Proteína en fase S+G2+M	0.278	0.325	0.932*	0.881*			
Proteína en fase S	0.331	0.217	0.904*	0.859*	0.931*		
Proteína en fase G2M	0.324	0.288	0.914*	0.866*	0.953*	0.937*	
PCNA	0.245	0.180	-0.275	-0.296	-0.206	-0.254	-0.223

TABLA 3. CORRELACIONES ENTRE PARAMETROS BIOQUIMICOS EN LA SERIE DIPLOIDE.

	Indice de proliferación	Proteína nuclear total	Proteína en fase G0/G1	PSProteína en fase S+G2+M	Proteína en fase S	Proteína en fase G2M
Proteína nuclear total	0.444					
Proteína en fase G0/G1	0.352	0.948*				
Proteína en fase S+G2+M	0.364	0.936*	0.908*			
Proteína en fase S	0.304	0.905*	0.907*	0.939*		
Proteína en fase G2M	0.322	0.915*	0.899*	0.950*	0.938*	
PCNA	-0.028	-0.143	-0.163	-0.160	-0.149	-0.179

TABLA 4. CORRELACIONES ENTRE PARAMETROS BIOQUIMICOS EN LA SERIE ANEUPLOIDE.

	Indice de proliferacion	Proteina nuclear total	Proteína en fase G0/G1	Proteína en fase S+G2+M	Proteína en fase S	Proteína en fase G2M
Proteina nuclear total	0.090					
Proteina en fase G0/G1	0.198	0.841*				
Proteina en fase S+G2+M	0.184	0.721	0.679			
Proteina en fase S	-0.103	0.667	0.557	0.859*		
Proteina en fase G2M	0.165	0.683	0.697	0.901*	0.853*	
PCNA	0.019	0.013	-0.046	-0.012	-0.022	0.061

2. CORRELACION ENTRE PARAMETROS BIOQUIMICOS NUCLEARES Y PARAMETROS HISTOLOGICOS TUMORALES.

Tras determinar el grado de correlación entre los distintos parámetros bioquímicos nucleares analizados por citometría de flujo, se procedió al estudio de la posible correlación entre dichos parámetros bioquímicos y los parámetros histológicos enumerados en el apartado de Material y Métodos, y determinados mediante análisis microscópico de secciones inmediatamente anteriores o posteriores a las utilizadas para la preparación de suspensiones nucleares.

El correspondiente análisis estadístico, sin embargo, no mostró correlación estadística significativa alguna entre los parámetros bioquímicos de los núcleos aislados y los parámetros histológicos de las muestras tumorales de las que procedían aquellos, cuando se consideró la serie total.

3. CORRELACION ENTRE PARAMETROS BIOQUIMICOS NUCLEARES Y PARAMETROS CLINICOS TUMORALES.

Tras el estudio de la correlación entre parámetros bioquímicos nucleares y parámetros histológicos, se llevó a cabo un análisis estadístico para determinar la posible correlación entre los parámetros bioquímicos nucleares y los parámetros clínicos relativos al comportamiento del tumor en los pacientes del estudio, enumerados en el apartado de Material y Métodos.

El análisis estadístico de los datos no mostró correlación significativa alguna entre los parámetros bioquímicos nucleares, determinados por citometría de flujo, y los parámetros clínicos tumorales en los pacientes de la serie total.

4. ASOCIACION DE PARAMETROS HISTOLOGICOS CON EL INDICE DE DNA: DISTRIBUCION DE PARAMETROS HISTOLOGICOS EN LOS TUMORES DIPLOIDES Y ANEUPLOIDES.

Entre los parámetros bioquímicos nucleares analizables por citometría de flujo, el más frecuentemente estudiado ha sido el índice de DNA. Este parámetro permite, además, establecer dos categorías de tumores, diploides y aneuploides, que responden a un fenómeno biológico concreto, la ganancia o pérdida de DNA, el cual puede, a su vez, determinar el comportamiento biológico de la población tumoral. Por dicha razón, se realizó un estudio estadístico encaminado a comparar parámetros histológicos y patológicos de interés entre tumores diploides y aneuploides, estableciendo así la posible asociación entre el índice de DNA y los parámetros de comportamiento tumoral.

4.1 Localización del tumor frente a índice de DNA

En la serie total, el 63.2% de los tumores fueron de localización supraglótica y sólo el 36.8% de localización glótica.

Como muestra la **Figura 19(A)**, entre los supraglóticos, el 61.5% fueron diploides y el 38.5% aneuploides. De los glóticos, el 71.7% fueron diploides y el 28.3%, aneuploides. El análisis estadístico mostró que no había diferencias significativas entre ambas distribuciones y con la distribución en la serie total.

La comparación inversa (**Figura 19(B)**) mostró que el 59.6% de los tumores diploides eran supraglóticos y el 40.4%, glóticos, mientras que entre los aneuploides, el 70% presentaban localización supraglótica y el 30% glótica. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre ambas distribuciones y con la distribución de localizaciones en la serie total.

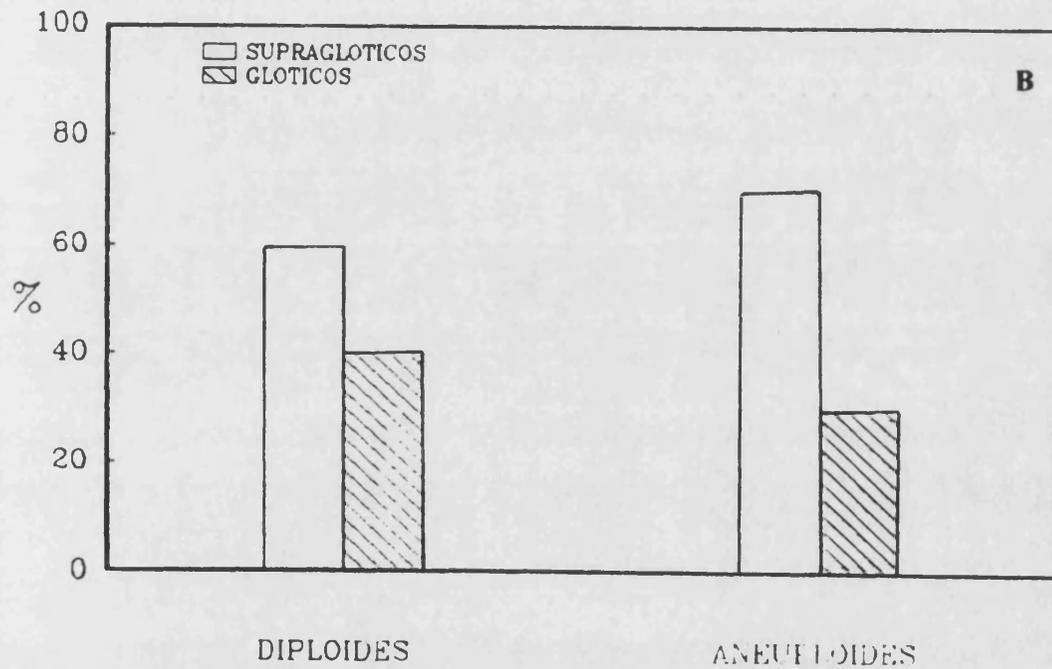
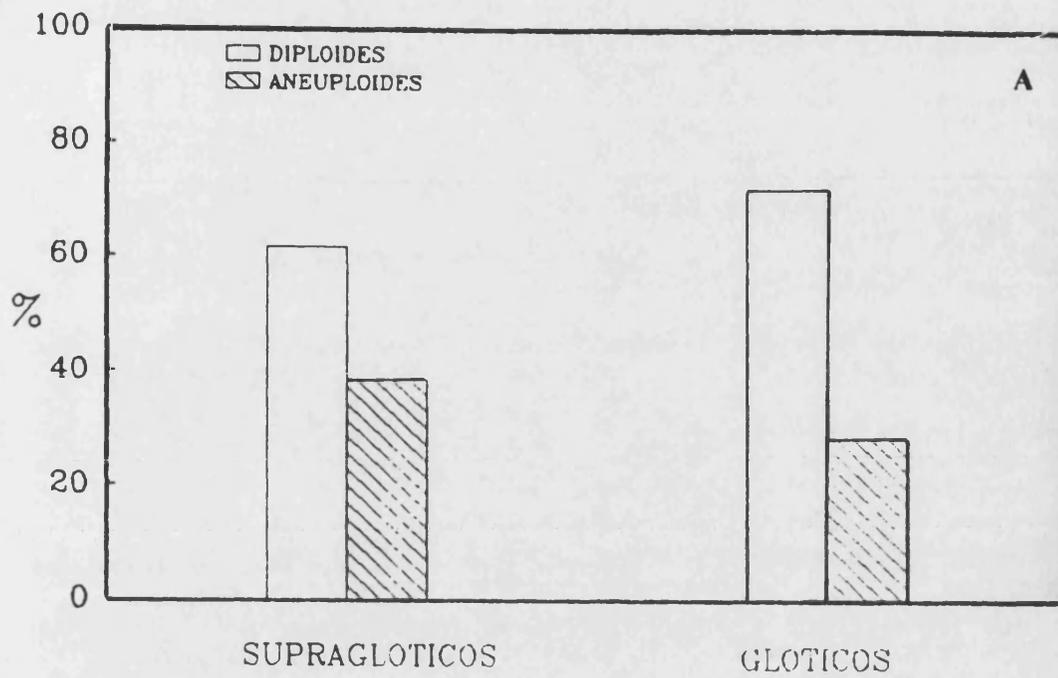


Figura 19. (A): Distribución de la ploidía según la localización del tumor.
(B): Distribución de la localización tumoral en las series diploide y aneuploide.

4.2. Grado de T frente a índice de DNA.

En la serie total, el 47.8% de los tumores correspondieron al grado T1, el 23.9% al grado T2, el 20.7% al grado T3 y el 7.6% al grado T4.

Como se observa en la **Figura 20(A)**, la distribución de tumores diploides y aneuploides fue muy similar en los cuatro grados de T, no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre cada grado y con respecto a la distribución en la serie total.

La comparación inversa mostró que la distribución de los grados de T es similar en las series diploide y aneuploide, sin que existan diferencias estadísticamente significativas entre ambas y con respecto a la serie total. (**Figura 20(B)**).

4.3. Grado de N frente a índice de DNA.

En la serie total, el 82.6% de los tumores presentaron grado N0, el 7.8% grado N1 y el 9.6% grado N2. Por la escasa abundancia de tumores en grado N1 y N2, se agruparon ambas categorías para poder llevar a cabo el posterior análisis estadístico.

La **Figura 21(A)** muestra que la distribución de tumores diploides y aneuploides fue similar en el grupo de grado N0 y en el de grado N1+N2, no existiendo diferencias significativas entre ellos y con respecto a la distribución en la serie total.

Por otra parte, los datos mostrados en la **Figura 21(B)** indican que la distribución del grado de N fue idéntica entre los tumores diploides y aneuploides, sin que existiera, asimismo, diferencia significativa con la distribución global.

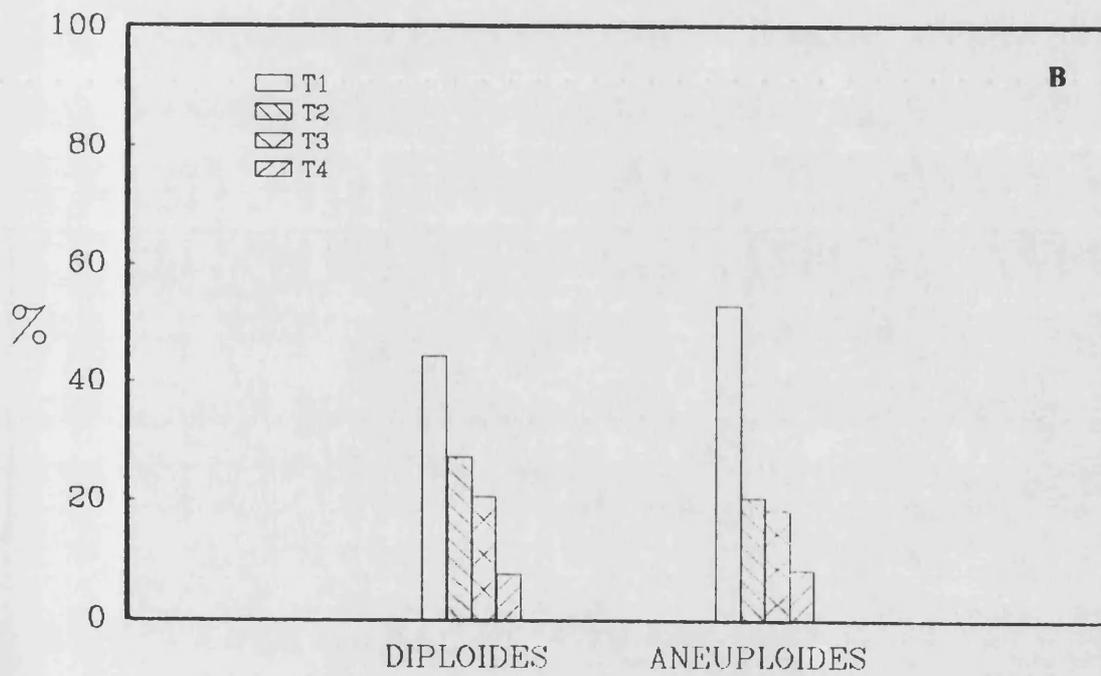
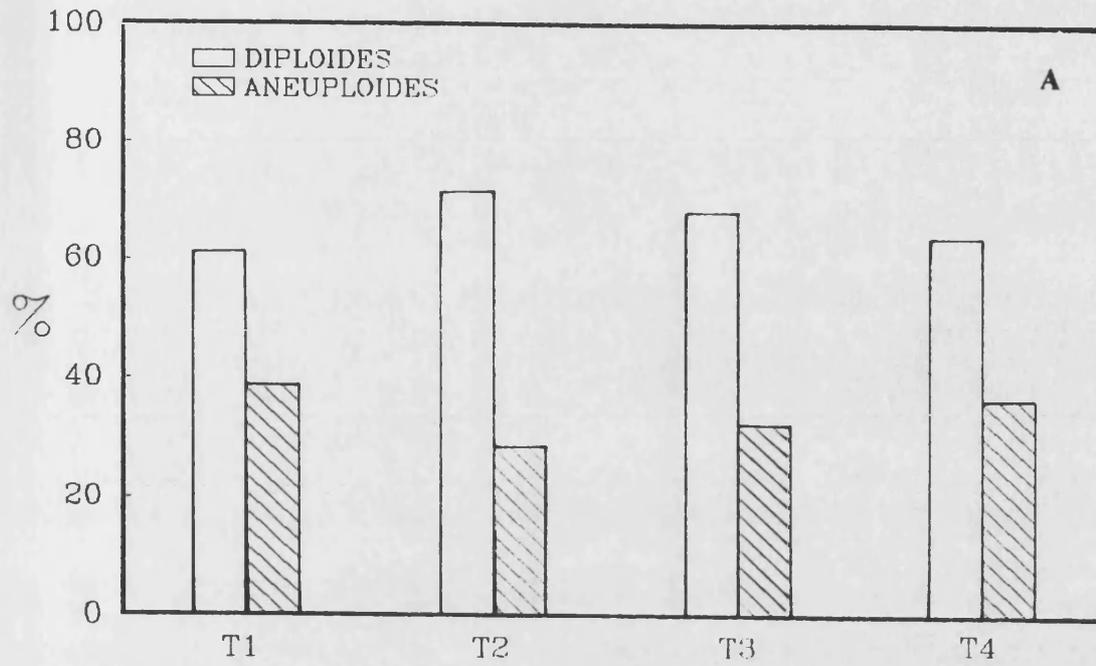


Figura 20. (A): Distribución de la ploidía según el grado de T.
(B): Distribución del grado de T en las series diploide y aneuploide

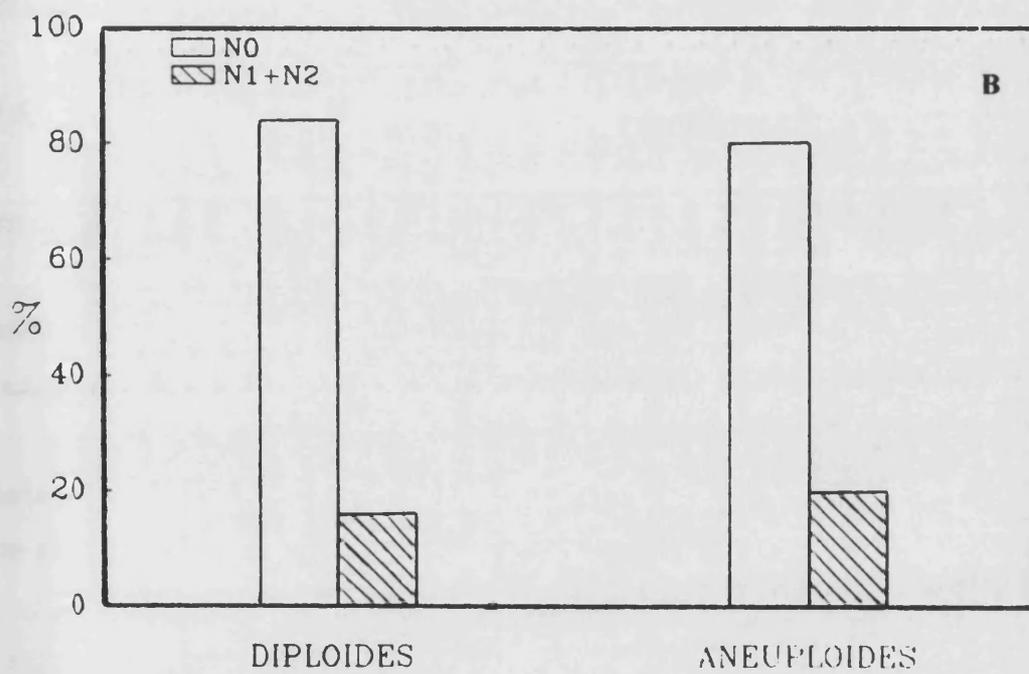
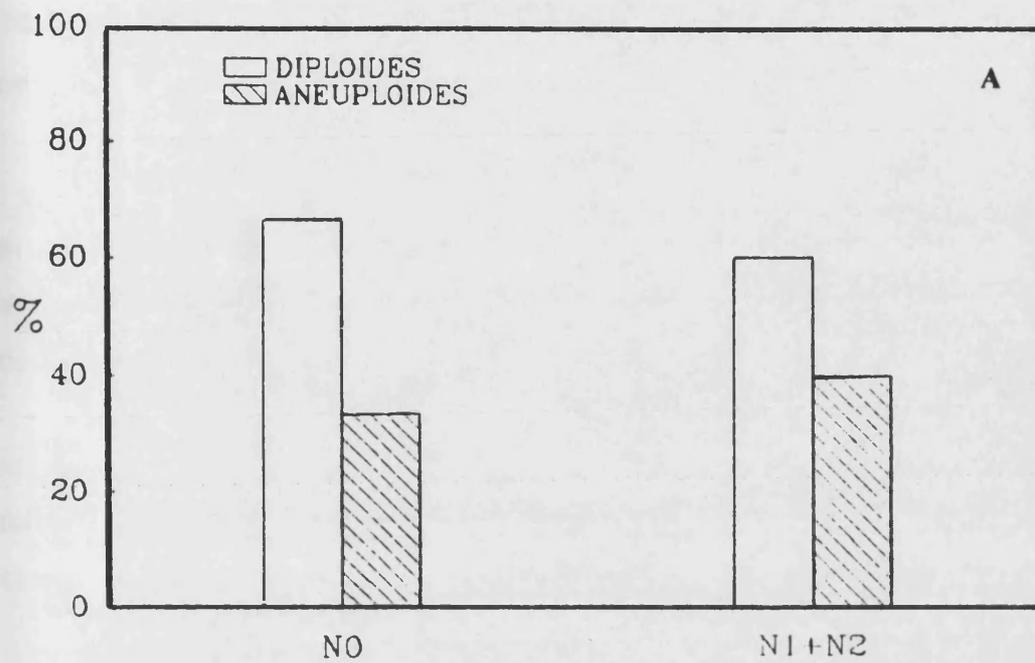


Figura 21. (A): Distribución de la ploidía según el grado de N.

(B): Distribución del grado de N en las series diploide y aneuploide.

4.4. Estadío T.N.M frente a índice de DNA.

En la serie total, el 41.6% de los tumores se clasificó como de estadío I, el 20.2% como de estadío II, el 24.3% como de estadío III y el 14.9% como de estadío IV. Para poder realizar el análisis estadístico, se definieron dos únicos grupos, correspondientes a los estadíos I+II y III+IV. Así, el 61.8% de los tumores se incluyeron en el estadío I+II y el 38.2% en el estadío III+IV.

Como se observa en la **Figura 22(A)**, no hubo diferencias significativas en la distribución de tumores diploides y aneuploides en los dos grupos definidos por el estadío T.N.M, ni con respecto a la distribución en la serie total.

La **Figura 22(B)** muestra, por otra parte, que la distribución del estadío T.N.M fue similar en las series diploide y aneuploide, sin que existieran diferencias significativas entre ambos ni con respecto a la serie total.

4.5. Ulceración macroscópica frente a índice de DNA.

En la serie total, el 53.9% de los tumores presentó ulceración macroscópica, mientras que el 46.1%, careció de ella.

La **Figura 23(A)** indica que la frecuencia de tumores diploides y aneuploides fue similar en los grupos con ulceración y sin ulceración, sin que hubiera diferencias significativas entre ambos y con respecto a la serie global.

La **Figura 23(B)** muestra que la presencia de ulceración no fue estadísticamente diferente en las series diploide y aneuploide, ni en cada una de ellas con respecto a la serie total.

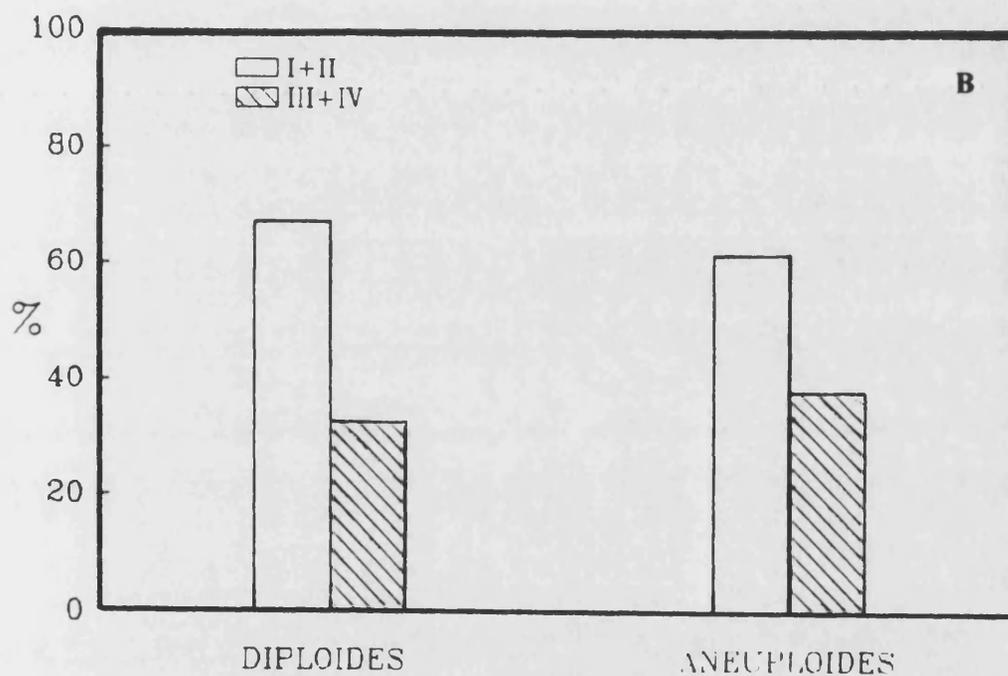
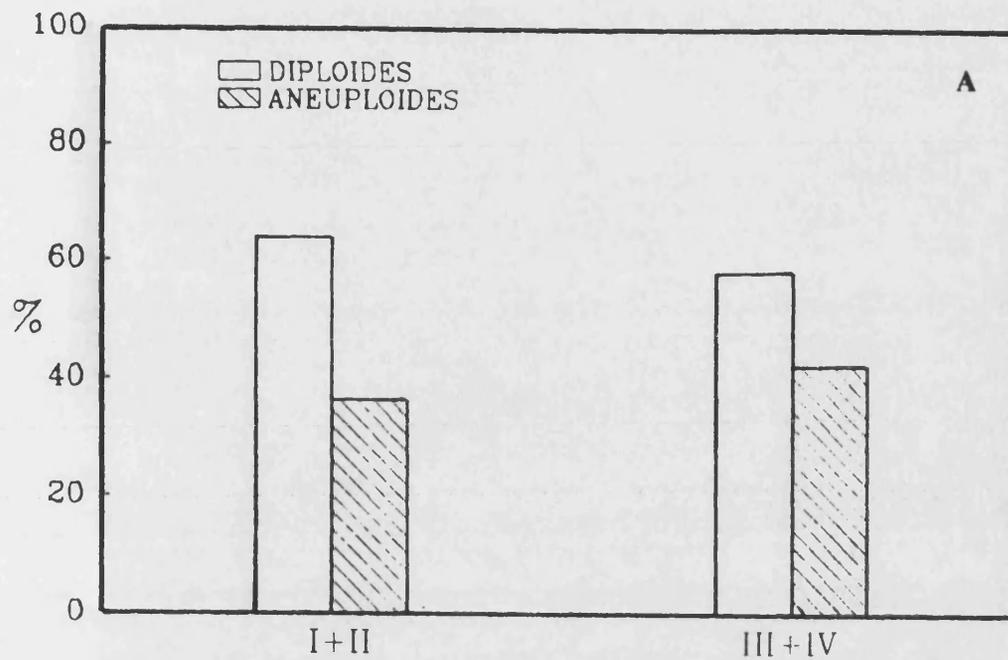


Figura 22. (A): Distribución de la ploidía según el estadio TNM.
(B): Distribución del estadio TNM en las series diploide y aneuploide.

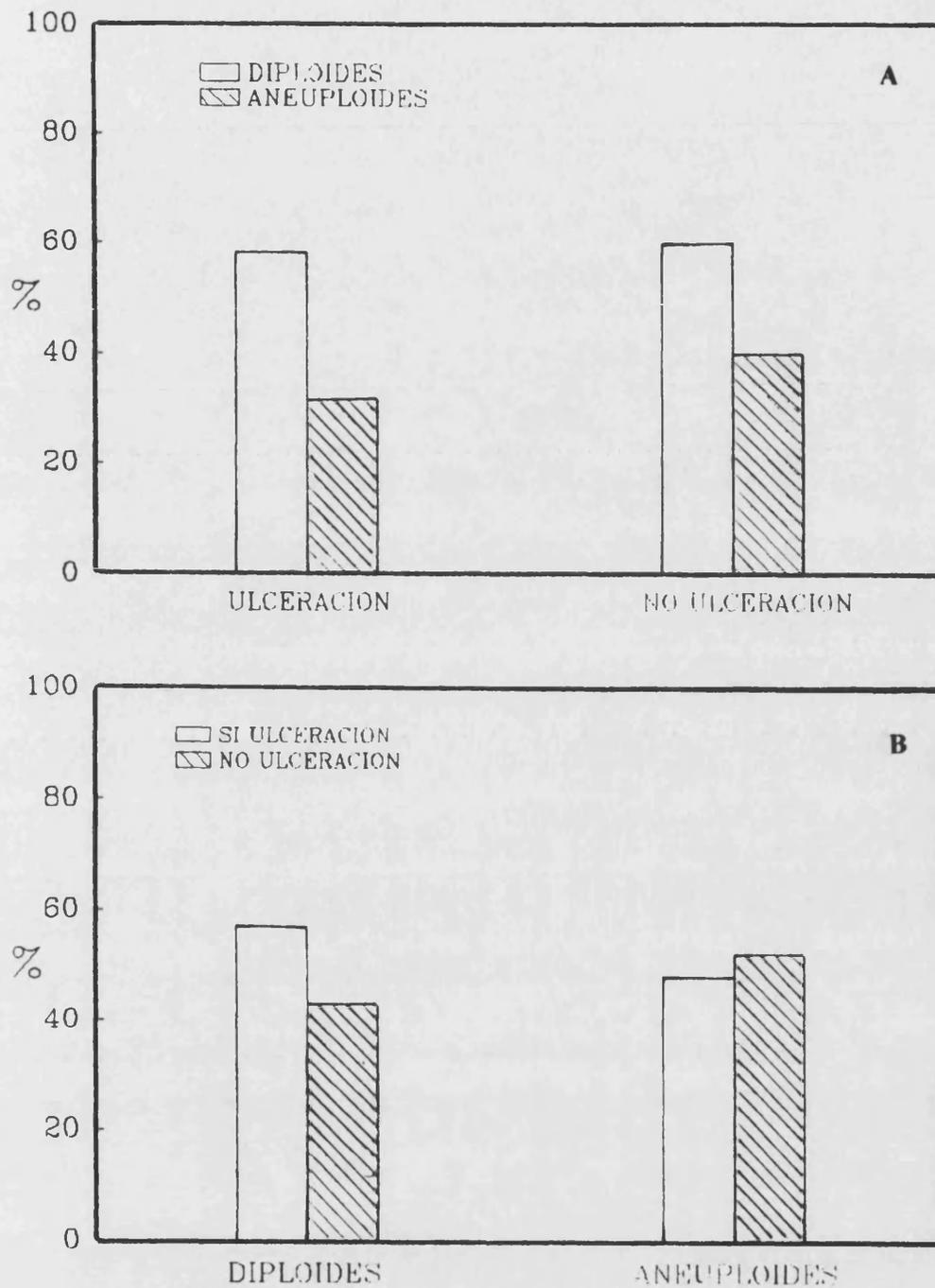


Figura 23. (A): Distribución de la ploidía según la ulceración macroscópica.
(B): Distribución de la presencia de ulceración macroscópica en las series diploide y aneuploide.

4.6. Patrón de crecimiento macroscópico frente a índice de DNA.

En la serie total de tumores, los patrones de crecimiento macroscópico exofítico, endofítico y mixto se presentaron con similar frecuencia (32.9% con patrón exofítico, 35.7% con patrón endofítico y 31.5% con patrón mixto de crecimiento).

Como se observa en la **Figura 24(A)**, no hubo diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de tumores diploides y aneuploides entre los diferentes grupos definidos por el patrón de crecimiento, ni de cada uno con respecto a la serie total.

Del mismo modo, la frecuencia de los distintos patrones de crecimiento fue similar en las series diploide y aneuploide, sin que hubiera diferencias estadísticamente significativas entre ambas y con la serie total (**Figura 24(B)**).

4.7. Infiltración de márgenes quirúrgicos frente a índice de DNA.

En la serie total, la mayor parte de los tumores presentó márgenes quirúrgicos libres de infiltración (87.9% no infiltrados, 12.1% infiltrados).

La **Figura 25(A)** muestra que la distribución de tumores diploides y aneuploides fue significativamente distinta ($p \leq 0.05$) al comparar los dos grupos definidos por los márgenes quirúrgicos. Así, en el grupo de tumores infiltrados fueron más frecuentes los tumores aneuploides, mientras que en el grupo de no infiltrados, la frecuencia fue estadísticamente similar a la de la serie total.

Por otra parte, como muestra la **Figura 25(B)**, la frecuencia de tumores infiltrados fue significativamente mayor entre los tumores aneuploides que entre los diploides.

De los datos anteriores se desprende la tendencia a la asociación entre aneuploidía e infiltración de márgenes quirúrgicos en la serie de tumores del presente estudio.

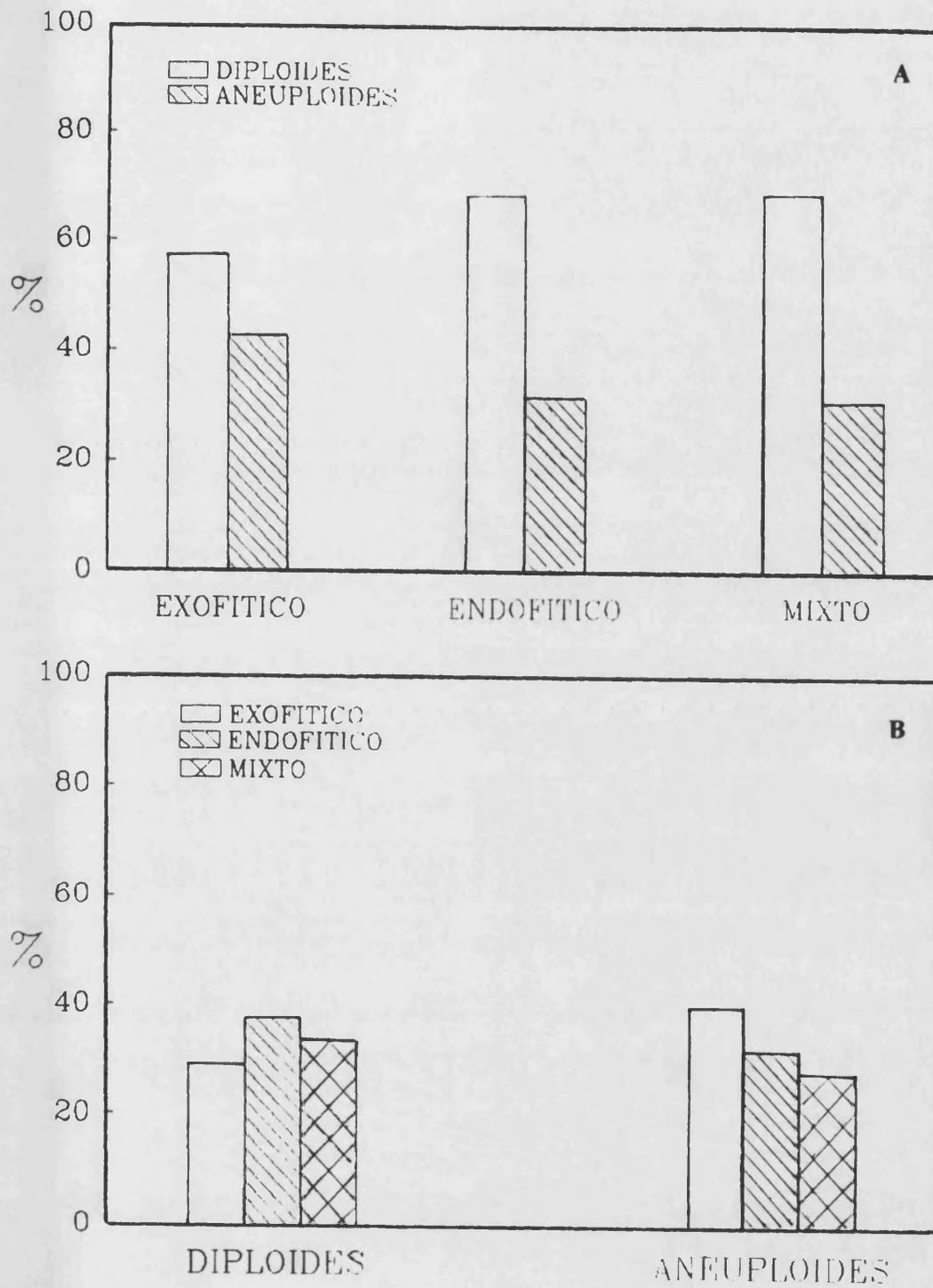


Figura 24. (A): Distribución de la ploidía según el patrón de crecimiento macroscópico. **(B):** Distribución del patrón de crecimiento macroscópico en las series diploide y aneuploide.

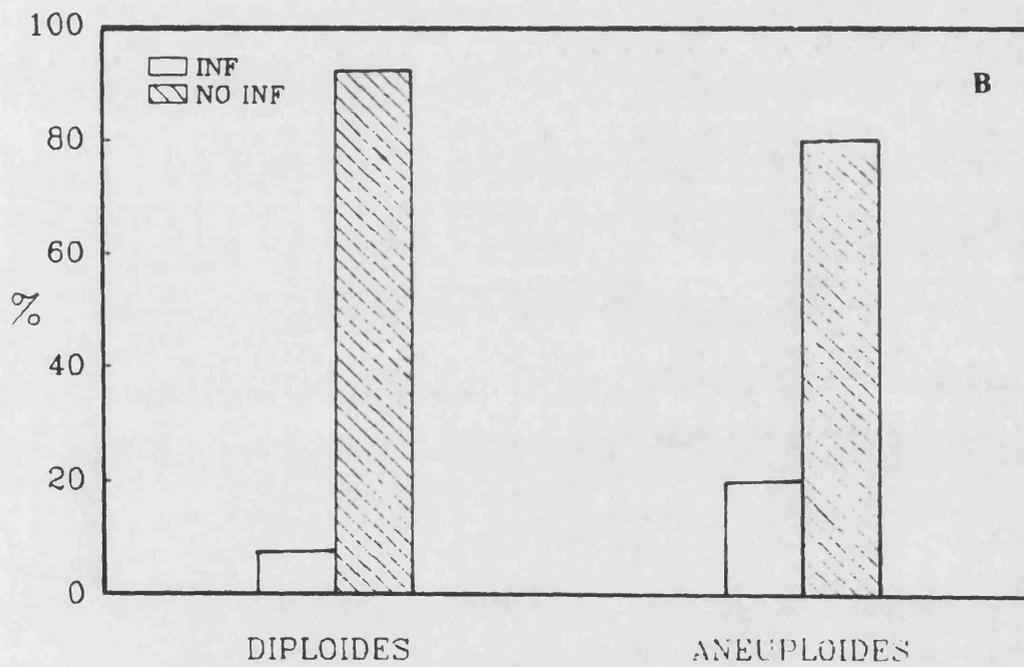
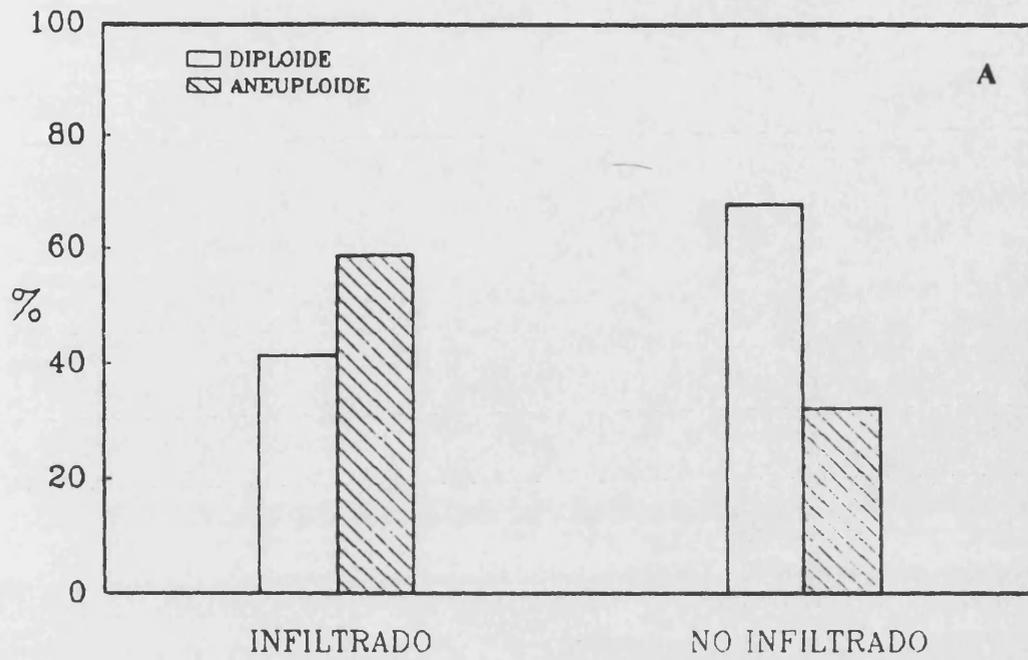


Figura 25. (A): Distribución de la ploidía según la infiltración de los márgenes quirúrgicos. **(B):** Distribución de la infiltración de márgenes quirúrgicos en las series diploide y aneuploide.

4.8. Estructura tumoral frente a índice de DNA.

En la serie total, el 52.2% de los tumores presentó estructura de tumor sólido, el 32.2% mostró estructura cordonal y el 15.6% restante presentó una estructura mixta.

Como muestra la **Figura 26(A)**, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos de estructura tumoral en cuanto a la frecuencia en ellos de tumores diploides y aneuploides, ni con respecto a la distribución en la serie total.

La **Figura 26(B)** indica, por otra parte, que la frecuencia de las distintas estructuras tumorales es similar en las series diploide y aneuploide, sin que existan diferencias estadísticamente significativas entre ellas y con la serie total.

4.9. Número de mitosis frente a índice de DNA.

En la serie total, el 23.8% de los tumores presentó un número escaso de mitosis, el 37.8% un número moderado y el 38.5%, un número alto.

La distribución de tumores diploides y aneuploides fue similar en los tres grupos definidos por el número de mitosis, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ellos y con respecto a la distribución en la serie total (**Figura 27(A)**).

En cuanto a la distribución del número de mitosis en las series diploide y aneuploide, la **Figura 27(B)** muestra la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre ambas y con respecto a la serie total.

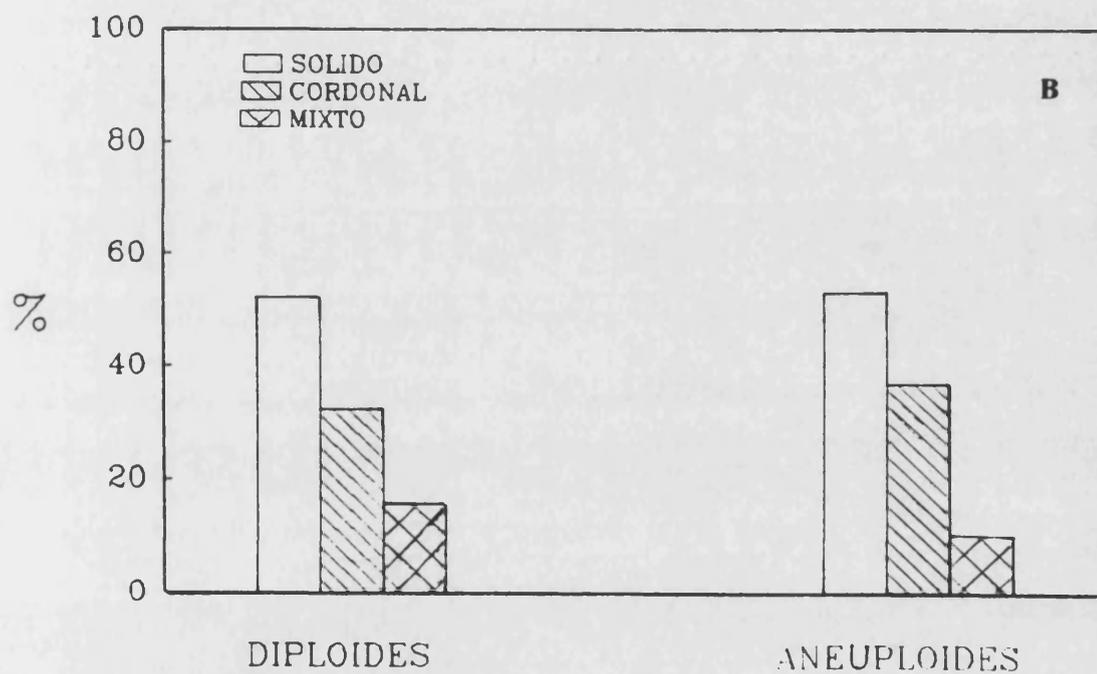
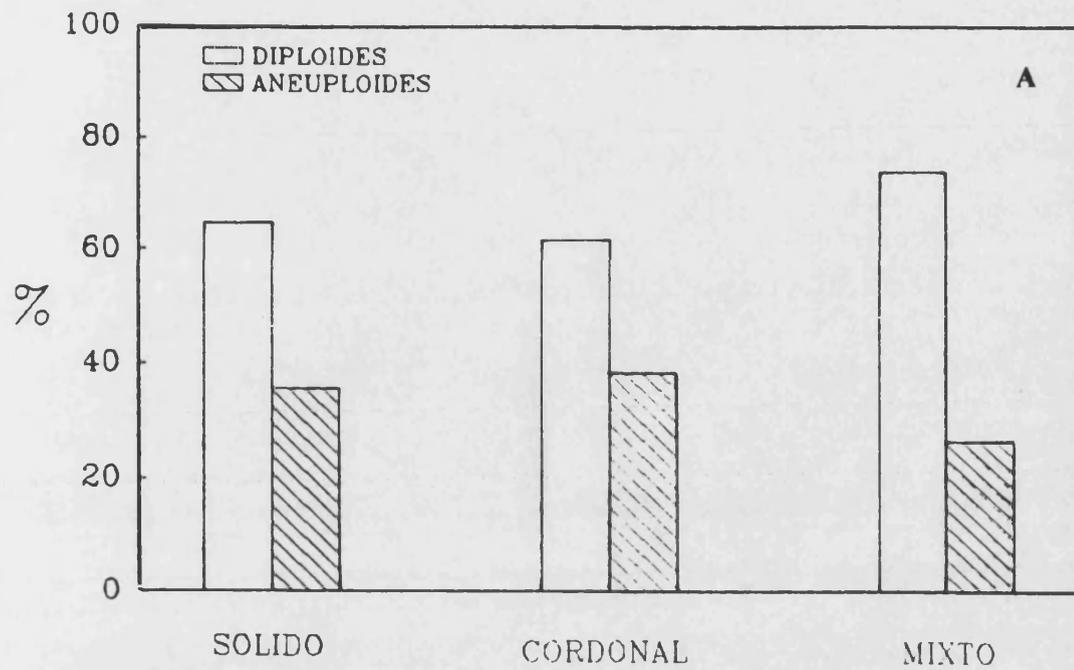


Figura 26. (A): Distribución de la ploidía según la estructura nuclear.

(B): Distribución de la estructura tumoral en las series diploide y aneuploide.

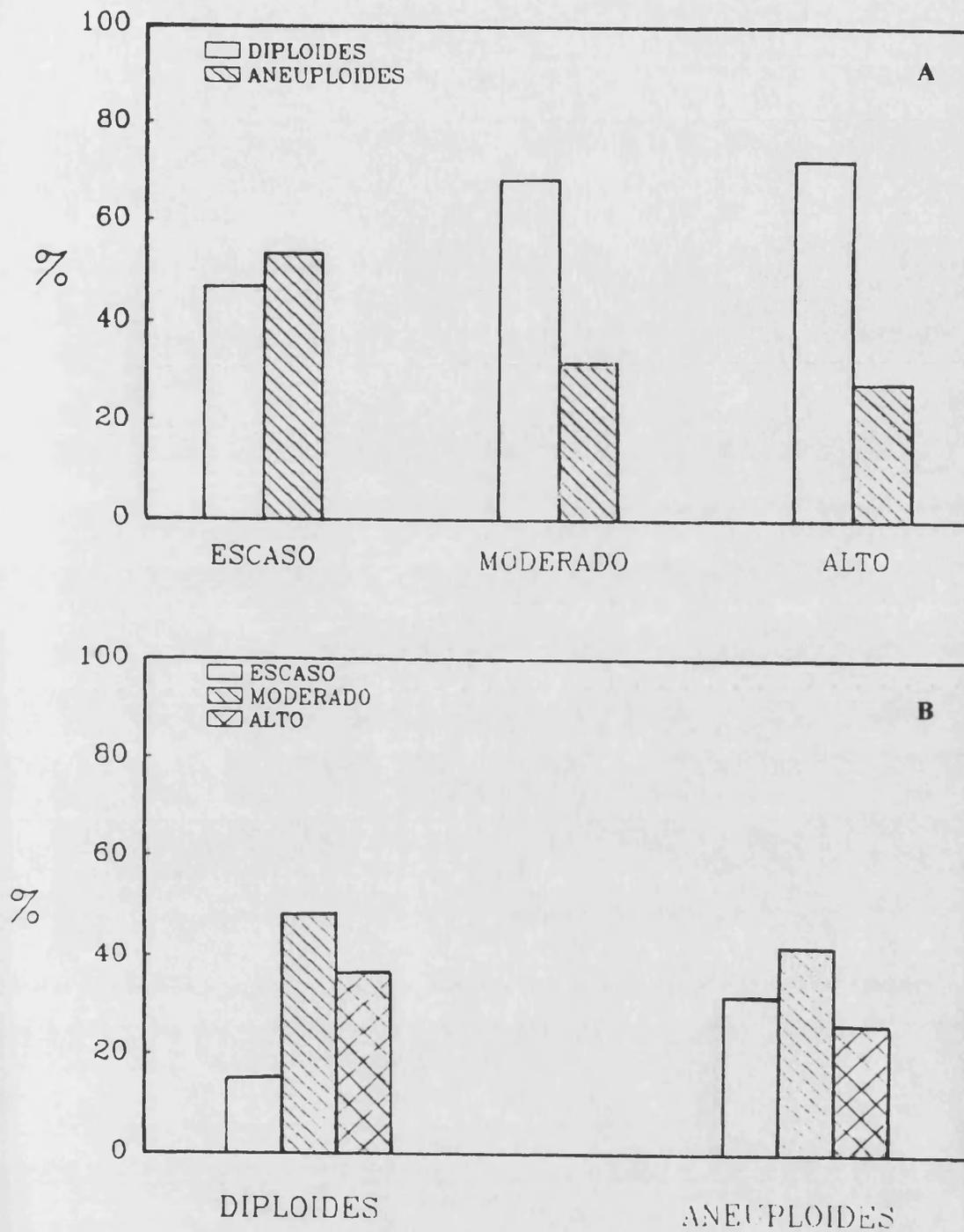


Figura 27. (A): Distribución de la ploidía según el número de mitosis.
(B): Distribución del número de mitosis en las series diploide y aneuploide.

4.10. Grado de diferenciación frente a índice de DNA.

En la serie total, el 21.0% de los tumores fueron de escaso grado de diferenciación, el 46.2% presentaron un grado moderado y el 32.9% de los tumores mostraron un alto grado de diferenciación.

La distribución de tumores diploides y aneuploides fue significativamente diferente ($p \leq 0.05$) en los distintos grupos definidos por el grado de diferenciación. Así, como muestra la **Figura 28(A)**, el porcentaje de tumores diploides aumentó al pasar del grupo de escasa al de moderada y al de elevada diferenciación.

Por otra parte (**Figura 28(B)**), la frecuencia de tumores de escasa diferenciación fue significativamente mayor en la serie aneuploide que en la diploide, mientras que, por el contrario, la frecuencia de tumores de elevado grado de diferenciación, resultó significativamente mayor en la serie diploide que en la aneuploide.

De los datos anteriores, parece deducirse la existencia de una relación entre ploidía y grado de diferenciación en la serie de tumores estudiada, de forma que la aneuploidía tiende a asociarse con el escaso grado de diferenciación y viceversa, mientras que la diploidía se asociaría con el mayor grado de diferenciación y viceversa.

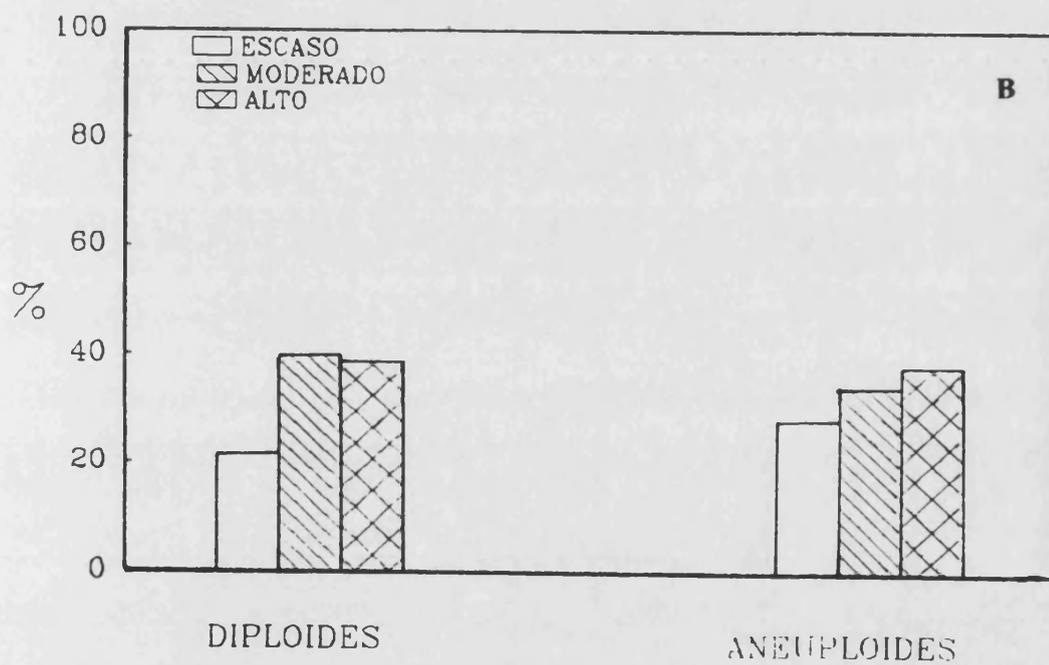
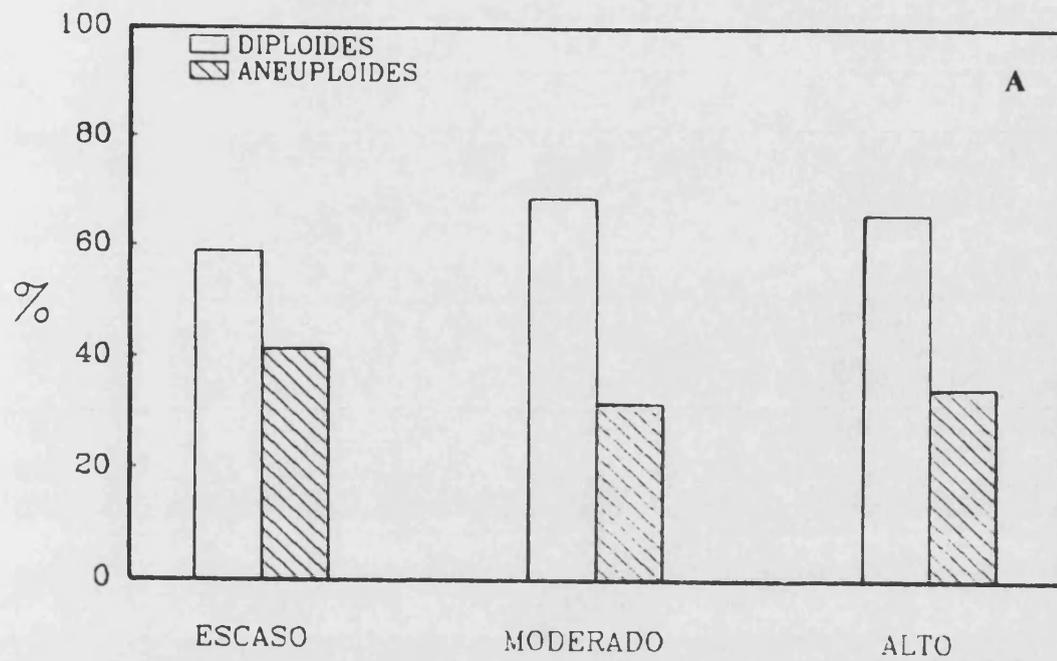


Figura 28. (A): Distribución de la ploidía según el grado de diferenciación.
(B): Distribución del grado de distribución en las series diploide y aneuploide.

5. VALOR DE LOS PARAMETROS BIOQUIMICOS, CLINICOS E HISTOLOGICOS EN LA PREDICION DE LA SUPERVIVENCIA.

5.1. Parámetros bioquímicos.

Se analizaron los parámetros: índice de DNA, índice de proliferación, valor medio de proteínas nucleares, proteína nuclear en fase G0/G1, proteína nuclear en fase S, proteína nuclear en fase S+G2+M, proteína en fase G2M, porcentaje de expresión de PCNA.

En ninguno de los parámetros analizados el resultado fue estadísticamente significativo en cuanto a la predicción de la supervivencia, si bien en algunos de ellos se puede apreciar una tendencia a separarse las curvas. (Figuras 29-35). (TABLA 5).

TABLA 5. SIGNIFICACION ESTADISTICA DE LOS PARAMETROS BIOQUIMICOS EN LA PREDICION DE LA SUPERVIVENCIA.

Indice de DNA	p = 0.960
Indice de proliferación	p = 0.233
Valor medio proteína nuclear	p = 0.342
Proteína nuclear en fase G0/G1	p = 0.361
Proteína nuclear en fase S	p = 0.577
Proteína nuclear en fase S/G2M	p = 0.466
Proteína nuclear en fase G2M	p = 0.355
Porcentaje de expresión de PCNA	p = 0.169

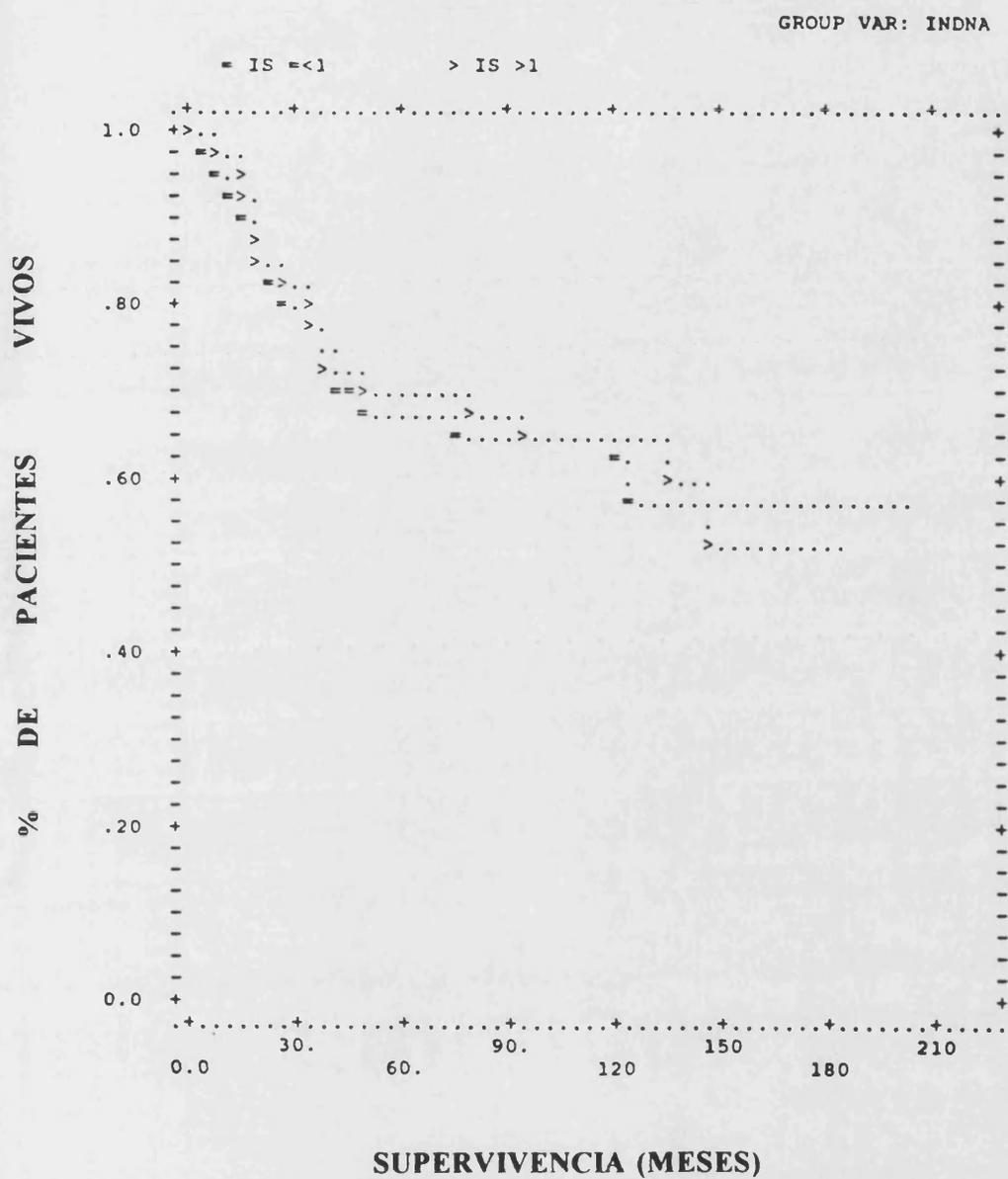


Figura 29. Relación de la supervivencia con el índice de DNA.

(=: I.DNA ≤ 1; >: I.DNA > 1).

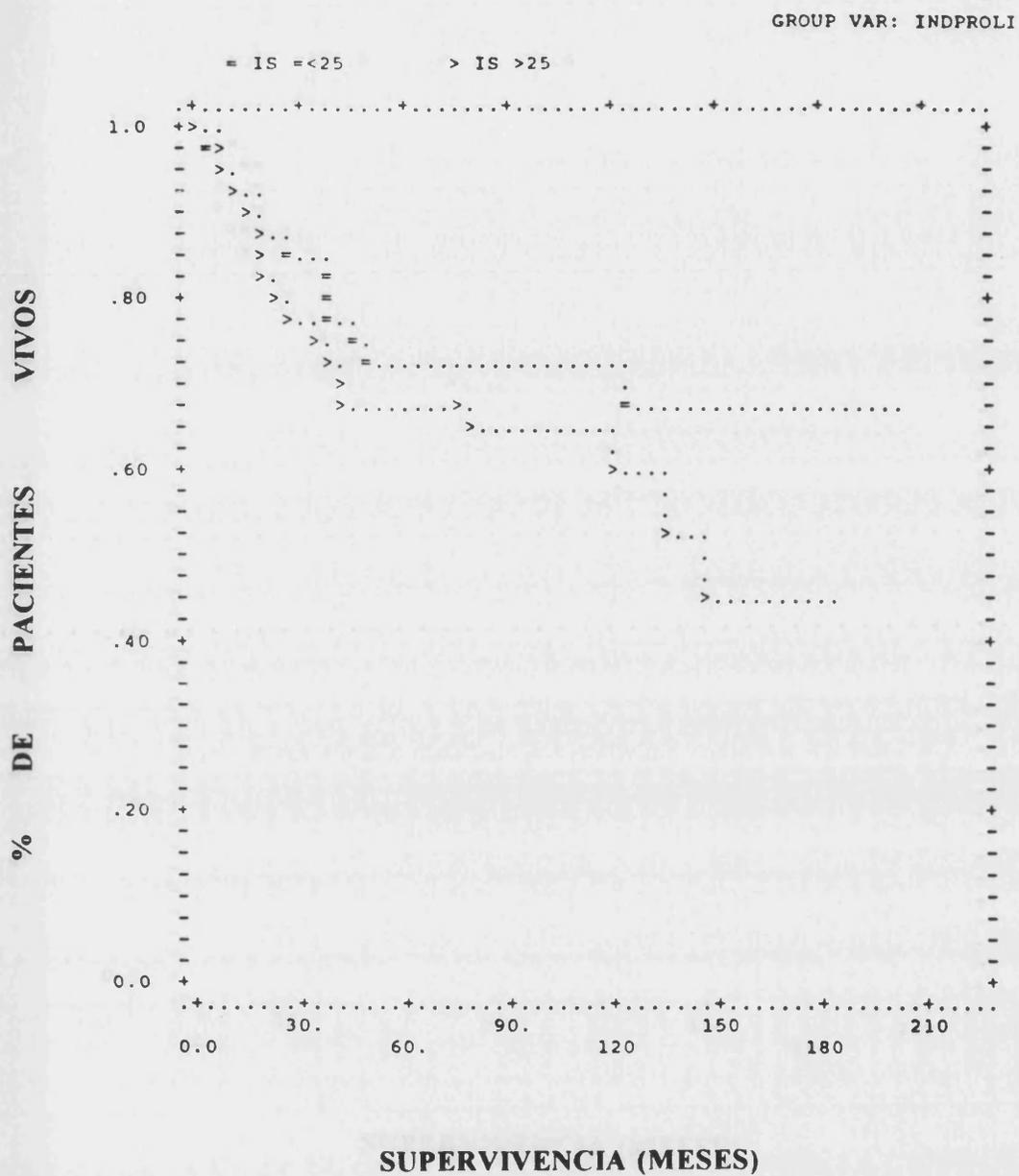


Figura 30. Relación de la supervivencia con el índice de proliferación.
 (=: I.PROL ≤ 25; >: I.PROL > 25).

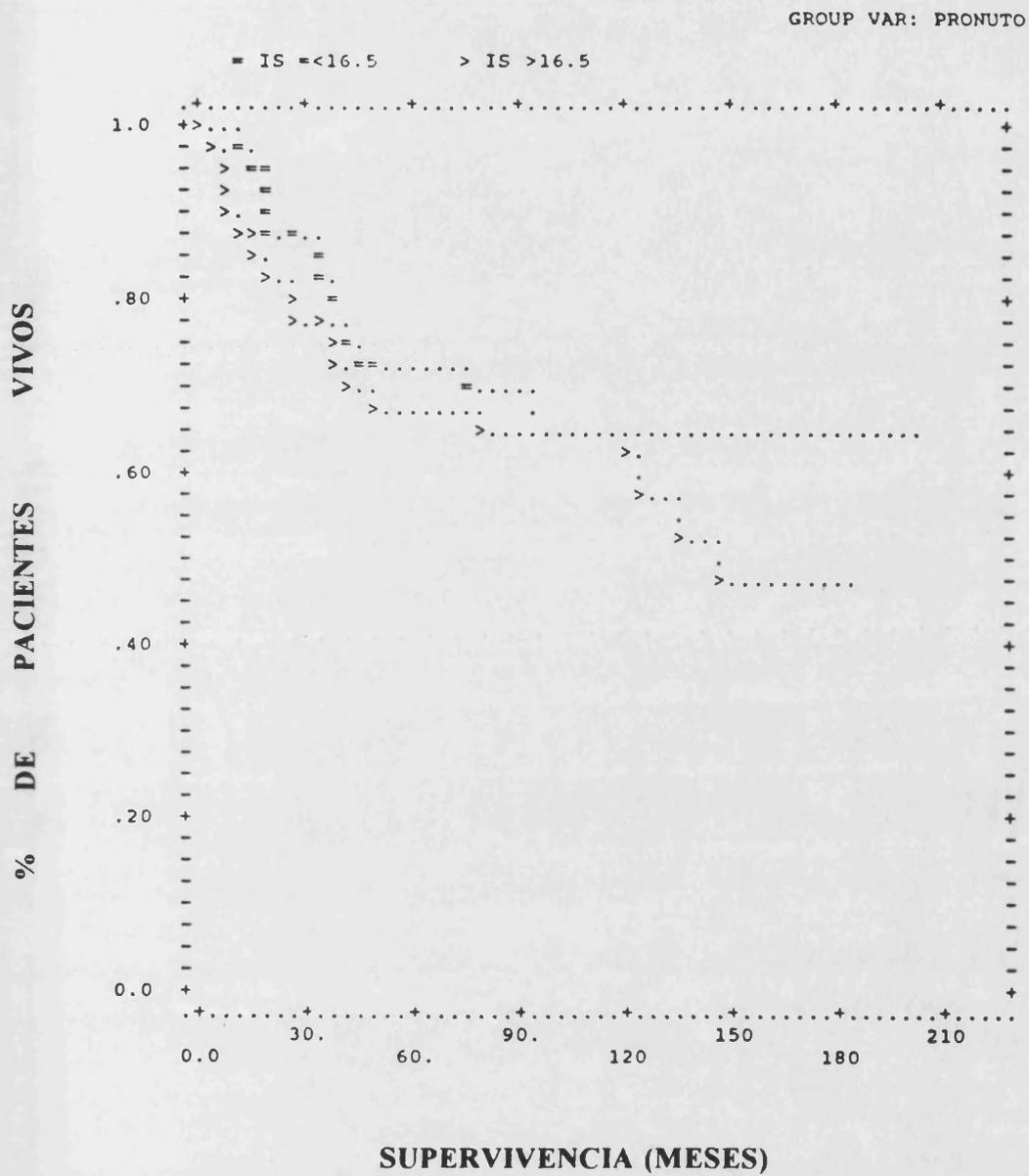


Figura 31. Relación de la supervivencia con la proteína nuclear total.
 (=: Prot. Nucl. Tot. ≤ 16.5; >: Prot. Nucl. Tot. > 16.5).

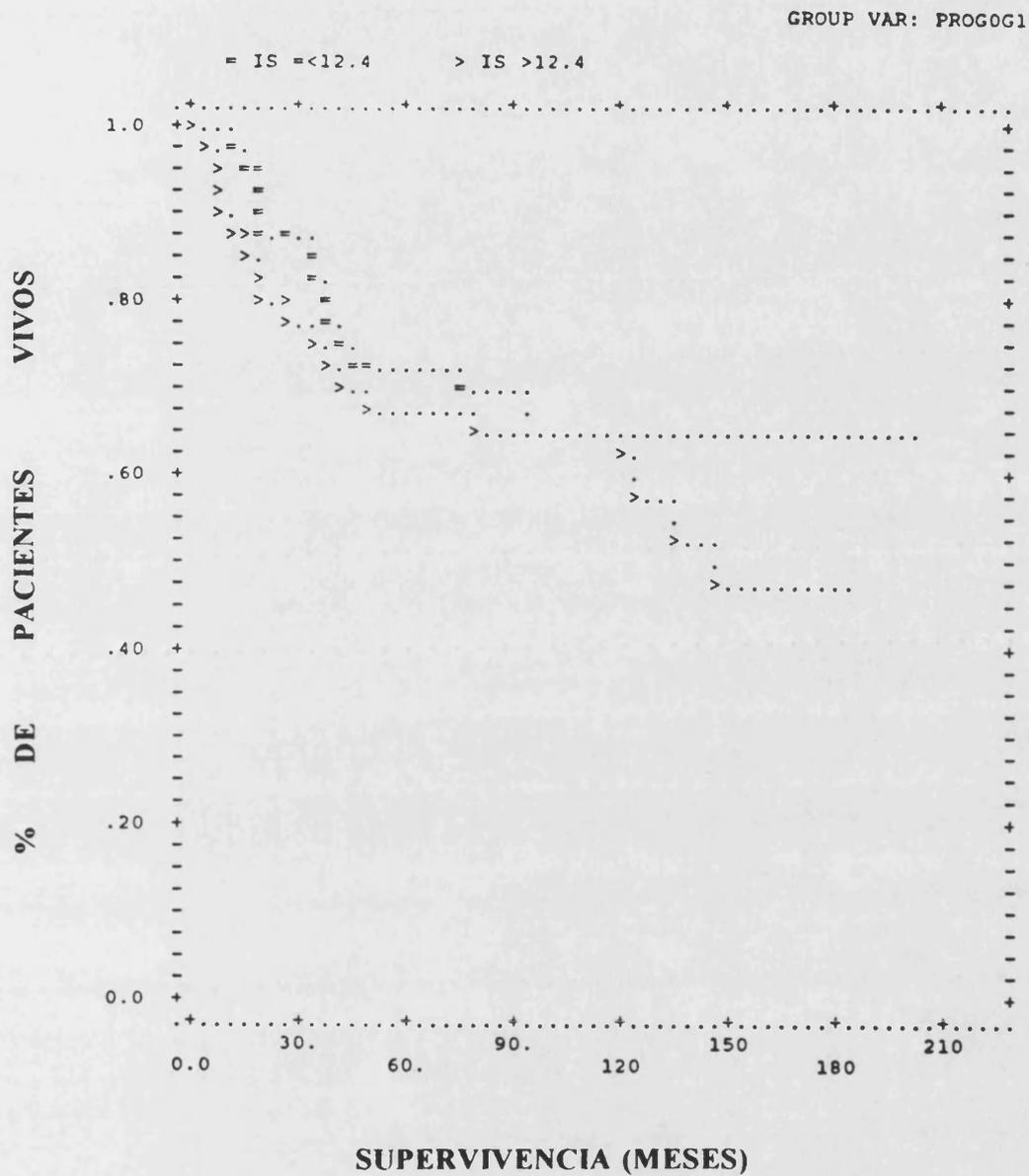


Figura 32. Relación de la supervivencia con la proteína nuclear en fase G0/G1. (=: Prot. G0/G1 ≤ 12.4; >: Prot. G0/G1 > 12.4).

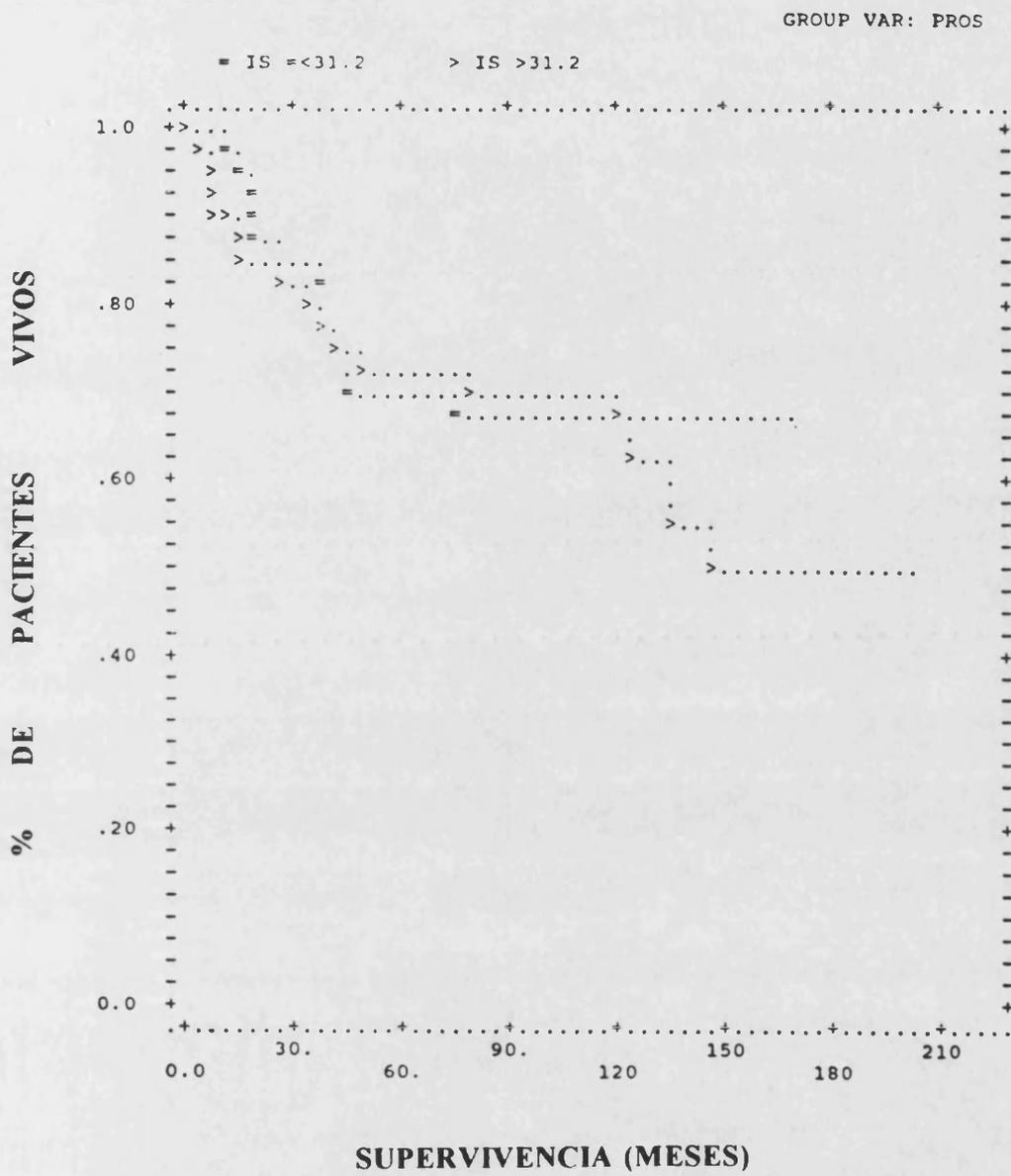


Figura 33. Relación de la supervivencia con la proteína nuclear en fase S.
 (=: Prot. S \leq 31.2; >: Prot. S $>$ 31.2).

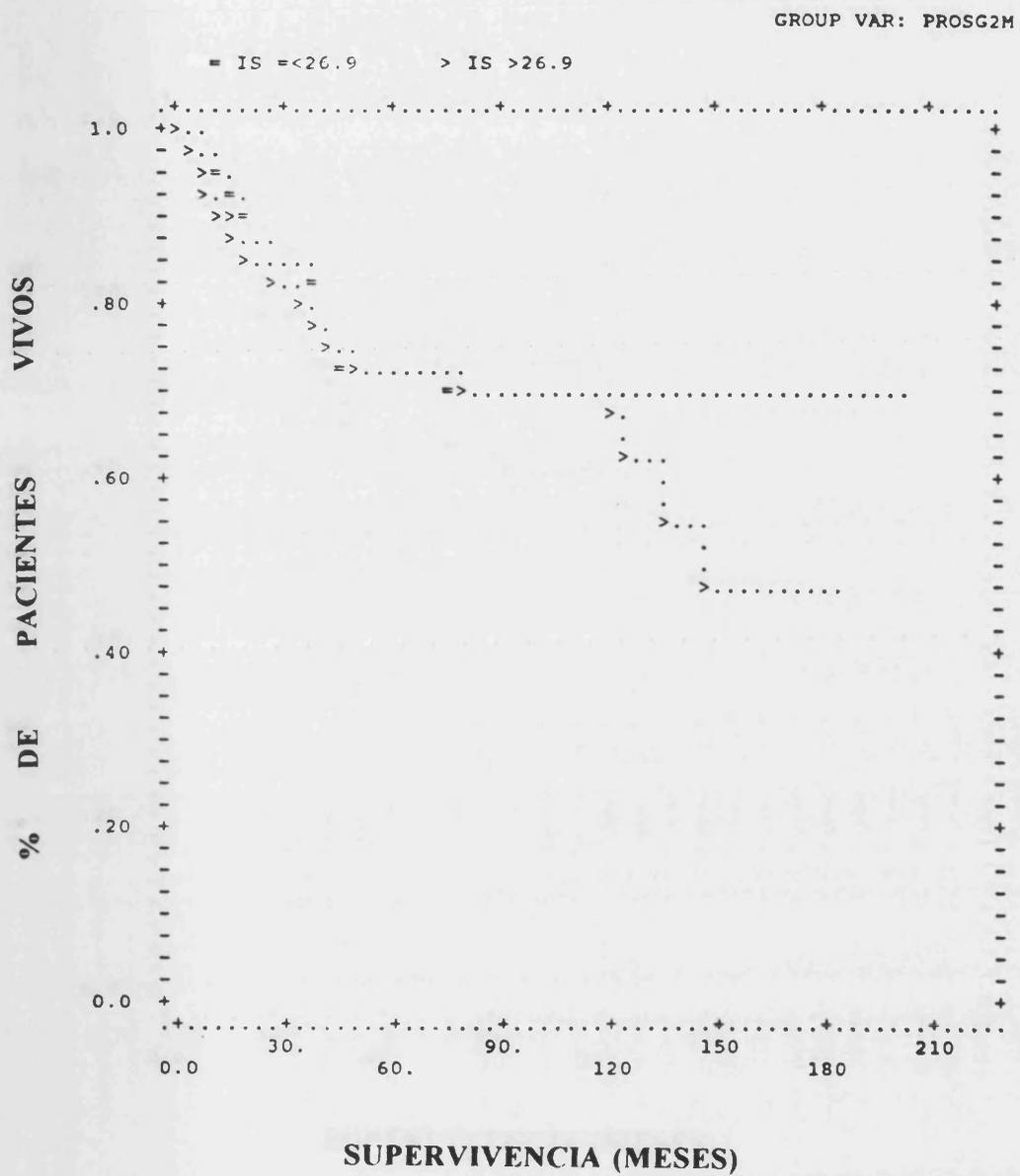


Figura 34. Relación de la supervivencia con la proteína nuclear en fase S+G2+M. (=: Prot. S/G2M ≤ 26.9; >: Prot. S/G2M > 26.9).

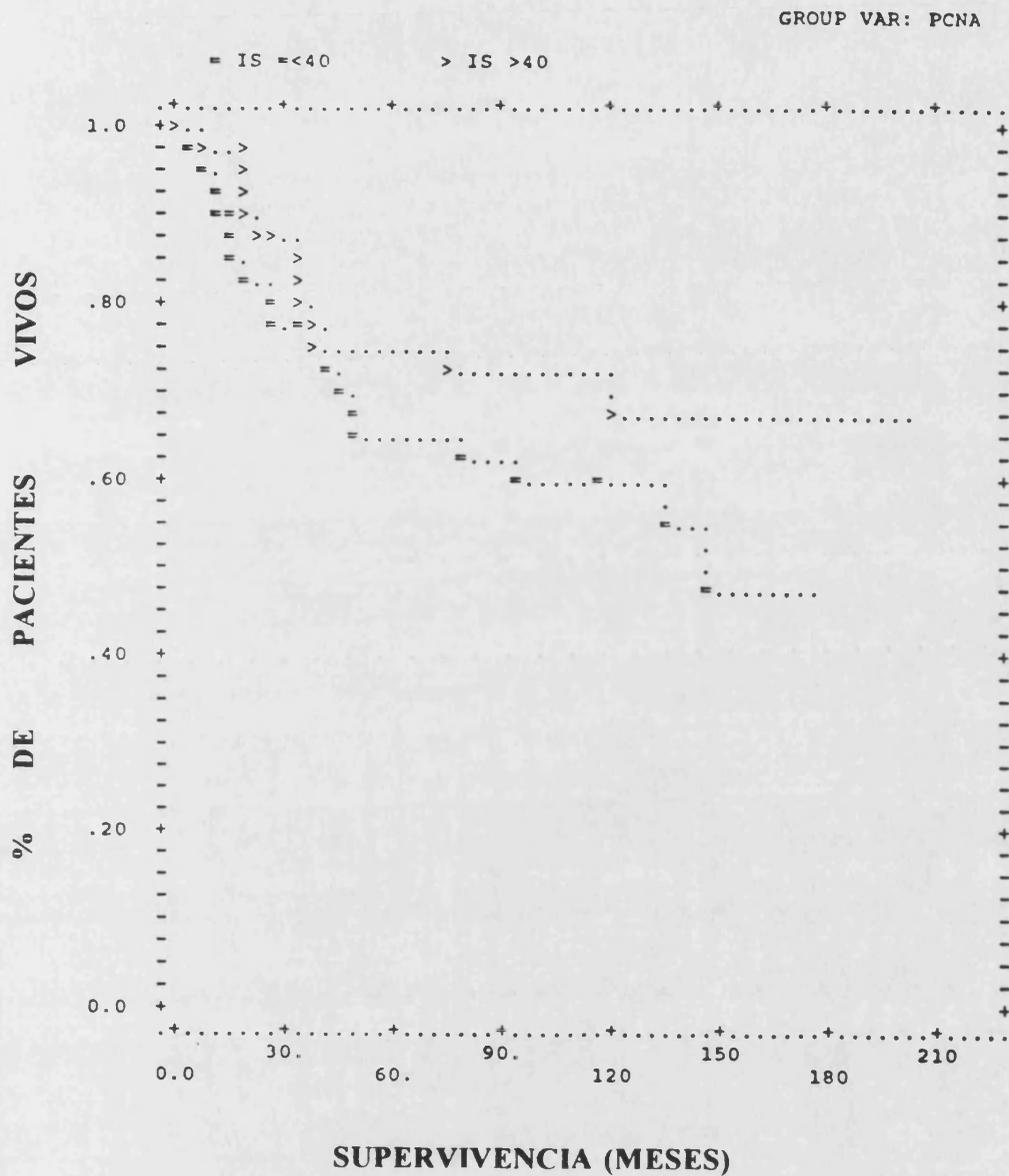


Figura 35. Relación de la supervivencia con el porcentaje de expresión de PCNA. (=: PCNA ≤ 40; >: PCNA > 40).

5.2. Parámetros clínicos e histológicos.

La muestra de pacientes cumple con los criterios pronóstico conocidos. El grado de T, grado de N, estadio TNM y grado de diferenciación, en el análisis univariante, fueron estadísticamente significativos con respecto a la supervivencia. (Figura 36-39). (TABLA 6).

TABLA 6. SIGNIFICACION ESTADISTICA DE LOS PARAMETROS CLINICOS E HISTOLOGICOS EN LA PREDICCION DE LA SUPERVIVENCIA.

Grado de T	p = 0.003
Grado de N	p = 0.001
Estadio TNM	p = 0.005
Grado de diferenciación	p = 0.024

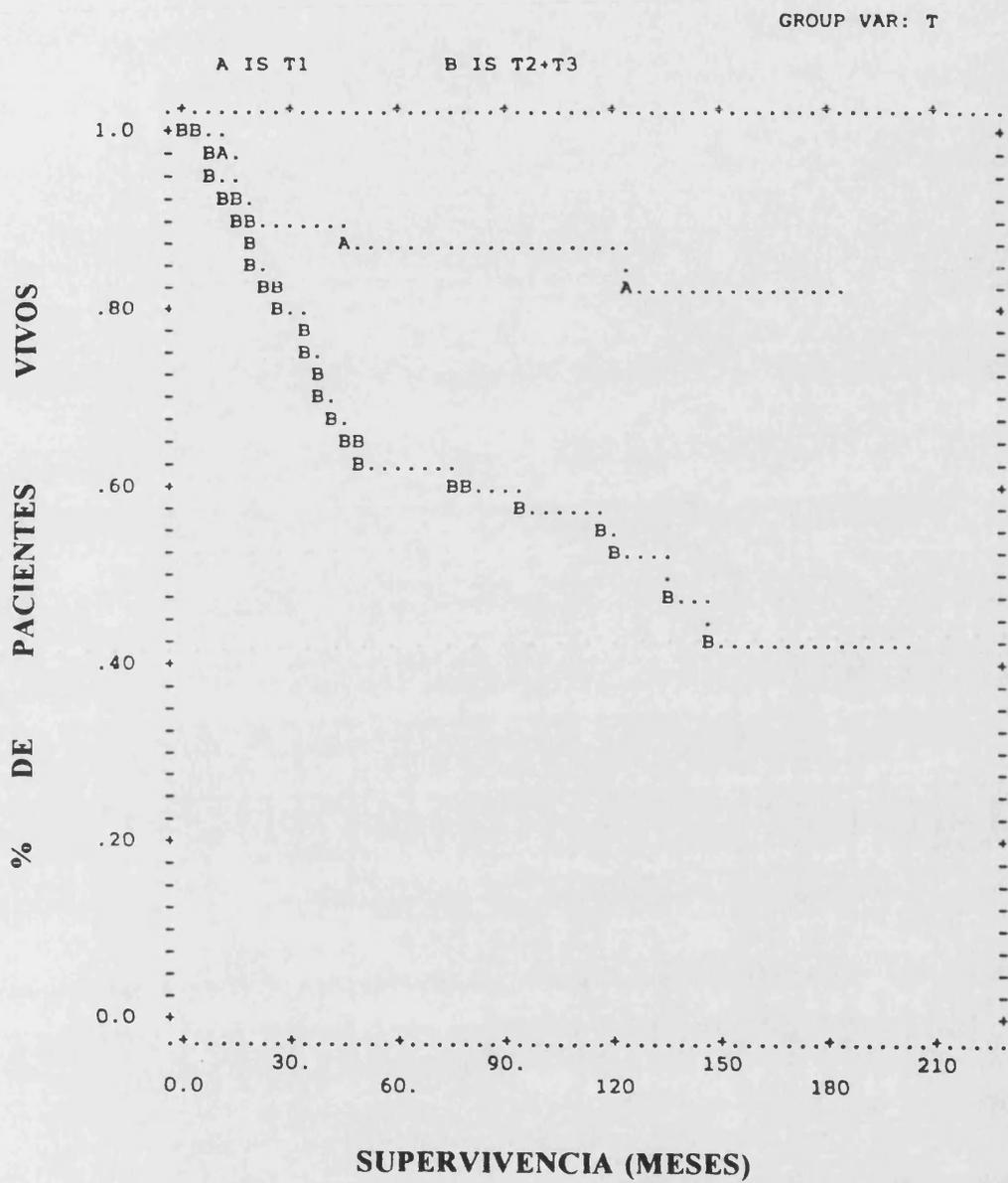


Figura 36. Relación de la supervivencia con el grado de T.
(A: T1; B: T2+T3).

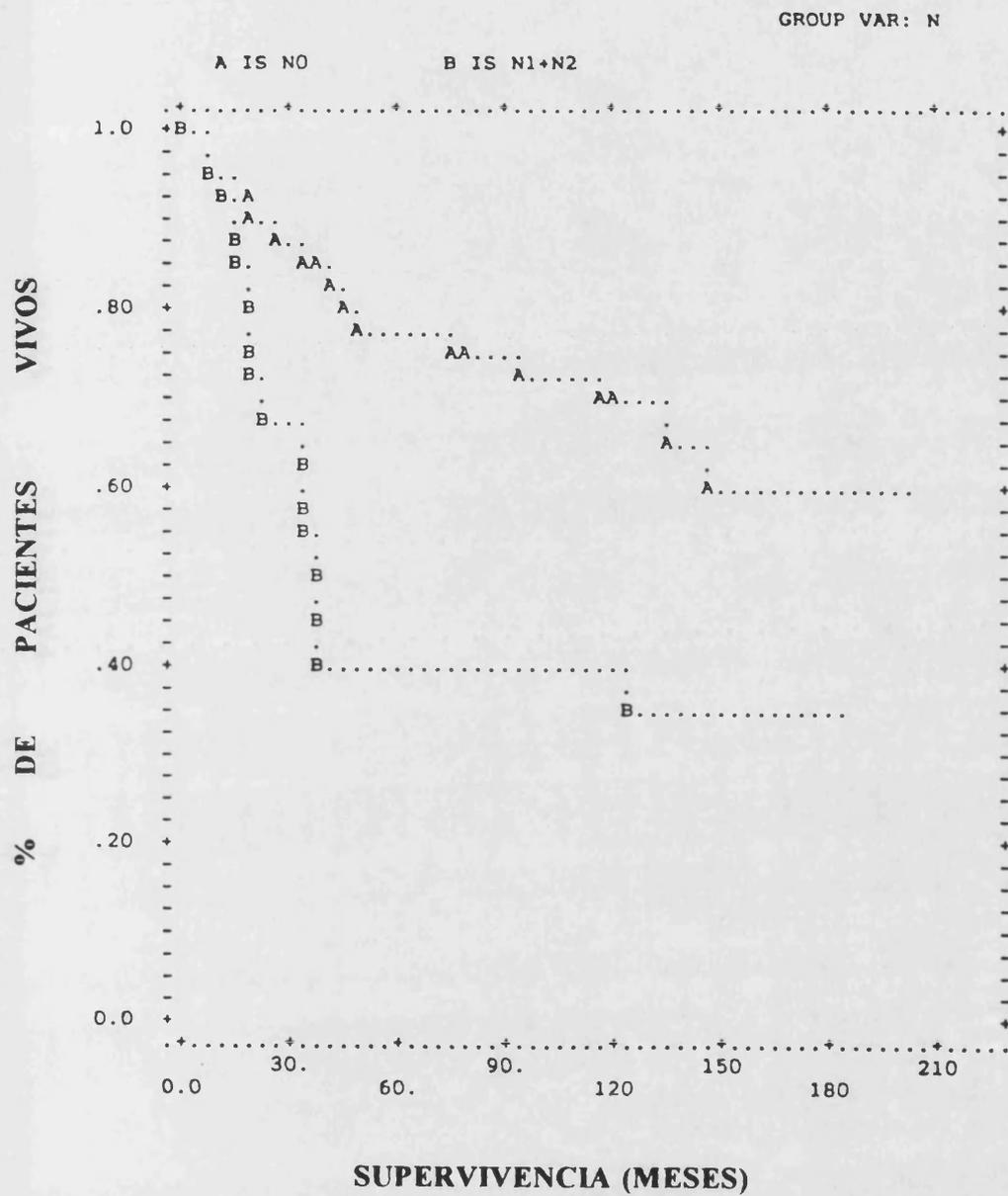


Figura 37. Relación de la supervivencia con el grado de N.
(A: N0; B: N1+N2).

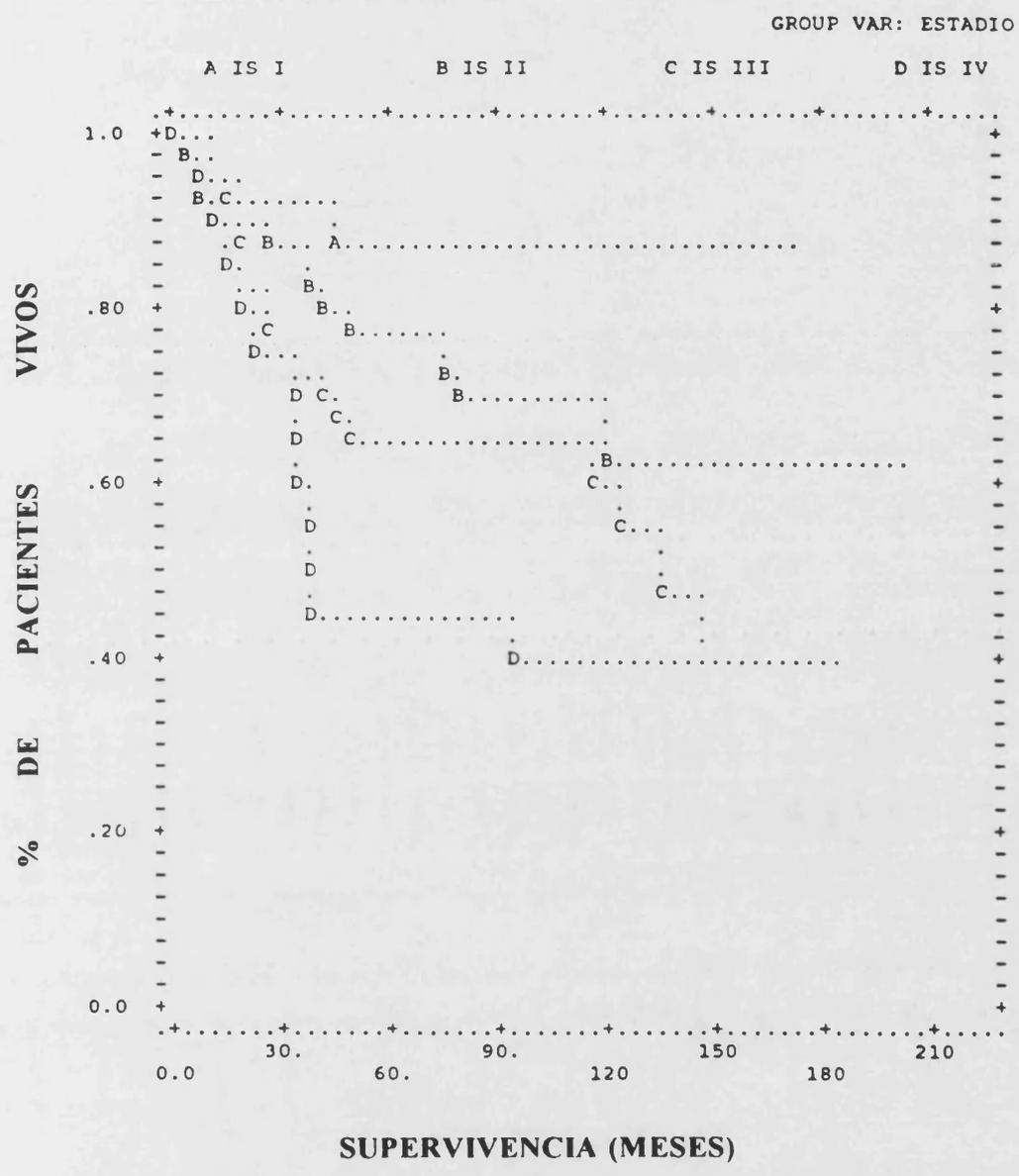


Figura 38. Relación de la supervivencia con el estadio TNM.
 (A: I; B: II; C: III; D: IV).

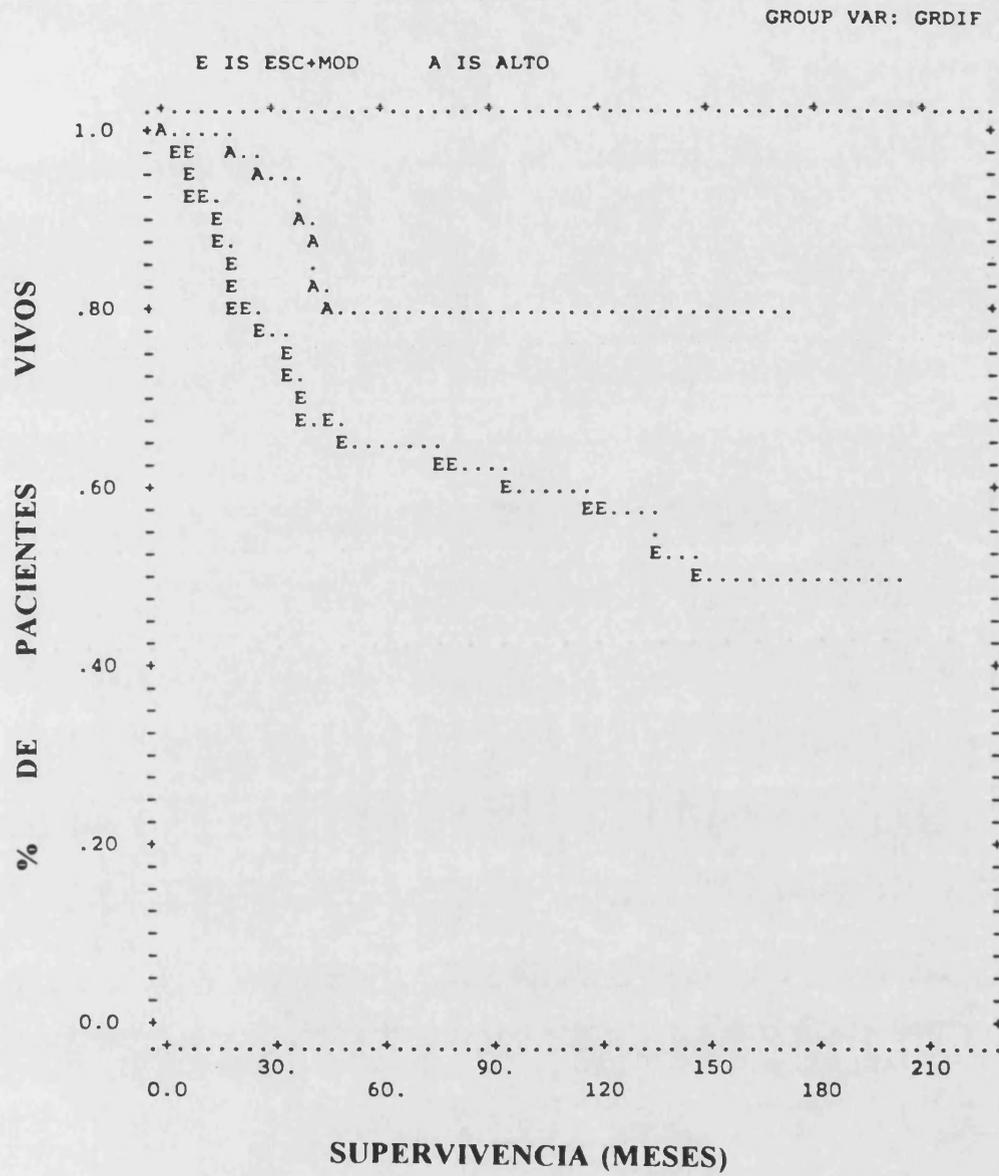


Figura 39. Relación de la supervivencia con el grado de diferenciación.
(E: Escaso + Moderado; A: Alto).

6. PAPEL PRONOSTICO DE PARAMETROS BIOQUIMICOS NUCLEARES: ANALISIS ESTADISTICO MULTIVARIANTE.

Para analizar las interacciones de más de una de las variables bajo estudio, con el tiempo de supervivencia de los pacientes, se utilizó el modelo de regresión de Cox. Las variables incluídas en el análisis fueron: vaciamiento ganglionar, radioterapia, localización, estadio, grado de diferenciación, invasión vascular, índice de DNA, índice de proliferación, proteínas nucleares totales, proteínas en fase G0/G1, proteínas en fase S, proteínas en fase G2/M y PCNA.

De estas variables sólo el índice de proliferación mostró una relación significativa con el tiempo de supervivencia, con un valor $p = 0.001$ para el logaritmo de la máxima verosimilitud y un test de Chi-Cuadrado global de 6,19 ($p = 0.001$).

Se procedió a modificar los valores de p en el algoritmo de resolución del problema para intentar observar el posible efecto sobre el modelo de alguna de las otras variables bajo estudio. El resultado fue el mismo, dado que la primera variable con poder discriminador, seguía siendo el índice de proliferación y a continuación el estadio, índice de DNA, PCNA y grado de diferenciación, pero en ningún caso, el añadir al modelo una o más de las variables reseñadas mejoraba el poder predictivo del mismo. **(TABLA 7).**

TABLA 7. ANALISIS MULTIVARIANTE.

ETAPA	VARIABLE	DF	LOGARITMO	MEJORA CHI-SQ	P-VALOR	GLOBAL CHI-SQ	P-VALOR
0	-----	-	- 114.429	-----	-----	-----	-----
1	INDICE DE PROLIFERACION	1	-111.447	5.965	0.015	6.195	0.013
2	ESTADIO	2	-110.107	2.680	0.102	9.269	0.010
3	INDICE DE DNA	3	-108.588	3.038	0.081	11.450	0.010
4	PCNA	4	-107.679	1.817	0.178	13.319	10.010
5	GRADO DE DIFERENCIACION	5	-106.581	2.196	0.138	15.559	0.008
6	PROTEINA EN FASE S	6	-105.820	1.522	0.217	16.797	0.010
7	PROTEINA EN FASE G2M	7	-105.159	1.322	0.250	18.604	0.010
8	RADIOTERAPIA	8	-104.890	0.536	0.464	19.175	0.014
9	VACIAMIENTO	9	-104.064	1.654	0.198	21.346	0.011

DISCUSSION

1. SITUACION DEL PRESENTE ESTUDIO EN EL CONTEXTO DEL ANALISIS PRONOSTICO DE LOS TUMORES DE CABEZA Y CUELLO.

1.1. La citometría de flujo en el estudio de los tumores.

El valor diagnóstico y pronóstico del análisis de DNA por citometría de flujo ha quedado puesto de manifiesto por el gran número de estudios realizados en los últimos años. A pesar de las dificultades metodológicas y la complejidad del problema abordado hacen que el avance de la citometría de flujo en Oncología sea más lento que, por ejemplo, en Inmunología. Raber y Barlogie (1990) calculan que, sólo hasta 1990, se han publicado datos sobre el contenido en DNA de más de 7.000 tumores sólidos de muy distintas localizaciones.

Utilizando una amplia variedad de técnicas preparativas, analíticas e instrumentales, el análisis del contenido de DNA en núcleos individuales informa, por una parte, de la ploidía del tumor. La aneuploidía es un excelente marcador de agresividad celular, habiéndose detectado en más del 70% de los tumores analizados (Raber y Barlogie, 1990). Más aún, se ha demostrado la presencia de aneuploidía en diferentes tipos de lesiones preneoplásicas o malignas precoces, por lo que su valor analítico se incrementa (Raber y Barlogie, 1990). El índice de DNA se correlaciona bien con el número de cromosomas determinado por análisis del cariotipo (Tribukait et al., 1986) y las limitaciones de su estudio las impone la resolución, cada vez más creciente, de los instrumentos y la calidad de la preparación.

El estudio del ciclo celular, a través del análisis del contenido individual de DNA, permite relacionar el porcentaje de células en la fase S o en G2+M con la cinética de la proliferación tumoral. Aunque los problemas metodológicos en el análisis del ciclo celular dificultan su interpretación como parámetro predictivo, los datos disponibles muestran que la alta actividad proliferativa es, en general, indicador de un mal pronóstico (Rabinovitch, 1993).

En los últimos años, el análisis de la proliferación tumoral se ha beneficiado de la puesta a punto de ensayos cinéticos por citometría de flujo

basados en la determinación de la velocidad de síntesis de DNA (Dolbeare et al., 1983; Dolbeare, 1993; Ferrari et al., 1993)) y en la detección y cuantificación de proteínas específicas de fases del ciclo, con papel regulador o auxiliar de la proliferación celular (Bravo y McDonald-Bravo, 1987; Gerdes et al., 1984; Kurki et al., 1986; Takasaki et al., 1984)).

1.2. Análisis por citometría de flujo en tumores parafinados.

Un avance importante del análisis de los tumores por citometría de flujo lo constituyó la puesta a punto del método de Hedley et al. (1983) que permite la medida de DNA en suspensiones nucleares obtenidas por desparafinación y rehidratación de secciones obtenidas a partir de material de archivo fijado. El método de Hedley ha sido revisado y optimizado repetidamente (Hedley, 1989; Joensuu et al., 1990; Ciancio et al., 1993; Kallioniemi et al., 1994), principalmente en cuanto a la simplificación de la técnica de preparación de las suspensiones. Las limitaciones al método radican, sobre todo, en la calidad de la conservación de los bloques parafinados (Hedley, 1989) y, en menor grado, en los procesos de obtención y tinción de las suspensiones, puesto que en ellos es factible el establecer un adecuado control de calidad.

En condiciones normales, el análisis del contenido nuclear de DNA en los mismos tumores en fresco o parafinados resulta en índices de DNA altamente correlacionados, aunque con un coeficiente de variación ligeramente mayor en los parafinados (Hedley, 1989). Esta correlación fue también comprobada en un estudio anterior (Barona, 1991), en algunos tumores de laringe frescos y parafinados, incluidos en la serie actual.

Un gran número de estudios clínicos que utilizan material de archivo parafinado han demostrado la utilidad clínica del método de Hedley (Hedley, 1989; Goldsmith et al., 1986; Rua et al., 1991; Costello et al., 1990; Farrar et al., 1987). En ellos se refleja en parte el valor predictivo de la ploidía nuclear y el índice de DNA, por sí mismos o en asociación con otros factores pronóstico, aunque en muchos tipos de tumores la significación de la aneuploidía no ha podido ser todavía establecida definitivamente (Hedley,

1989). Igualmente, la determinación de la fase S o del índice de proliferación (S+G2+M), es mucho más dificultosa en el material parafinado, debido a la frecuente presencia de ruido de fondo producido por distintos tipos de detritos celulares y nucleares que impiden la correcta estimación de la fracción proliferativa (Kallioniemi et al., 1987; Bagwell et al., 1991; Weaver et al., 1990; Rabinovitch, 1988). La disponibilidad de programas informáticos para la sustracción de los distintos tipos de ruido de fondo ha permitido rescatar para el análisis citométrico un porcentaje importante de tumores que hubieran resultado imposibles de evaluar (Rabinovitch, 1988; Kallioniemi et al., 1994). Con tal aproximación, el método de Hedley ha mostrado un valor pronóstico para la fase S o el índice de proliferación en algunos tipos de tumores (Hedley, 1989; Darzynkiewicz, 1993), aunque es muy elevado el conjunto de estudios en los que este parámetro tumoral no se ha podido validar como factor pronóstico.

1.3. El análisis citométrico multiparamétrico en tumores parafinados.

Mientras que son cada vez más frecuentes los estudios multiparamétricos por citometría de flujo en tumores sólidos en fresco o congelados (Darzynkiewicz, 1990; Darzynkiewicz, 1984), las dificultades preparativas y de mantenimiento de algunas estructuras y moléculas celulares en muestras fijadas, hacen que tales estudios hayan sido infrecuentes sobre tumores parafinados. Sin embargo, el análisis multiparamétrico, como se ha indicado en la Introducción de esta Tesis, presenta grandes ventajas sobre el monoparamétrico a la hora de distinguir determinadas fases del ciclo o estimar las características cinéticas de la proliferación, así como para llegar a diferenciar las células diploides normales que se pueden encontrar en cualquier tumor y poder determinar las propiedades exclusivas de la población tumoral (Hedley, 1989).

1.4. Análisis por citometría de flujo de DNA y proteínas nucleares en tumores parafinados.

En 1993, cuando el presente estudio se había ya iniciado, Ciancio et al. (1993) publicaron la primera referencia al estudio por citometría de flujo de proteínas totales en suspensiones nucleares procedentes de tumores parafinados, simultáneamente al análisis del contenido de DNA. El método de Ciancio et al., se basa en una modificación del método de Hedley et al. (1983), consistente en una incubación más prolongada con pepsina (150 minutos en lugar de 30 minutos) y la doble tinción de la suspensión con yoduro de propidio (para teñir el DNA) y FITC (para teñir las proteínas totales). El propósito de Ciancio et al. (1993) era el de identificar de forma menos subjetiva la aneuploidía de DNA que en los métodos monoparamétricos, al reducir el solapamiento entre poblaciones diploides y aneuploides, debido a que, en los tumores por ellos analizados (mama, colon, riñón y timo), los núcleos tumorales suelen tener un mayor contenido en proteínas que los núcleos diploides.

1.5. Valor analítico y objetivos del método de análisis descrito.

El método puesto a punto en esta Tesis, basado en el de Hedley et al. (1983), es técnicamente muy similar al descrito por Ciancio et al. (1993), con pequeñas diferencias en cuanto a la duración de la disgregación enzimática y distinguido, sobre todo, por el procedimiento de la tinción fluorescente del DNA, mediante un sistema semiautomático (DNA-Prep) desarrollado muy recientemente y previamente evaluado en nuestro laboratorio (Juan et al., 1991).

Las principales ventajas técnicas del método utilizado radican en la elevada calidad de la tinción del DNA que proporciona el sistema semiautomático y la posibilidad de hacerla compatible con el marcaje de las proteínas nucleares con FITC e, hipotéticamente, de otras estructuras o moléculas que puedan haberse mantenido intactas durante el proceso de la fijación del tejido tumoral inicial. El resultado de un estudio paralelo, utilizando

este método para el análisis de DNA y proteínas nucleares en carcinomas microcíticos de pulmón, ha sido presentado muy recientemente (Peris, 1994).

El objetivo fundamental de la puesta a punto del método ha sido el de poder determinar, de forma relativamente sencilla, parámetros bioquímicos nucleares, como el contenido en DNA y el contenido total de proteínas en núcleos individuales aislados a partir de tumores parafinados, un material patológico en el que la correlación entre ambos parámetros no se encontraba descrita en la literatura en el momento de iniciarse este trabajo. La determinación de esta correlación podría ser, en principio, aplicada a dos tipos de estudio:

a) Aportación al conocimiento básico de aspectos bioquímicos de los núcleos tumorales, fundamentalmente con respecto al análisis de los fenómenos relativos a la aneuploidía, quiescencia, proliferación y muerte celular, con la posibilidad de aplicarlos en material fijado en condiciones que permiten el análisis morfológico o inmunohistoquímico.

b) Aplicación pronóstica a la predicción del comportamiento de tumores humanos, bien de forma independiente, o en asociación estadística con otros parámetros histológicos, patológicos y clínicos. La práctica común de la fijación inmediata de biopsias, punciones y piezas quirúrgicas en los servicios de Oncología y la existencia de importantes archivos de bloques conservados en los laboratorios de Anatomía Patológica, permite aplicar este método tanto a estudios prospectivos como retrospectivos.

En el presente trabajo se ha desarrollado ambas líneas de aplicación, como demuestran los resultados obtenidos. Por una parte, se ha investigado ciertos aspectos básicos de la relación DNA/proteínas nucleares mediante citometría de flujo, utilizando el método descrito y extendiendo los resultados al análisis inmunohistoquímico de la expresión de una proteína específica, relacionada con la replicación del DNA, como es el PCNA, una de las subunidades reguladoras de la DNA polimerasa- δ (Celis, 1984; Tan et al, 1987).

Por otra parte, se ha determinado el poder predictivo de los tres parámetros bioquímicos nucleares analizados, mediante un estudio estadístico múltiple de correlación con diferentes parámetros clínicos, histológicos y patológicos.

1.6. Interés del estudio pronóstico de los tumores de cabeza y cuello.

Los estudios se han llevado a cabo sobre tumores laríngeos fijados y parafinados. La elección de dicho material patológico ha sido condicionada por dos hechos fundamentales. En primer lugar, la experiencia previa en el análisis citométrico del DNA en tumores laríngeos, tanto en piezas fijadas y parafinadas como en tumores congelados (Barona, 1993). En segundo lugar, la escasez de estudios como el aquí presentado y sus predecesores (Barona, 1991) realizados exclusivamente sobre carcinomas de laringe. Así, de los diecisiete estudios recogidos por Visscher y Crissman (1993) (**Tabla 7**) y que abarcan los años 1982-91, sólo cuatro de ellos (con menos del 10% de los casos totales) se refieren a carcinomas de laringe. En el resto de los estudios se describen un total de 1269 tumores enunciados como de la cavidad oral o la nasofaringe y agrupados heterogéneamente. La mayor parte de estos estudios se realizaron sobre material de archivo, procesado para citometría de flujo mediante el método de Hedley et al. o sus variantes (Visscher y Crissman, 1993).

El amplio grupo de carcinomas epidermoides de cabeza y cuello es uno de los conjuntos tumorales más heterogéneos desde el punto de vista clínico y patológico. El pronóstico es altamente variable y depende, actualmente, de múltiples factores complejos e interrelacionados, fundamentalmente el estadio y la morfología. El estadiaje T.N.M. es la clasificación más utilizada (Sisson y Pelzer, 1985), aunque presenta importantes desventajas, como su complejidad (implica modificaciones según la localización del tumor e incorpora hallazgos clínicos, como la movilidad del tumor) y, sobre todo, el hecho de que tumores del mismo estadio pero con diferentes localizaciones primarias en cabeza y cuello pueden tener diferente pronóstico (Visscher y Crissman, 1993; Barona, 1991).

Las limitaciones del estadiaje T.N.M. justifican el interés de aportar nuevos parámetros, objetivos y técnicamente adecuados, al estudio pronóstico de los carcinomas de cabeza y cuello. Sin embargo, la complejidad clínica y las dificultades técnicas para la disociación de este tipo de tumores explica la relativa escasez de datos disponibles en cuanto a los parámetros analizables por citometría de flujo. Así, aunque el valor del contenido en DNA y del índice de proliferación parecen correlacionados con la supervivencia, todavía necesitan ser evaluados inequívocamente.

TABLA 7. RESUMEN DE LOS ESTUDIOS CITOMETRICOS EN CARCINOMAS DE CABEZA Y CUELLO.

AUTOR	LOCALIZACION	TIPO DE TEJIDO (CV MEDIO)	NUMERO DE ANEUPLOIDE/TOTAL (%)
Johnson (1985)	Variada	Tejido parafinado	32/73 (44%)
Goldsmith (1986)	Laringe	Tejido parafinado (8.1%)	31/48 (65%)
Farrar (1987)	Cavidad oral	Tejido parafinado	72/195 (37%)
Kaplan (1988)	Variada	Tejido parafinado (<10%, pico medio)	19/46 (63%)
Kokal (1988)	Variada	Tejido parafinado	48/76 (63%)
Ensley (1989)	Variada	Tejido fresco (3.4%)	181/291 (62%)
Hemmer (1990)	Cavidad oral	Tejido fresco (3.4%)	80/110 (73%)
Costello (1990)	Nasofaringe	Tejido parafinado (6.2%)	33/55 (60%)
Xiao-li (1990)	Cavidad oral	Tejido parafinado	41/70 (59%)
Rua (1991)	Laringe	Tejido parafinado	89/133 (67%)
Kearsley (1991)	Variada	Tejido parafinado (4.5%)	115/172 (67%)
Barona (1991)	Laringe	Tejido parafinado	10/65 (15%)

1.7. Características generales del estudio.

El presente estudio, con un total de 144 tumores analizados, a partir de un muestreo inicial de 163, es el más amplio en tumores de laringe descrito hasta la fecha, seguido por el estudio de Rua et al. (1991), con un total de 133 tumores analizados. Este número de tumores es, incluso, relevante si se compara con los estudios que han utilizado tumores de muy diferentes localizaciones en la cavidad oral y que ocupan un rango de 46 a 291 tumores analizados (Visscher y Crissman, 1993). El elevado número de muestras conseguidas en el presente estudio demuestra el interés de la coordinación multicéntrica a la hora de desarrollar estudios de factores pronóstico, retrospectivos o prospectivos, con tumores de baja frecuencia de aparición o seleccionados por algunas de sus características clínicas (localización, estadiaje, tipo de terapia, etc.).

El porcentaje de tumores técnicamente aprovechables fue alto, un 88.4%, indicando la adecuada fijación y conservación de los bloques en los archivos correspondientes. Como demuestra Hedley (1989) éste es el factor que afecta fundamentalmente a la calidad de la preparación y su utilidad para el análisis por citometría de flujo. De hecho, en un estudio predecesor del aquí presentado, se observó excelentes coeficientes de variación tanto en histogramas generados a partir de bloques recién parafinados como con más de catorce años de almacenamiento (Barona, 1991).

En el análisis por citometría de flujo se utilizaron dos instrumentos de muy distinta concepción. Uno de ellos, un separador celular con tres láseres y manejo complicado, destinado fundamentalmente a la investigación, y el segundo, un citómetro mucho más sencillo, con un sólo láser y manejo semiautomático, destinado principalmente al uso clínico de rutina. Los resultados obtenidos fueron idénticos en ambos instrumentos, lo que demuestra la posibilidad de aplicar el método desarrollado en estudios que se pueden llevar a cabo en muchos laboratorios clínicos, dotados de citómetros sencillos.

1.8. Características clínicas de los casos analizados.

a) Edad: La media de edad de los pacientes del estudio fue de 58.4 \pm 10.3 años, con un rango de 33 a 86 años. Esta distribución es semejante a la descrita por otros autores en tumores glóticos y supraglóticos (Soo et al., 1988; Barthez et al., 1990).

En el presente estudio y en la mayor parte de los previamente publicados, (Bhatia, 1977; Clarke, 1982; Negus, 1948) la edad no presenta correlación significativa con la supervivencia, aunque algunos estudios atribuyen mejor pronóstico a los pacientes jóvenes (Cachin, 1975; Huygen, 1980; Lauerma, 1967).

b) Sexo: Todos los pacientes del estudio fueron varones, dato que es consistente con la rara descripción de estas neoplasias en mujeres (Barthez, 1990, Lauerma, 1967), aunque se ha señalado una tendencia al aumento de la frecuencia de estos tumores en la población femenina (McQuirt, 1983).

c) Grado de T: Ha resultado imposible comparar el porcentaje de tumores en cada grado de T de la serie con los de otros autores, debido a las grandes diferencias de criterio en la indicación del tratamiento quirúrgico o radioterápico en carcinomas laríngeos (Barona, 1991). En la serie fueron más abundantes los tumores de grado T1.

En el estudio se ha encontrado una correlación significativa del grado de T con la supervivencia, siendo peor el pronóstico a medida que aumenta el grado de T, lo que coincide, a grandes rasgos, con la tendencia descrita (Bocca, 1983), a pesar de las importantes diferencias de criterio en la aplicación del sistema T.N.M. a la clasificación de estos tumores (Visscher y Crissman, 1993).

d) Localización: Los dos tercios de los tumores fueron de localización supraglótica y una tercera parte, de localización glótica. Aunque se ha afirmado que los tumores glóticos tienen mejor pronóstico que los supraglóticos (Alexander, 1966; Lauerma, 1967; Gerling, 1968), no se encontró correlación significativa entre localización y supervivencia en el estudio presente.

e) Grado de N: El estadio ganglionar está considerado como el mejor indicador pronóstico en carcinomas de laringe (Levendag, 1987; Lute, 1990; Wall, 1985), a pesar de una cierta frecuencia de falsos negativos clínicos, que en estudios previos (Barona, 1991) fue de tan sólo el 6% para este tipo de tumor.

En la serie actual, el grado de N tuvo valor predictivo, siendo peor pronóstico un mayor grado de N, de acuerdo con los datos de la literatura citados.

f) Estadío T.N.M.: La supervivencia global de la serie (73% de pacientes vivos a los cinco años) en un rango de 16 años, fue comparable a la descrita en otros estudios (Bocca, 1983, Spaulding, 1986; Ogura, 1980). La clasificación por el sistema T.N.M. mostró una correlación estadísticamente significativa entre un mayor estadio T.N.M. y una peor supervivencia, como cabía esperar por los resultados de los estudios publicados.

g) Seguimiento clínico:

Todas las anteriores consideraciones permiten afirmar que la serie de tumores del presente estudio es representativa en cuanto a los tumores de laringe, por el número de ellos analizado y por la consistencia de las características clínicas con las de otros estudios similares publicados previamente. Igualmente, no se ha observado en la serie ningún factor cuyo sesgo pudiera afectar selectivamente a la supervivencia de los pacientes del estudio.

2. PARAMETROS BIOQUIMICOS EN LOS NUCLEOS TUMORALES.

2.1. Contenido de DNA.

El simple hecho de determinar el contenido de DNA en núcleos individuales permite obtener una valiosa información acerca de la presencia de poblaciones con un contenido basal de DNA anormal (tumores aneuploides) y sobre la actividad proliferativa celular (células en fase de síntesis).

La información debe ser extraída a partir de los histogramas de

distribución de DNA, como los mostrados en las Figs. 5 y 6, mediante el análisis matemático de los mismos. Para ello, se emplean distintos modelos que ajustan los porcentajes de las fases individuales del ciclo celular a la distribución observada. En muchas ocasiones, la existencia de poblaciones tumorales complejas requiere la aplicación de modelos matemáticos sofisticados, disponibles en versiones informáticas.

En el presente estudio se ha utilizado un programa de ajuste del ciclo celular de gran potencia resolutive (MultiCycle vs. 3) que nos ha permitido, a partir del análisis citométrico del contenido de DNA:

- a) eliminar la interferencia debida a la presencia de detritos celulares y núcleos seccionados en el proceso de preparación.
- b) calcular el índice de DNA, es decir, el grado de aneuploidia presente en los tumores.
- c) calcular el índice de proliferación, es decir, el porcentaje de células en las fases S+G2+M.
- d) evaluar la bondad estadística de diferentes ajustes en distribuciones de DNA de alta complejidad, en las que fuera difícil discernir el tipo de poblaciones presentes (p.ej., dos ciclos celulares solapados, poblaciones peridiploides o peritetraploides,...).

2.1.1. Índice de DNA.

El 34.7% de los tumores de la serie fueron aneuploides, un porcentaje más bajo que los encontrados en dos estudios previos realizados sobre carcinomas laríngeos fijados, que fueron del 65% (31 sobre 48 casos) (Goldsmith et al., 1986) y del 67% (89 sobre 133 casos) (Rua, 1991), aunque entre el resto de estudios que implican grupos heterogéneos de tumores de cabeza y cuello, con material fijado o fresco, se encuentra algunas series parciales laríngeas con un porcentaje de aneuploidía muy similar al observado en la presente (Johnson et al., 1985; Farrar et al., 1987; Kaplan et al., 1988).

Los factores metodológicos (conservación, preparación, instrumentación) pueden, obviamente, influir en la calidad de la medida del DNA y resultar en una diferente capacidad de detección de aneuploidías. De hecho, estos

factores explicarían la mayor frecuencia de tumores aneuploides observada, en general, en los tumores analizados en fresco, con respecto a los tumores fijados (Visscher y Crissman, 1993). Sin embargo, y dado que las series mencionadas estaban compuestas por tumores parafinados, es más lógico suponer que las diferencias en el porcentaje de aneuploidía entre ellas y la serie en estudio se deban a factores intrínsecos de los tumores que las componen. En este sentido, como recogen Visscher y Crissman (1993), muchos de los estudios muestran una correlación entre un contenido anormal de DNA y el grado del tumor, con una tendencia al incremento de la aneuploidía en los tumores con nódulos positivos y en los tumores de mayor tamaño (mayores grados de T), aspectos que serán discutidos más adelante en relación con la propia serie presentada. Así, las series de Goldsmith et al. y de Rua et al. presentan una elevada proporción de tumores nodo-positivos y de grados T3 y T4. Por otra parte, una serie homogénea de tumores laríngeos, con un 83% de tumores de grado N0 y un 72% en estadios I+II, mostró un porcentaje de aneuploidías mucho más bajo (aprox.15%) (Barona, 1991; Barona et al., 1993).

Los valores de índice de DNA en los tumores aneuploides se distribuyen fundamentalmente en las proximidades del índice 1.5, equivalente al contenido 3C de los tumores triploides, y, con menor frecuencia, en torno al índice 2, correspondiente a los tumores tetraploides, con un contenido 4C de DNA (**Figura 9**). Teniendo en cuenta que en la serie actual, existe un alto porcentaje de tumores diploides (índice e DNA = 1), la distribución de la serie total puede considerarse como trimodal, centrada en los índices 1, 1.5 y 2. Esta observación es consistente con el análisis de Raber y Barlogie (1990), que muestra como en un conjunto de series de tumores de distintas categorías diagnósticas (n = 1172 tumores), la distribución más frecuente del índice de DNA es la trimodal, con picos de mayor frecuencia en los índices 1 (diploides), 1.5 (triploides) y 2 (tetraploides). La única excepción notable fueron los carcinomas microcíticos de pulmón, con una preponderancia de tumores peridiploides.

Aunque Raber y Barlogie no discuten el significado de su observación, es verosímil que las distribuciones trimodales pudieran estar, en cierto modo, relacionadas con el proceso de adquisición de aneuploidías en los tumores sólidos. Así, aunque, los mecanismos de aneuploidización distan de estar resueltos, los dos principales modelos propuestos invocan un papel importante de los fenómenos de endoreduplicación (tetraploidización) y pérdida de material cromosómico (Shackney et al., 1989) y a la asimetría en la mitosis (Giaretti, 1993).

La presencia de aneuploidía en tumores analizados por citometría de flujo se considera como un factor de mal pronóstico en general (Raber y Barlogie, 1990), aunque en tumores de cabeza y cuello existe una gran discrepancia sobre el valor pronóstico de dicho parámetro. Así, mientras que en el conjunto de estudios revisados recientemente por Visscher y Crisman (1993) los pacientes con tumores diploides mostraron una supervivencia claramente superior a los pacientes con tumores aneuploides (59% frente a 36% de pacientes vivos a los cinco años), dos de los tres estudios específicos con tumores laríngeos publicados hasta la fecha sugieren una posible ventaja de los pacientes con tumores aneuploides en cuanto a la supervivencia. Goldsmith et al. (1986) observaron una mayor supervivencia a los dos años en pacientes con tumores aneuploides (87% frente a 47% en diploides), aunque estos tumores fueron de grado superior a los diploides. Un resultado consistente es el de Barona (1991) que muestra una evolución clínica similar en pacientes con tumores aneuploides o diploides, a pesar de las diferencias en el estadiaje en ambos grupos. Para estos autores, la explicación de sus observaciones radica en una mayor sensibilidad de los tumores aneuploides a la terapia, en ambos casos, radiológica. En este sentido, varios estudios muestran una correlación entre un mayor contenido en DNA y una mayor sensibilidad al tratamiento radioterápico (Franzen et al., 1986; Ensley et al., 1989) y quimioterápico con cis-platino (Cooke et al., 1990).

En el presente estudio, no se ha encontrado correlación estadísticamente significativa entre el índice de DNA y ninguno de los

parámetros histológicos y clínicos de los tumores analizados. Igualmente, por sí mismo no mostró correlación con la supervivencia, aunque en el estudio multivariante fue la tercera variable en poder discriminador con respecto a la supervivencia.

A pesar de que el valor del índice de DNA no se comporta estadísticamente como factor de predicción, este parámetro tiene un claro significado en la biología tumoral, puesto que clasifica a los tumores en dos grupos, diploides y aneuploides, que, como categorías contrapuestas, tienen, en general, características histopatológicas y comportamientos clínicos diferentes, como ponen de manifiesto numerosos estudios (para una revisión actualizada, véase Bauer et al. (1993). Al estudiar estadísticamente la características histológicas en categorías de tumores del presente estudio se observaron diferencias significativas en dos parámetros indicadores de tendencia en la agresividad tumoral, concretamente en la presencia de infiltración en los márgenes quirúrgicos (**Figura 25,**) y en el grado de diferenciación (**Figura 28**).

La significación de la infiltración microscópica de márgenes quirúrgicos mayor en el grupo aneuploide es de difícil evaluación, si se tiene en cuenta que los márgenes de seguridad en la resección del tumor son establecidos por el cirujano. Además, el porcentaje total de tumores con infiltración de márgenes quirúrgicos fue relativamente escaso (12%). La mayor frecuencia de infiltración en los aneuploides podría derivar, en principio, de un mayor tamaño del tumor, por lo que la detección pre-quirúrgica de aneuploidía en un tumor (p. ej. por punción aspiración con aguja fina y análisis por citometría de flujo), podría recomendar el ampliar los márgenes quirúrgicos.

En cuanto a la distribución del grado de diferenciación en los grupos diploide y aneuploide de la presente serie, muestra una relación significativa entre ploidía y grado de diferenciación. Los tumores diploides tienden a un mayor grado de diferenciación y los aneuploides hacia un menor grado. Del mismo modo, en los tumores mejor diferenciados son más frecuentes las formas diploides y en los peor diferenciados, las aneuploides.

Distintos estudios recientes en tumores de cabeza y cuello han comparado el grado de diferenciación con el grado de ploidía nuclear (Visscher y Crismann, 1993). En este tipo general de tumores es de gran importancia dicha evaluación, por la demostrada relación inequívoca entre morfología y pronóstico. Los resultados globales y el específico de Rua et al. (1991) con tumores de laringe, muestran la relación de la aneuploidía con la baja diferenciación histológica, como cabe esperar, en función de las notables correlaciones entre histopatología y citometría de flujo demostradas en la mayor parte de sistemas tumorales grado-dependientes (Visscher y Crismann, 1993).

2.1.2. Índice de proliferación.

La capacidad proliferativa de un tumor puede estimarse en los histogramas generados en el análisis citométrico de flujo, mediante el cálculo del porcentaje de núcleos que se encuentran en la fase S o, bien, en el conjunto de las fases S+G2+M, denominado este último como índice de proliferación. En los estudios con tumores parafinados es mucho más fiable el uso del índice de proliferación para la estimación de la velocidad de crecimiento tumoral que la propia fase S, más susceptible a interferencias debidas al ruido de fondo o al mal ajuste matemático (Rabinovitch, 1993).

El porcentaje de células en fase S o el índice de proliferación no tienen todavía un valor pronóstico claro, en relación con la supervivencia de los pacientes con distintos tipos de tumores, aunque una elevada actividad proliferativa se considera mal pronóstico en diferentes neoplasias (Raber y Barlogie, 1994; Bauer, 1993).

La relativa escasez de datos experimentales respecto a este parámetro se deben, fundamentalmente, a las dificultades técnicas que puede implicar su determinación derivadas de los procesos de preparación de la muestra y de ajuste matemático del ciclo celular a la distribución de DNA observada. Esta carencia de datos sobre proliferación se muestra igualmente en los estudios con tumores de cabeza y cuello, aunque Johnson et al. (1985) indicaron una correlación positiva entre pobre diferenciación y elevado índice de proliferación en tumores de cabeza y cuello estratificados por su contenido en DNA.

La distribución del índice de proliferación en la serie fue altamente heterogénea, especialmente entre los tumores aneuploides (**Figura 10**), como ha sido también descrito por Raber y Barlogie (1990) para 1172 tumores de diversos tipos. En las distribuciones descritas por estos autores, no se detectaron patrones específicos para distintos tipos tumorales ni hubo diferencia entre tumores primarios y metástasis.

La heterogeneidad proliferativa de la presente serie no estaba relacionada con el grado de aneuploidía, puesto que no se observó correlación estadística entre el índice de proliferación y el índice de DNA (**Tabla 2**). Sin embargo, una correlación positiva entre ambos parámetros se ha mostrado en otros estudios con tumores heterogéneos (Johnson et al., 1981; Raber y Barlogie, 1990). Tal correlación, sin embargo, parece limitarse a los tumores con índices de DNA entre 1 y 2, mientras que la mayoría de tumores tetraploides presentan un índice de proliferación menor que los tumores aneuploides de elevado índice de DNA. Las diferentes relaciones entre ploidía y proliferación podrían representar diferencias biológicas entre diversos tumores.

El índice de proliferación por sí mismo no tuvo valor estadísticamente significativo como parámetro pronóstico en el análisis univariante (**Tabla 6**), aunque sí mostró cierta tendencia a clasificar los pacientes, como muestra la curva de Kaplan-Meier de la **Figura 30**, trazada para un punto de corte ("cut off") de un índice de proliferación del 25%. Se observa que mientras la supervivencia de los pacientes con menor índice, se estabiliza en un 70% a partir de los cinco años, en los pacientes con mayor índice, la supervivencia desciende hasta un 45% a los 10 años.

2.2. Proteínas nucleares totales.

Como se ha discutido inmediatamente antes, el análisis monoparamétrico del contenido de DNA en núcleos individuales genera información de gran interés pronóstico basada en la ploidía y en la capacidad proliferativa tumoral. Sin embargo, el conocimiento de otros componentes nucleares, fundamentalmente proteínas, relacionados con la replicación, transcripción y empaquetamiento de

los cromosomas, debe aportar, en principio, mucha más información básica y aplicada, si se ejecuta en asociación multiparamétrica con el estudio del contenido en DNA (Darzynkiewicz y Traganos, 1990).

En cuanto a las proteínas nucleares, aproximadamente el 50% de la cromatina está formada por histonas, cuya síntesis está acoplada estrictamente a la síntesis de DNA, mientras que las proteínas no histónicas (aprox. 1.500), son proteínas enzimáticas o auxiliares en la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas con función reguladora (Darzynkiewicz, 1993).

El contenido en proteína nuclear total se duplica durante el ciclo celular y, por otra parte, el contenido proteico de los núcleos quiescentes es menor que el de las células proliferantes, a igualdad de contenido de DNA. Específicamente, la relación histonas/DNA permanece constante a lo largo del ciclo celular, mientras que las proteínas no histónicas son sintetizadas independientemente de la replicación del DNA y contribuyen a alterar la relación proteínas:DNA en determinadas fases del ciclo celular (Darzynkiewicz, 1990).

El interés de la determinación de proteínas nucleares por citometría de flujo es el de aportar un nuevo parámetro de valor diagnóstico y de estadiaje tumoral. Hay que tener en cuenta que para efectuar ambos se usan a menudo parámetros basados en el análisis de la morfología nuclear y la forma, textura y condensación de la cromatina, que pueden reflejar en la examinación subjetiva aspectos bioquímicos básicos relacionados con la función y la concentración de proteínas nucleares.

2.2.1. Contenido medio en proteínas nucleares totales.

La distribución del contenido medio en proteínas totales fue marcadamente heterogénea (**Figura 11**) y no difirió significativamente en valor medio ni en heterogeneidad entre los tumores diploides y aneuploides, como cabría, por otra parte esperar, ya que al expresar el contenido medio se está incluyendo las poblaciones diploide y aneuploide que coexisten en algunos tumores. Por otra parte, este parámetro global no presentó por sí mismo valor pronóstico en el análisis univariante, ni en el multivariante, probablemente por la heterogénea distribución observada. Sin embargo, la curva de Kaplan-Meier para la

supervivencia total de la **Figura 31** muestra una cierta tendencia a que el grupo de pacientes con tumores de mayor contenido medio de proteínas totales tenga una menor supervivencia, especialmente a largo plazo (punto de corte: 16.5 unidades arbitrarias de fluorescencia de FITC, sobre un máximo posible de 64 unidades).

2.2.2. Contenido en proteínas nucleares totales en las distintas fases del ciclo celular.

La capacidad multiparamétrica de la citometría de flujo permite conocer la distribución de un componente celular en función de otros parámetros. De esta forma, se pudo determinar el contenido de proteínas en núcleos identificados por su contenido en DNA, indicativo de su posición en el ciclo celular. En algunos casos, este tipo de análisis no se pudo realizar por las características de la distribución de DNA, con poblaciones diploides y aneuploides solapadas, impidiendo la resolución de fases individuales. En el resto de los tumores, se pudo determinar por separado el contenido de proteínas nucleares en las fases G0/G1, S y G2+M, así como en el conjunto de fases que definen el índice de proliferación, S+G2+M.

El contenido en proteínas totales aumentó desde G0/G1 hasta G2+M, como cabía esperar según los datos de la literatura (Darzynkiewicz, 1990) y su distribución fue más homogénea en cada una de las fases, especialmente en la fase G0/G1 que en el conjunto total del ciclo. Sin embargo, teniendo en cuenta que la selección por el contenido de DNA fue restringida (1-2 canales de fluorescencia), los resultados indican una heterogeneidad intrínseca del contenido en proteínas nucleares. Esta heterogeneidad podría deberse a la variable expresión de las proteínas no histónicas, cuya síntesis no se encuentra acoplada a la de DNA (Darzynkiewicz, 1990).

A pesar de la heterogeneidad, el contenido de proteínas nucleares totales fue significativamente mayor en los tumores aneuploides que en los diploides, para cada una de las fases del ciclo. Este resultado es consistente con la observación de Ciancio et al. (1993) en tumores parafinados, de un mayor contenido de proteínas en núcleos aneuploides con respecto a los diploides,

aunque su estudio se limita a la comparación de picos aneuploides cercanos al pico G0/G1 diploide.

Es interesante el hecho de que exista una buena correlación estadística entre los niveles de proteínas en distintas fases del ciclo (**Tablas 2-4**), pues ello podría facilitar el uso pronóstico de este parámetro bioquímico nuclear, en los casos en que la distribución compleja del contenido de DNA impidiera la selección adecuada de algunas fases concretas del ciclo para la determinación de su nivel de proteínas.

Los niveles de proteínas nucleares totales, tanto en su valor medio como separados por fases del ciclo no se correlacionaron significativamente con otros parámetros histológicos o clínicos. Igualmente, no se encontró significación estadística en el análisis univariante referido al valor pronóstico de los parámetros de proteína nuclear, ni como parámetro asociado en el estudio multivariante. Sin embargo, las curvas de Kaplan-Meier (1958) para la supervivencia total de los grupos de pacientes clasificados por el contenido de proteínas en diferentes fases del ciclo (con diferentes puntos de corte), muestran una tendencia a una peor supervivencia a largo plazo de los pacientes con tumores de mayor contenido de proteínas en cada fase del ciclo.

2.2.3. Significado y valor pronóstico del índice de proteínas.

El análisis del contenido de proteínas nucleares frente a la ploidía mostró que los núcleos aneuploides tuvieron un mayor nivel de proteína que los diploides. Teniendo en cuenta que, en el análisis citométrico con muestras desparafinadas se toma, por definición, como diploide el pico G0/G1 de menor contenido de DNA, la indicada observación podría reflejar únicamente la estrecha asociación entre las proteínas estructurales de la cromatina y el contenido cromosómico en cada núcleo (Darzynkiewicz, 1990). Si ello fuera cierto, la variación del contenido proteico referida al contenido de DNA debería ser la misma en un núcleo aneuploide que en un núcleo diploide con un contenido de DNA idéntico. Con el fin de establecer esta comparación en todos los casos analizados e, incluso, poder comparar con los datos obtenidos en otros laboratorios, se llevó a cabo un proceso de normalización de los datos.

Para ello, se propone el término "índice de proteínas", por analogía con el de índice de DNA. El índice de proteínas se entiende como el cociente entre el contenido de proteínas nucleares (expresado en unidades arbitrarias) del pico G0/G1 aneuploide y el del pico G0/G1 diploide del mismo tumor y es una expresión adimensional, como lo es el índice de DNA, cociente entre el contenido de DNA del pico G0/G1 aneuploide y el del pico G0/G1 diploide del mismo tumor (o de un control diploide adecuado, cuando técnicamente es posible).

El índice de proteínas, por lo tanto, es un parámetro propio de cada tumor, que permite comparar los niveles proteicos de picos diploides y aneuploides de diferente índice de DNA y cuya expresión adimensional hace posible la comparación de datos obtenidos por métodos citométricos de tinción o instrumentación diferentes.

Al representar la variación del índice de proteínas frente al índice de DNA de los tumores aneuploides de la serie se observó la aparición de dos subpoblaciones distintas (**Figura 16(B)**). En la más numerosa, el índice de proteínas se mantiene casi constante alrededor de 1, con independencia del índice de DNA del pico aneuploide. En esta población mayoritaria, por lo tanto, la concentración de proteínas de los núcleos en G0/G1 aneuploides es similar a la de los núcleos diploides en G0/G1 del mismo tumor.

En la segunda subpoblación, menos numerosa, el índice de proteínas es mayor que en la subpoblación anterior, y aumenta con el índice de DNA del pico aneuploide, es decir, en estos tumores, la concentración de proteínas de los núcleos G0/G1 sí está relacionada con su contenido en DNA, aunque la correlación estadística indicada por la recta de regresión no sea muy alta ($r = 0.720$), posiblemente por el escaso número de tumores incluidos. En esta subpoblación, la relación entre el índice de proteínas y el índice de DNA es superponible a la relación análoga, expresada como el cociente entre el nivel de proteínas en núcleos en fase G0/G1, S, y G2+M y el nivel de proteínas en la fase G0/G1 (equivalente, por tanto, al índice de proteínas de cada fase) y representada frente al contenido relativo de DNA (equivalente, por tanto, al índice de DNA) (**Figura 16(B)**). Esta superposición indica que en esta subpoblación

tumoral, la concentración de proteína de los núcleos G0/G1 aneuploides es similar a la que presentarían núcleos diploides con la misma cantidad de DNA.

Con respecto a la variación de la concentración de proteínas nucleares a lo largo del ciclo celular en los tumores diploides (**Figura 16(A)**), se puede comprobar que el nivel de proteínas no aumenta apenas desde la mitad de la fase S hasta la fase G2+M, observación que, en principio no es consistente con los datos de la literatura, que muestran un aumento constante desde G0/G1 hasta G2, antes de la mitosis (Darzynkiewicz, 1990). Es posible que esta discrepancia se deba a la diferente abundancia de células en G2 y M entre la serie de tumores analizados y los modelos celulares de proliferación in vitro en los que más frecuentemente se ha estudiado la variación de proteínas nucleares. Así, las células en mitosis, presentan un menor contenido en proteínas asociadas a los cromosomas (Roti-Roti et al., 1985), por lo que una mayor abundancia de células en fase M dentro del conjunto de células G2+M, indistinguibles por su contenido en DNA, desplazaría el contenido de proteínas hacia un valor medio más bajo.

Aunque los mecanismos moleculares que explican las diferencias en el contenido nuclear de proteínas entre las dos subpoblaciones no han sido investigados todavía, es importante destacar el posible valor pronóstico de esta observación que clasifica a los tumores en dos grupos con diferentes características clínicas e histológicas. Así, la población en la que el índice de proteínas es mayor que 1 está compuesta casi exclusivamente por tumores de localización supraglótica, de comportamiento más agresivo que los tumores glóticos (Barona, 1991). Además, el grado de T tendió significativamente a ser más elevado en esta subpoblación, siendo éste un parámetro asociado con peor pronóstico (Barona, 1991; Visscher y Crissmann, 1993). Igualmente, entre los parámetros histológicos, los indicadores de peor pronóstico son más frecuentes en esta subpoblación: mayor frecuencia de ulceración, tendencia al polimorfismo celular, elevado número de mitosis y, sobre todo, un menor grado de diferenciación, parámetro que ha resultado el mejor indicador de mal pronóstico en esta serie.

La significación estadística del valor predictivo del índice de proteínas no ha podido ser evaluada en el presente estudio, por el relativamente bajo número de tumores en la subpoblación de alto índice. Sin embargo, la mayor frecuencia en ella de los factores de mal pronóstico indicados apoya el posible interés del estudio sistemático de tal parámetro que, por otra parte, se deriva directamente de los datos citométricos obtenidos, es simple de calcular y permite la normalización de resultados, importante para establecer comparaciones objetivas entre distintas series tumorales y entre resultados de distintos laboratorios.

2.3. Expresión de PCNA.

La detección y cuantificación de proteínas nucleares específicas relacionadas con el mecanismo enzimático o la regulación de la replicación del DNA se está mostrando como muy interesante para la evaluación de las propiedades proliferativas de poblaciones tumorales y su posible implicación pronóstica (Darzynkiewicz, 1993).

En la serie actual se ha analizado la expresión de PCNA como marcador específico de células en proliferación. Este antígeno es una proteína auxiliar de la DNA polimerasa- δ que aparece durante la fase S y se puede revelar mediante el uso de anticuerpos monoclonales (Celis et al., 1984; Kurki et al., 1988). La expresión de PCNA se correlaciona bien con la de otras proteínas asociadas con la proliferación, como el antígeno Ki-67 (Dawson et al., 1990).

El estudio de la expresión del PCNA muestra que el porcentaje de células con expresión positiva no parece tener significación pronóstica. Así, aunque puede ser un marcador de proliferación celular, puesto que el 92% de los tumores diploides y el 95% de los aneuploides lo expresan, el porcentaje de células positivas fue similar en ambos y no se relacionó con la supervivencia en los análisis uni- y multivariante.

3. VALOR PRONOSTICO DE LOS PARAMETROS CLINICOS E HISTOLOGICOS.

Además de determinar el posible valor pronóstico de los parámetros bioquímicos nucleares, el presente estudio ha permitido analizar el impacto de otros factores predictivos, más establecidos en la clínica oncológica, sobre la supervivencia de los pacientes. El análisis univariante muestra que los grados de T, N y estadio T.N.M. y el grado de diferenciación, permiten clasificar a los pacientes en grupos de supervivencia distinta (**Figuras 36-39**). Así, los pacientes con tumores en grado T1 presentan una supervivencia mucho mayor que los pacientes de los restantes grupos, como ocurre de forma más marcada cuando se comparan los grupos N0 y el conjunto N1+N2. La supervivencia de los pacientes clasificados con arreglo al estadio T.N.M. disminuye a medida que aumenta este. Por último, la separación de pacientes en dos grupos de escaso+moderado y de alto grado de diferenciación muestra una supervivencia significativamente mayor para los del primer grupo. Los resultados acerca del valor pronóstico de estos parámetros coinciden con los de estudios similares previos (Lutz et al., 1990; Spaulding et al., 1986; Barona, 1991; Barona et al., 1993).

Es posible que la adición de parámetros bioquímicos como los descritos en el presente estudio pueda aumentar la capacidad pronóstica de los parámetros clásicos cuando se apliquen a series limitadas, estratificadas por variables clasificatorias que por sí mismas tengan escaso poder predictivo. Para evaluar la importancia de esta estrategia es importante el poder desarrollar estudios multicéntricos en los que se obtengan un número elevado de tumores, así como desarrollar nuevas metodologías citométricas que amplíen el análisis multiparamétrico a otros componentes nucleares y celulares que informen no sólo de la biología intrínseca del tumor sino de la sensibilidad de sus células a la terapéutica farmacológica y física.

CONCLUSIONES

1. El presente estudio multidisciplinar y multicéntrico es el mayor descrito hasta el momento de los estudios comparables, realizados sobre carcinomas de laringe.
2. Se ha puesto a punto un método para el análisis simultáneo de DNA y proteínas totales en suspensiones nucleares procedentes de tumores fijados y parafinados.
3. Los parámetros bioquímicos nucleares derivados del análisis del contenido de DNA, proteínas totales y antígeno PCNA no se correlacionaron con los parámetros clínicos e histológicos.
4. Los parámetros bioquímicos por sí mismos no tuvieron valor estadísticamente significativo en la predicción de la supervivencia, aunque el índice de proliferación y los niveles de proteínas totales en diferentes fases del ciclo muestran una tendencia a clasificar los pacientes en grupos, con peor supervivencia a medida que aumenta el índice de proliferación y el contenido de proteínas.
5. Se propone el índice de proteínas como expresión normalizada del contenido de proteínas nucleares totales en los picos G0/G1 de los tumores aneuploides, para permitir la comparación objetiva de este parámetro entre diferentes estudios.
6. La representación del índice de proteínas frente al índice de DNA separa dos subpoblaciones de tumores con diferentes características clínicas e histológicas asociadas con un posible valor pronóstico.

7. Los parámetros clínicos grado de T, grado de N y estadio T.N.M. y el parámetro histológico grado de diferenciación tuvieron valor pronóstico significativo, con peor supervivencia a medida que aumentan los grados de T, N, y estadio T.N.M. y a medida que disminuye el grado de diferenciación.

BIBLIOGRAFIA

ALEXANDER E.W. y CASSADY C.L.: Laryngeal carcinoma staging and end results. Arch. Otolaryngol., 1966; pag. 112-116.

ALVAREZ A.: Applications of Flow Cytometry. Third meeting of the Iberian society of cytometry. Porto, 1993.

ARNOLD J.: Beobachtungen über Kerteilungen normalen und pathologischen bedingungen. Virchows Arch. Pathol. Anat., 1879; 77 : pag. 181-206.

ARTHUR T.: "Scientific American Medicine". Rubens E., Federman D. eds. Scientific American Inc. N. York, 1987.

ATKIN NB., RICHARDS BM.: Deoxyribonucleic acid in human tumors as measured by microspectrophotometry of Feulgen Stain. A comparison of tumors arising at different sites. Br. J. Cancer, 1956; 10: pag. 769-786.

BAGWELL C.B.: Theoretical aspects of flow cytometry data analysis. Clinical flow cytometry: principles and application, Bauer K. et al. 1993: pag. 41-46.

BAGWELL C.B., MAYO S.W., WHESTONE S.D.N. et al.: DNA histogram debris theory and compensation. Cytometry, 1991; 12: pag. 107-118.

BALLANTYNE K.C., JAMES P.D., ROBINS C.E. et al.: Flow cytometric analysis of DNA content of gastric cancer. Br. J. Cancer., 1987; 56: pag. 251-254.

BARLOGIE B.: Abnormal Cellular DNA content as a marker of neoplasia. Eur. J. Cancer clin. Oncol., 1984; 9: pag. 1123-1125.

BARLOGIE B., JOHNSTON D.A., SMALLWOOD L., RABER M.N., MADDOX A.M., LATREILLE J., SWARTZENDRUBER D.E. y DREWINKO: Prognostic implications of ploidy and proliferative activity in human solid tumors. Cancer Genet Cytogenet, 1982; 6: pag. 17-28.

BARONA R.: Aportación al conocimiento del cáncer de laringe tributario de cirugía funcional mediante citometría de flujo. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia, 1991.

BARONA R., MARTORELL M.A., ARMENGOT M., MONTORO A. y MONTORO J.: Analysis of DNA content in supraglottic epidermoid carcinoma. Otolaryngol. Head-Neck, 1993.

BARTUAL J., MARCO J. y SACRISTAN T.: Cáncer faríngeo y faringo-laríngeo. Ed. Garsí, Madrid, 1975: pag. 9-175.

BARTHEZ M., BOLLA M., LAVIELLE J.P. et al.: Les cancers du vestibule laryngé: résultats et indications thérapeutiques à propos de 124 cas. *Revue de Laryngologie*, 1990; 111: pag. 45-49.

BASERGA R.: "Growth in size and cell DNA replication". *Exp Cell Res*, 1984.; 151: pag 1-5.

BAUER K.D.: Analysis of proliferation associated antigens. *Methods Cell Biol*, 1990; 33: pag. 235-248.

BAUER K.D., CLEVINGER C.V., ENDOW R.K. et al.: Simultaneous nuclear antigen and DNA content quantification using paraffin-embedded colonic tissue and multiparameter flow cytometry. *Cancer Res*, 1986; 46: 2428-2434.

BAUER W.C.: Concomitant carcinoma in situ and invasive carcinoma of the larynx In Alberti P.W., Bryce D.P. (eds.): *Workshops from the Centennial Conference of Laryngeal Cancer*. New York, Appleton-Century-Crofts, 1976: pag. 127-136.

BHATIA P.L., GUPTA O.P., SAMANT H.C. et al.: Juvenile epithelial malignancy of head and neck. *J. Otolaryngol*, 1977; 6: pag. 208-214.

BEARS O.H., HENSON D.E., HUTTER R.V.P., MYERS M.H. (eds.): *Manual for Staging of Cancer (AJCC)*. Lippincott Company, Philadelphia, 1987.

BERKALOFF A., BOURGUET J., FAVARD P. y LACROIX J.C.: *Biología y Fisiología celular*. Ed. Omega S.A., Barcelona, 1988; 2: pag. 36-48.

BEVINGTON P.R.: *Data Reduction and Error Analysis for the Physical Sciences*. New York: McGraw-Hill Book Company, 1969.

BISHOP J.M.: Molecular themes in oncogenesis . *Cell*, 1991 ; 64 : pag. 235-258.

BOCCA E., PIGNATARO O. y OLDINI C.: Supraglottic laryngectomy: 30 years of experience. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 1983; 92: pag. 14-18.

BOVERI T.: *Zur Fragen der Entstehung Maligner Tumeoren* S. Gustav Fiszher, 1914: pag 1-64.

BRAVO R. y McDONALD-BRAVO H.: Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle. Association with DNA replication sites. *J. Cell. Biol.*, 1986; 105: pag. 1549-1554.

BRUCE ALBERTS: *Biología molecular de la célula*. Barcelona, 1990. Pag. 655-710.

CACHIN Y.: Cancer Therapy: Prognostic factors and criteria of response. Staquet M.J. Ed. Raven Press, New York; 1975. Pag. 353-366.

CAIRNS J.: The origin of humans Cancer. Nature, 1981.; 289 : pag. 353-357.

CALABUIG C.: Citometría de flujo en el carcinoma de laringe. Correlaciones clínico-patológicas. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia, 1993.

CASPERSSON TO. (ed): Cell Growth and Cell Function. New York, Norton, 1950.

CAUVIN J.M., GUENEL P., LUCE D., BRUGERE J. y LECLERC A.: Occupational exposure and head and neck carcinoma. Clin. Otolaryngol, 1990; 15: pag. 439-445.

CELIS J.E., BRAVO, LARSEN P.M. y FEY S.J.: Cyclin: a nuclear antigen whose level correlates directly with the proliferative state of normal as well as transformed cells. Leukemia Res, 1984; 8: pag. 143-157.

CIANCIO G., OLLACK A. y NORMAN L.: Flow Cytometry Analysis of DNA and Nuclear Protein in Paraffin-Embedded Tissue. Cytometry, 1993; 14: pag. 205-209.

CLARKE R.M., ROSEN I.B. y LAPERRERE N.J.: Malignant tumours of the head and neck in a young population. Am. J. Surg., 1982;144: pag. 459-462.

CLEVENGER C.V., EPSTEIN A.L. y BAUER K.D.: Quantitative analysis of nuclear antigen in interphase and mitotic cells. Cytometry, 1987; 8: pag. 280-296.

COOKE L.D., COOKE T.G., BOOTZ F., FORSTER G., HELLIWELL T.R., SPILLER D. y STELL P.M.: Ploidy as a prognostic indicator in end stage squamous cell carcinoma of the head and neck region treated with cisplatinum. Br. J. Cancer, 1990; 61: pag. 759-762.

CORNELISSE C.J., VAN DE VELDE C.J.H., CASPER R.J.C. et al.: DNA ploidy and survival in breast cancer patients. Cytometry, 1987; 8: pag. 225-234.

COSTELLO F., MASON B.R., COLLINS R.J y KEARSLEY J.H.: A clinical and flow cytometric analysis with nasopharyngeal cancer. Cancer, 1990; 66: pag. 1789-1795.

COX D.R.: Regression models and life tables. J. Roy. Statist. Soc., 1972; 34: pag. 187-220.

CRISSMAN H.A., DARZYNKIEWICZ Z., TOBEY R.A. y STEINKAMP J.A.: Correlated measurements of DNA, RNA and protein in individual cells by flow cytometry. *Science* 228: pag 1321-1324.

CRISSMAN H.A. y STEINKAMP J.A.: Rapid one step staining procedures for analysis of cellular DNA and protein by single and dual laser flow cytometry. *Cytometry*, 1982; 3: pag. 84-90.

CRISSMAN H.A. y STEINKAMP J.A.: Rapid simultaneous measurement of DNA, protein and cell volume in single cells from large mammalian cell populations. *J. Cell. Biol.*, 1973; 59: pag 766.

CRISSMAN H.A., STEVENSON A.P., KISSANTE R.J. y TOBEY R.A.: Techniques for quantitative stainings of cellular DNA for flow cytometry analysis. In: *Flow Cytometry and sorting*, Melamed M.R., Mullaney P.F., Mendelsohn M.L., eds., John Wiley and Sons, New York, 1979; pag 243-261.

DARZYNKIEWICZ Z.: Probing Nuclear Chromatin by Flow Cytometry. *Flow Cytometry and Sorting 2^a Ed*, 1990: pag. 315-340.

DARZYNKIEWICZ Z.: The Cell Cycle. Application of Flow Cytometry in Studies of Cell Reproduction. *Clinical Flow Cytometry*. Eds. Bauer k., Duque R. y Shankey T. 1993: pag. 13-40.

DARZYNKIEWICZ Z.: Metabolic and Kinetic components of the cell cycle distinguished by multiparameter flow cytometry. In. *Growth, cancer and the cell cycle*, Skeham P. Friedman S.J. eds. The Humana Press, 1984;: pag. 249-280.

DARZYNKIEWICZ Z. y TRAGANOS F.: Multiparameter flow cytometry in studies of the cell cycle. In: Melamed MR, Lindmo L, Mendelsohn ML, eds. *Flow cytometry and sorting*. Second edition. New York: Wiley-Liss, 1990 (a): pag 469-501.

DARZYNKIEWICZ Z., TRAGANOS F. y MELAMED M.R.: Detergent treatment as an alternative to cell fixation for flow cytometry. *J. Histochem Cytochem*, 1981; 29: pag. 329-330.

DARZYNKIEWICZ Z., TRAGANOS F. y MELAMED M.R.: New cell cycle compartments identified by multiparameter flow cytometry. *Cytometry*, 1980; 1: pag. 98-108.

DAWSON A.E., NORTON J.A. y WEINBERG D.S.: Comparative assessment of proliferation and DNA content in breast carcinoma by image analysis and flow cytometry. *Am. J. Pathol.*, 1990; 136: pag. 1115-1124.

DENHARDT DT., EDWARDS DR. y PARFETT CLJ.: Gene expression during the mammalian cell cycle. *Biochim. Biophys. Acta*, 1986; 865: pag. 83-125.

DIXON W.J.: *Statistical Software Manual* vol. 1-2. University of California Press 1988. Berkeley.

DOLBEARE F.: Cell cycle measurement with Bromodeoxyuridine and nuclear proliferation antigens. En *DNA cytometric analysis*. A Sampedro editor, Universidad de Oviedo, 1993: pag. 167-193.

DOLBEARE F., GRATZNER H.G., PALLAVICINI M.G. y GRAY J.W.: Flow cytometric measurement of total Dna replication and incorporated bromodeoxyuridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983; 80: pag. 5573-5577.

DRESSLER L., SEAMER L., OWNENS M., CLARK G. y McGUIRE W.: DNA flow cytometry and prognostic factors in 1331 frozen breast cancer specimens. *Cancer.*, 1988; 61: pag. 420-427.

ELLIOTT S.G. y McLOUGGHLIN C.: Rate of macromolecular synthesis through the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978; 75: pag. 4384-4388.

ENGELHARD H.H, BUTLER A.B. y BAUER K.D: Quantification of the c-myc oncoprotein in human glioblastoma cells and tumor tissue. *J. Neurosurg.*, 1989; 71: pag. 4384-4388.

ENGELHARD H.H., III, KRUPKA J.L., BAUER K.D.: Simultaneous quantification of c-myc oncoprotein, total cellular protein, and DNA content using multiparameter flow cytometry. *Cytometry*, 1991; 12: pag. 68-76.

ENSLEY J.F., MACIOROWSKI Z., HASSAN M., et al.: Cellular DNA content parameters in untreated and recurrent squamous cell cancers of the head and neck. *Cytometry*, 1989; 10: pag. 334-338.

ERDHART K., AUER G., BJORJHOLM E. et al.: Prognostic significance of nuclear DNA content in ovarian tumors. *Cancer Res.* 1984; 44: pag. 2198-2202.

FANTES P.: "What the papers say. Growth factors, G0 and cell cycle controls". *Bioessay*, 1985; 4: pag 32-33.

FARRAR W.B., ARTMAN S., SICKLE-SANTANELLO B.J., DECENZO J.F., KEYHANI-ROFAGHA S. y O'TOOLE R.V.: DNA content as a prognostic indicator in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head and Neck Oncology. Research Conference*, 1987.

FERRARI C., DIONIGI P., DANOVA M., GIORDANO M. y MAZZINI G.: Flow cytometry of solid tumors: Single parameter DNA analysis. Correlated DNA/Bromodeoxyuridine (BrdU) "in vivo". Dual parameter DNA/cytokeratin (CK). Multiparameter DNA/CK/BrdU. En DNA cytometric analysis. A. Sampedro editor, Universidad de Oviedo, 1993: pag. 167-193.

FISHER R.A., LAWLER S.D., EVANS D.F. et al.: Flow cytometry used to distinguish between complete and partial moles. Placenta, 1987; 8: pag. 249-256.

FRANZEN G., KLINTENBERG C. y RISBERG B.: DNA measurement - An objective predictor of response to irradiation? A review of 24 squamous cell carcinomas of the oral cavity. Br. J. cancer, 1986; 53: pag. 643-651.

FREEMAN D.A. y CRISSMAN H.A.: Evaluation of six fluorescent protein stains for use in flow microfluorometry, 1975; 50: pag. 279.

FRIEDLANDER M.L.: Prediction of long-term survival by flow cytometry analysis of cellular DNA content in patients with advanced ovarian cancer. J. Clin. Oncol., 1988; 6(2): pag. 282-290.

FU Y.S.: Adenocarcinoma and mixed carcinoma of uterine cervix. Prognostic value of nuclear DNA analysis. Cancer 1982; 49: pag. 2561-2577.

GARCIA R.L., COLTRERA M.D. y GOWN A.M.: Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/Cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. Am J Pathol 1989; 134: pag. 733-739.

GERDES J., LEMKE H., BAISCH., WACKER H.H, SCHWAB U. y STEIN H.: Cell cycle analysis of cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the mononuclear antibody Ki-67. J Immunol, 1984; 133: pag. 1710-1715.

GERLINGS P.G.: Het larynxcarcinoom bij de vrouw. Klinische en psychologische aspecten. Ned. T. Geneesk, 1968; 112: pag. 637-641.

GIARETTI W.: A model on the origin and evolution of DNA aneuploidy: Int. J. Oncol., 1993; 2: pag. 165-171.

GOLDSMITH M., CRESSON D., POSTMA D. et al.: Significance of ploidy in laryngeal cancer. Am. J. Surg., 1986; 152: pag. 396-402.

GOLDSMITH M., CRESSON., ARNOLD L.A. et al.: DNA flow cytometry as a prognostic indicator in head and neck cancer. Otolaryngol. Head and Neck Surg., 1987; 96: pag. 307-318.

GRANTZNER H.G.: Monoclonal antibody to 5 bromo and 5-iododeoxy-uridine. A new reagent for detection of DNA replication. *Science* 1982; 218: pag 474-475.

HAUSSER-URFER I., LEEMAN U., RUCH F.: Cytofluorometric determination of DNA base content in human chromosomes with quinacrine mustard, hoecht 33258, DAPI, and mithramycin. *Exp. Cell Res.*, 1982; 142: pag. 455-459.

HEDLEY D.W.: Flow Cytometry Using Paraffin-Embedded Tissue: Five Years On. *Cytometry*, 1989; 10: pag. 229-241.

HEDLEY D.W., FRIEDLANDER M.L., TAYLOR I.W., et al.: Method for analysis of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J. Histochem. Cytochem.*, 1983; 31: pag. 1333-1335.

HEIM S. y MITELMAN F. : Chromosomal abnormalities in specific disorders: Solid tumors in: *Cancer cytogenetics*. Edited by Hein S., Mitelman F. New York: Alan R. Liss Inc., 1987, pag. 227.

HERRERA E.: Bioquímica: Biología molecular y bioquímica fisiológica. 1ª Ed, 1991; II vol.: pag. 1221-1226.

HOCHHAUSER S.J., STEIN J.L. y STEIN G.S.: Gene expression and cell cycle regulation. *Int. Rev. Cytol.*, 1981; 71: pag. 95-243.

HORDIJK G.J. y RAVASZ L.A.: Larynxcarcinoom. In: *Het hoofdhalscarcinoom*. Hordijk G. J., Ravasz L. A. Eds Bohn, Scheltema en Holkema, Utrech/Antwerpen, 1989: pag. 101-114.

HSU S.M., RAINE L. y FANGER H.: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in inmunoperoxidase techniques. *J. Histochem Cytochem.*, 1981; 29: pag. 577-580. (PCNA, TECNICA DE INMUNOTINCION).

HUYGEN P.L.M., VAN DEN BROEK P. y KAZEM I.: Age and mortality in laryngeal cancer. *Clin. Otolaryngol.*, 1980.; 5: pag. 129-137.

IVERSEN O.E.: Flow cytometry deoxyribonucleic acid index: A prognostic factor in endometrial carcinoma. *Am. J. Obstet Gynecol.*, 1986; 155: pag. 770-776.

IVERSEN O.E.: Ploidy assessment of benign and malignant ovarian tumors by flow cytometry. A clinicopathologic study. *Cancer.*, 1987; 60(1): pag. 82-87.

IVERSEN O.E. y LAERUM O.D.: Trout and Salmon Erythrocytes and Human Leukocytes as internal Standards for ploidy Control in Flow Cytometry. *Cytometry*, 1987; 18(2): pag 190-196.

IWAMOTO H.: An epidemiological study of laryngeal cancer in Japan (1960-1969). *Laryngoscope*, 1975; 85: pag. 1162-1167.

JOENSUU H., ALANEN K.A., KLEMI P.J. y AINE R.: Evidence for false Aneuploid Peaks in Flow Cytometric Analysis of Paraffin-Embedded Tissue. *Cytometry*, 1990; 11: pag. 431-437.

JOHNS EW. ed.: The HMB chromosomal proteins. New York. Academic Press., 1982.

JOHNSON T.S., RAJU M.R., GILTMAN P.K. y GILLETE E.L.: Ploidy and DNA distribution analysis of spontaneous dog tumors by flow cytometry. *Cancer Res.*, 1981; 41: pag. 3005-3009.

JOHNSON T.S., WILLIAMSON K.D., CRAMER M.M. y PETERS L.J.: Flow cytometry analysis of head and neck carcinoma. DNA index and S fraction from paraffin-embedded sections: Comparison with malignancy grading. *Cytometry*, 1985; 6: pag. 461-470.

JUAN G., GUASCH R., BARONA R., CALLAGHAN R.C., CARRETERO F. Y O'CONNOR J.E.: Évaluación de un nuevo sistema automático de preparación de muestras para análisis del contenido en DNA por Citometría de Flujo (Sistema DNA-prep). 1ª Reunión Ibérica de Citometría. Barcelona, 1991.

KALLIONEMI O.P.: Prognostic significance of DNA index, multiploidy; and S-phase-fraction in ovarian cancer. *Cancer* 1988; 61(2): pag. 334-339.

KALLIONEMI O.P., BLANCO G., ALAVAICO M., HIETMEN J., MATILA J. y LANSLAHTI K., : Tumour DNA ploidy as an independent prognostic in advanced carcinoma of the breast. *Br. J. Cancer*, 1987; 56: pag. 637-642.

KALLIONEMI O.P., VISAKORPI T., HOLLI K., HEIKKINEN A., ISOLA J. y KOIVULA T.: Improved prognostic impact of S phase values from paraffin-embedded breast and prostate carcinomas after correcting for nuclear slicing. *Cytometry* 1991; 12: pag. 413-421.

KALLIONEMI O.P., VISAKORPI T., HOLLI K., ISOLA J. y RABINOVITCH P.S.: Automated Peak Detection and Cell Cycle Analysis of Flow Cytometric DNA Histograms. *Cytometry*, 1994; 16: pag. 250-255.

KAMINYANA M., : Mechanism of action of chromomycin A3. *J. Biochem.*, 1968; 63: pag. 566-572.

KAPLAN E.L. y MEIER P. : Nonparametric estimation from incomplete observations. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 1958; 53: pag 457-481.

KAPLAN A.S., CALDERELLI D., CACHO M.S., et al.: Retrospective DNA analysis of head and neck squamous cell carcinoma. *Arh. Otolaryngol. Head and Neck Surg.*, 1986; 112: pag. 1159-1162.

KARIM A.B. M.F.: A clinical review on dose response in radiotherapy for laryngeal carcinoma. Thesis, Amsterdam, 1977.

KIRSCHNER J.A. y CARTER D.: The larynx In: *Diagnostic Surgical Pathology*. Sternberg S.S. (ed.). Raven Press New York, 1989; pag. 695-714.

KLEINSASSER O.: Epidemiology, etiology and pathogenesis. In: *KLEINSASSER O. Tumor of the larynx and hypopharynx*. Thieme Medical Publishers Inc., New York, 1988: pag 2-5.

KLEINSASSER O.: Pathologie und Biologie der plattenepithelkarzinoma in: Berendes J., Link K., Zooner F. (ed.). *Hals-Nasen-Ohren-Hellkinde in praxis und Clinic Bandy*, Tel 2, Kehlkopg. Citado por Kirchner y Carter (1989).

KOKAL W., SHEIBANI K., TERZ J. y HARADA J.R.: Tumor DNA content in the prognosis of colorectal carcinoma. *JAMA*, 1986; 225: pag. 3123-3127.

KULSKI J.K., DEMETER T., MUTAVDZIC S., STERRETT G.F., MITCHELL K. M. y PIXLEY E.C.: Survey of human papillomavirus types 6/11/16/18 by filter in situ hybridization. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1990; 94: pag. 566-570.

KURKI P., OGATA K. y TAN E.M.: Monoclonal antibodies to proliferating cell nuclear antigen (PCNA/cyclin) as probes for proliferating cells by immunofluorescence microscopy and flow cytometry. *J. Immunol. Meth.*, 1988; 109: pag. 49-59.

KURKI P., VANDERLAAN M., DOLBEARE F., GRAY J. y TAN E.M.: Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA/cyclin) during the cell cycle. *Exp. Cell. Res.*, 1986; 166: pag. 209-219.

LACOMBE P., KRAUSS L., FAY M. y POCITALO J.J.: Glutathione status during the mitogenic response of rat splenocytes. Effects of oxygen concentration: FO₂ 21% versus FO₂ 7%. *Biochimie*, 1986; 68: pag. 555-563.

LACOMBE P., KRAUSS L., FAY M. y POCITALO J.J.: Glutathione status of rat thymocytes and splenocytes during the early events of their ConA proliferative responses. *Biochimie*, 1987; 69: pag. 37-44.

LAMPE H.B., FLINT A., WOLF G.T. et al.: Flow Cytometry: DNA analysis of squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. *J. Otolaryngol. Can.*, 1986; 16: pag. 371-376.

LANDBERG G. y ROOS: Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 antigen in human malignant hematopoietic cells. *Acta Oncol.*, 1991; 30: pag 917-921.

LAUERMA S.: Treatment of laryngeal cancer. A study of 638 cases. *Acta Otolaryngeal*, 1967. Suppl. 225: pag. 1-101.

LAURIAN N., SADOV R y STRAUSS M.: Laryngeal carcinoma in childhood. Report of a case and review of the literature. *Laryngoscope*, 1984; 94: pag. 684-687.

LEUCHTENBERGER C., KLEIN G. y KLEIN E.: The stimulation of nucleic acids in individual isolated nuclei and its comparison with the chemical analysis. *Cancer Rs.*, 1952a; 12: pag. 480-483.

LEUCHTENBERGER C., LEUCHTENBERGER R. y DAVIS A.H.: A microspectrophotometric study of the deoxyribose nucleic acid (DNA) content in cells of normal and malignant human tissue. *Am. J. Pathol.*, 1954 ; 30 : pag 65-85.

LEUCHTENBERGER C. y VENDELEY C.: The quantitative estimation of deoxyribose nucleic acid (DNA) in isolated individual animal nuclei by the Caspersson ultraviolet Method. *Exp. Cell. Res.* 1952b: pag. 240-244.

LEVENDAG P. y VIKRAM B.: The problem of the neck relapse in early stage supraglottic cancer - results of different treatment modalities for the clinically negative neck. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1987; 13: pag. 1621-1624.

LINCOLN S.T. y BAUER K.D.: Limitations in the measurement of de c-myc oncoprotein and other nuclear antigens by flow cytometry. *Cytometry*, 1989; 10: pag. 456-462.

LINDAHL B., ALM P., FERNÖ M. et al.: Prognostic value of value flow cytometrical DNA mesuraments in stage I-II endometrial: Correlation with steroid receptor concentration, tumor myometrial invasion, and degree of diferentation. *Anticancer Res.*, 1987; 7: pag. 791-798.

LOOK A., MELVIN S.L., WILLIAMS D.L., BRODEUN G.M., DAHL G.U., KALWENSKY D.M., MURPHY S.B. y MAUER A.M.: Aneuploidy and percent of S phase cells determined by FCM correlated with cell phenotype in childhood acute leukemia. *Blood*, 1982; 60: pag. 959-1086.

LOOK A.T., ROBERTSON P.K., WILLIAMS N.G. et al.: Prognostic importance of blas cell DNA content in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 1985; 65: 1079-1086.

LOPEZ F., BELLOC F., LACOMBE F., DUMAIN P., REIFFERS J., BERNARD P. y BOISSEAU M.R.: Modalities of synthesis of Ki-67 antigen during the stimulation of lymphocytes. *Cytometry*, 1991; 12: pag. 42-49.

LUTZ C. K., WAGNER R.L., JHONSON J.T. et al: Supraglottic carcinoma: Patterns of recurrence. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 1990; 99: pag. 12-17.

LUYTEN G.P., HOOGEVE A.T. y GALJAARD H.: A fluorescence staining method for the demostracion and measurement of lysosomal enzyme activities in single cells. *J. Histochem. Cytochem.*, 1985; 33 (9): Pag 965-968.

MAIER H., DE VRIES N. y SNOW G.B. : Occupational factors in the aetiology of head and neck cancer. *Clin. Otolaryngol.*, 1991; 16: pag. 406-412.

MAMO F., TEODORI L., SCHUMANN J. y GÖHDE.: Flow cytometry is a tool for the prognostic assessmeny of human neoplasia. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1986; 12: pag 625-636.

MATSUURA H.: Malignant potentialy of esquamous cell carcinoma of the esophagus predictable by DNA analysis. *Cancer*, 1986; 57: pag. 1810-1814.

McQUIRT W.F.: Head and Neck cancer in women - a changing profile. *Laryngoscope*, 1983; 93: pag. 106-107.

MIGLIERINA R.: Some applications of microspheres in flow cytometry. *Biol. Cell*, 1986; 58: pag. 127-130.

MILCAREK C. y ZAHN K., The syntesis of ninety proteins including actine throughtout the Hela cell cycle. *J. Cell. Biol.*, 1978; 79: pag. 833-838.

NEGUS V.E.: Intrinsec cancer of the larinx. Review of a series of cases. *J. Laryngol.*, 1948; 62; pag. 113-128. Citado por Stell P.M., 1988.

NISHIDA C., REINHARD P. y LINN S.: DNA repair synthesis in human fibroblast requires DNA polymerase-d. *J. Biol. Chem.* 1988; 263: pag. 501-510.

OGURA J.H., MARKS J.E. y FREEMAN R.B.: Results of conservation surgery for cancer of the supraglottis and pyriform sinus. *Laryngoscope*, 1980; 90: pag. 591-600.

OLSEN J., SABREO S. y FASTING U.,: Interaction of alcohol and tobacco as risk factors in cancer of the laryngeal region. *J Epidemiol. Comunity Health*, 1985; 39: pag. 165-168.

OYAMA T., WATANABE H., IWAFUCHI M., MAEJIMA T. y AJIOKA: Diagnostic value of proliferating cell nuclear antigen for myogenic tumors of the stomach. *Gastroenterol. Jpn.*, 1993; pag. 193-200.

PAGE DL.: Prognosis and Breast Cancer. Recognition of lethal and favorable prognostic types. *Am. J. Surg. Pathol.*, 1991; 15: pag. 334-349.

PERIS R.: Estudio del cáncer de pulmón de células no pequeñas por citometría de flujo. Valor pronóstico. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia, 1994.

PIERREZ J. y RANOT X.: Use diploid and triploid trout erythrocytes as internal standar in flow cytometry. *Cytometry*, 1991; 13 (2): pag. 274-275.

PRESCOTT D.M.: Regulation of cell reproduction. *Cancer Res.*, 1964; 28: 1815-1820.

RABER M.N. y BARLOGIE B.: DNA Flow Cytometry of Human Solid Tumors. "Flow Cytometry and Sorting", 2ª Ed. Eds. Melamed M.R., Lindmo T. y Mendelsohn, 1990: pag. 745-754.

RABBET W.F.: Juvenile laryngeal papillomatosis: The relationship of radiation to malignant degeneration in this disease. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 1965; 74: pag. 1149-1152.

RABILLOUD T., PENNETTER J.L., HIBNER U., VICENS P., TARROUX P. y ROUGEON F.: Stage transitions in B-lymphocyte differentiation correlate with limited variations in nuclear proteins. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 1991; 88: pag. 1830-1834.

RABINOVITCH P.: Practical Considerations for content and Cell Cycle Analysis. *Clinical flow cytometry: Principles and application*, Bauer K. et al., 1993: pag. 130-133.

RABINOVITCH P.S.: Multicycle Program. Phoenix Flow System, San Diego, C.A., 1988.

REID B.J., HAGGIT R.C., RUBIN C.E. et al.: Barret's esophagus. Correlation between flow cytometry and histology in detection of patients at risk for adenocarcinoma. *Gastroenterol.*, 1987; 93: pag. 1-11.

REMBINKOS Y., MAGDELENAT H. y ZAJDELA A.: DNA flow cytometry applied to fine needle sampling of human breast cancer. *Cancer.*, 1988; 61: pag. 1629-1634.

RILEY R.S. y MAHIN E.J.: Clinical applications of flow Cytometry. ASCP National Meeting, Tell, Las Vegas, Nevada, 1988.

RILEY R.S., MAHIM E.J. y ROSS W.: DNA ploidy and cell cycle analysis. En clinical applications of flow cytometry. Ed. Igaku-Shoin. New York, 1993: pag. 251-322.

ROBERTIS De E.D.P., NOWINKI W.W. y SAEZ F.A.: Biología Celular. Ed. El Ateneo, Buenos Aires, 1972; pag 221-224.

RONOT X., AUBRY J.P. y BANCHERREAU J.: La citometrie en flux. Ed Medsi / McGraw-Hill, París, 1988: pag. 79-87.

RONOT X, BENEL L., ADOLPHE M. y MOUNOLOV J.C.: Mitochondrial analysis in living cells: The use of Rhodamine 123 and flow cytometry. Biol. Cell., 1986; pag 1-8.

ROSSEMBERG P., WILSON T., GAFFEY T., et al.: Flow cytometric measurements of DNA index and S-phase on paraffin embeded early stage endometrial cancer: An important prognostic indicador. Gynecol Oncol., 1989; 35: pag. 50-54.

ROTI ROTI J.L., HIGASHIBUKO R. y DETHLEFSEN L.A.: DNase I sensitivity of nuclear DNA measured by flow cytometry. Cytometry, 1985; 6: pag. 101-108.

RUA S., COMINO A., TRUTTERO A., CERA G., SEMERIA C., LANZILLOTTA L. y BOFFETTA P.: Relationship between histologic features, DNA flow cytometry, and clinical behavior of squamous cell carcinomas of the larynx. Cancer, 1991; 67: pag. 141-149.

SAMPEDRO A., MIRALLES T.G., ARTIMEZ M.L., DE LOS TOYOS J.R. y SALAS A.: Servicio de citometría. Universidad de Oviedo. Importancia actual de la citometría de flujo en el estudio de tumores. Third meeting of the Iberian Society of Cytometry. Porto, Nov. 1993.

SHACKNEY S.E., SMITH C.A., MILLER B.W., BURHOLT D.R., MURTHA K., GILES H.R., KETTERER D.M. y POLLICE A.A.: Model for the genetic evolution of human solid tumors. Cancer Res., 1989; 49: pag. 3344-3354.

SHAPIRO, H. M.: Practical Flow Cytometry. Ed Alan R. Liss ,Inc , New York, 1988 Pag 10-21.

SHAW J.P. y CHOU I.: Elevation of intracellular glutathione content associated with mitogenic stimulation of quiescent fibroblast. J. Cell. Physiol, 1993; 129: pag. 193-198.

SISSON G.A. y PELZER H.J.: Staging system by sites. Problems and refinements. *Otolaryngol. Clin. N.A.*, 1985; 18: PAG. 397-402.

SPAULDING C.A., KROCHAK R.I., HAHN S.S. et al.: Radiotherapeutic management of cancer of the supraglottis. *Cancer*, 1986; 43: pag. 1292-1298.

SPITZ M.R. y NEWELL G.R.: Trends in tobacco use and aerodigestive cancer incidence. In: Fee W.E., Goepfert H., Johns M.E., Strong E.W., Ward P.H. *Head and Neck Cancer*, 1990; 2 :Decker Inc.; Toronto-Philadelphia : pag. 43-46.

SOLOMON A., BARROW J. y GODDARD A.D.: Chromosome aberrations and cancer. *Science* 1991; 254 : pag 1153-1160.

SOO K.C., SHAH J.P., GOPINATH K.S. et al.: Analysis of prognostic variables and results after supraglottic partial laryngectomy. *Am. J. Surg.*, 1988; 156: pag. 301-305.

SPAULDING C.A.; KROCHAK R.I., HAHN S.S. et al.: Radiotherapeutic management of cancer of the supraglottis. *Cancer*, 1986; 57: pag. 1292-1298.

STENDHAL U., STRANG P., BOMAN K., GERDES U. y TRIBUKAIT B.: DNA content and S-phase rate in 285 patients with invasive endometrial carcinoma. *Acta Oncol.*, 1989; 28 (abstract): pag. 567.

STANBRIDGE E.J. y NOWELL P.C.: Origins of humans cancer revisited. *Cell*, 1990; 63 : pag. 867-874.

STEPHENSON W.T., BARNES D.E., HOLMES F.F. y NORRIS C.W.: Gender influences subsite of origin of laryngeal carcinoma. *Arch Otolaryngol. Head Neck Surg* 1991; 117: pag. 774-778.

STÖHR M., VOGT.SCHADEN H., KNOBLOCH M. et al.: Evaluation of eight fluorochrome combinations for simultaneous DNA-protein flow analysis. *Stain Technol.*, 1978; 53: pag 205.

SUGIMACHI K., INOKUCHI H. y ONO L.: Citophotometric DNA analysis of mucosal and submucosal carcinoma of the esophagus. *Cancer*, 1984; 53: pag. 105-109.

TAKASAKI Y., FISHWILD D. y TAN E.M.: Characterization of proliferating cell nuclear recognized by autoantibodies in lupus sera. *J. Exp. Med.*, 1984; 159: pag. 981-992.

TAN E.M., OGATA K. y TAKASAKI Y.: PCNA/cyclin: a lupus antigen conected with DNA replication. *J Reumatol*, 1987; 14 (supl 13): pag. 89-96.

TAYLOR I.W.: A rapid single staining technique for DNA analysis by flow microfluorometry. *J. Histochem. Cytochem.*, 1980; 28: pag 1021-1024.

TEODORI L., CADUSTRO L. y CORDELLI E.: Cytometrically determined relative DNA content as indicator of neoplasia in gastric lesions. *Cytometry*, 1984; 5(1): pag. 63-70.

TEODORI L., TIRINDELLI-DANESI D., CORDELLI E. et al.: Flow cytometric analysis of dDNA abnormality in GI tract human tumors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1986; 468: pag. 291-301.

T.N.M. Classification of Malignant Tumours (UICC). Hermanek P., Sobin L.H. (eds.), Springer Verlag, Berlín. 1987.

T.N.M.. Atlas Illustrated Guide to the T.N.M./p.T.N.M. Classification of Malignant Tumours (UICC). Spiessl B., Beahrs O.H., Hermanek P., Hutter R.V.P., Scheibe O., Sobin L.H., Wagner G (eds.), Springer Verlag, Berlín, 1990.

TRAGANOS F., DARZYNKIEWICZ Z., SHARPLESS T. et al.: Simultaneous staining of ribonucleic and deoxyribonucleic acids in unfixed cells using acridine orange in flow cytometric system. *J. Histochem. Cytochem.*, 1977; 2: pag. 72-76.

TRAGANOS F., KIMMEL M., BUETI C. y DARZYNKIEWICZ Z.: Effects of inhibition of RNA or protein synthesis on CHO cell cycle progression. *J. Cell. Physiol.*, 1987; 133: pag. 277-287.

TRIBUKAIT B., GRAMBERG-OHMAN I. y WIJKSTROM H.: Flow cytometry DNA and cytogenetic studies in human tumor: A comparison and discussion of the differences in modal values obtained by the two methods. *Cytometry*, 1986; 7: pag. 194-199.

U.I.C.C.: T.N.M. Atlas illustrated guide to the classification of malignant tumors. Ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1989.

UNDERWOOD J.C.E. (ED): Current topics in Pathology. Pathology of the nucleus. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 1990.

VAN BOCKSTAELE D.R., LAN J., SNOECK H.W., KORTHOUT M.L., DE BOCK R.R.F. y PEETERMANS M.E.: Aberrant Ki-67 expression in normal bone marrow revealed by multiparameter flow cytometry analysis. *Cytometry*, 1991; 12: pag. 50-63.

VAN HOLDE K.E. : Chromatin New York. Springer Verlag, 1989.

VINDELOV L.L., CHRISTENSEN y NISSEN N.I.: Standarization of High-Resolution Flow Cytometry DNA analisis by simultaneous use of Chiken and Trout Red blood cells as Internal Reference Standars. *Cytometry*, 1988; 3(5): pag. 332-339.

VISSCHER D. y CRISSMAN J.D.: Upper Aerodigestive and Lower Respiratory Tract Tumors. "Clinical Flow Cytometry. Principles and application". Eds. Bauer k.d., Duque R.E. y Shankey T.V., 1993: pag. 319-329.

VISSCHER D.W., ZARBO R.J., GEENALAWAL K.A. y CRISSMAN J.D.: Prognostic significance of morphological parameters and flow cytometry Dna analysis in carcinoma of the breast, in Rosen p.p., Fechner r.e. (eds.): *Pathology Annual*. Norwalk, Conn, Appelton and Lange, 1990, pt 1, 25.

VON HANSEMANN D.: Uber asymetrische zellteilung in Epithelkrebsen and deren biologische Bedeutung. *Arch. Pathol. Anat. Physiol.*, 1890; 119: pag. 299-326.

WALL T.J., PETERS L.J., BROWN B.W. et al: Relationship between lymph nodal status and primary tumor control probality in tumors of the supraglottic larynx. *Int. J. Radiat Oncol. Biol. Phys.*, 1985; 11: pag. 1895-1902.

WATTS S.L., BREWER E.E. y FRY T.L.: Human papillomavirus DNA types in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, 1991;71: pag. 701-707.

WEAVER D., BAGWELL C.B., HITCHCOX S.A., et al.: Improved flow cytometric determination of cell cycle activity (S-phase fraction) from paraffin-embedded tissue. *AJCP*, 1990; 94: pag. 576-584.

WEINBERG R.A.: Oncogenes, Antioncogenes, and the molecular basis of multistep carcinogenesis. *Cancer Res.*, 1989; 49 : pag. 3713-3721.

WILSON G.D., McNALLY N.J., DISCHE S. et al.: Measurement of cell kinetics in human tumours in vivo using bromodeoxyuridine incorporation and flow cytometry. *Br. J. Cancer*, 1988; 58: pag. 423-431.

WYNDER E.L., COVEY L.S., MABUCHI K. y MUSHINSKI M.: Environmental factors in cancer of the larynx: A second look. *Cancer*, 1976; 38: pag. 1591-1601.

YAMANAKA S., NAGAI N. y OHAMA: Study of proliferating cell nuclear antigen (PCNA); nucleolar organizer regions (NORs) and mitotic activity in epithelial ovarian tumors. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zassh*, 1993; pag. 234.

ZARDO A.P., RUTHERFORD J.D. y CORBITT G.: Malignant progression of laryngeal papiloma associated with human papiloma virus type 6 (HPV-6) DNA. J. Clin. Pathol., 1988; 41: pag. 280-283.

ZETTERBERG A. y ESPOTI L.P.: Prognostic significance of nuclear DNA levels in prostatic carcinoma. SCAN. J. Urol. Nephrol., 1980; 55: pag. 53-58.