

R. 1949d

+D  
V/48

UNIVERSIDAD DE SEVILLA. FACULTAD DE MEDICINA.  
DEPARTAMENTO DE CITOLOGIA E HISTOLOGIA NORMAL  
Y PATOLOGICA.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral  
al folio 237 número 93 del libro  
correspondiente.

Sevilla, 1991

El Jefe del Consejo de Tesis,

*Alma Laffite*

ALTERACIONES SUBVISUALES EN EL DIAGNOSTICO  
DEL TUMOR FOLICULAR DE TIROIDES.



X

Tesis doctoral presentada por:

Balbino Valverde Villarejo

Sevilla, 1991



FACULTAD DE MEDICINA

DPTO. DE CITOLOGIA E HISTOLOGIA  
NORMAL Y PATOLOGICA

41009 SEVILLA

DON HUGO GALERA DAVIDSON, CATEDRATICO DE ANATOMIA  
PATOLOGICA DEL DPTO. DE CITOLOGIA E HISTOLOGIA  
NORMAL Y PATOLOGICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA,

CERTIFICA: Que bajo su dirección y en el Dpto. de  
Citología e Histología Normal y  
Patológica, ha sido realizado el trabajo titulado:"  
ALTERACIONES SUBVISUALES EN EL DIAGNOSTICO DEL TUMOR  
FOLICULAR DE TIROIDES", por Don BALBINO VALVERDE  
VILLAREJO, para optar al grado de Doctor en Medicina  
y Cirugía.

Y para que así conste, expide el presente  
certificado en Sevilla, a 1 de Agosto de mil  
novecientos noventa y uno.

*Hugo Galera Davidson*



FACULTAD DE MEDICINA  
DPTO. DE CITOLOGIA E HISTOLOGIA  
NORMAL Y PATOLOGICA  
41009 SEVILLA

Mi agradecimiento al Prof. Dn. HUGO GALERA DAVIDSON por su confianza al darme la oportunidad de acceder al grado de Doctor, Sin su orientación, interés y ayuda hubiera sido imposible la realización de este trabajo. También quiero agradecer su cooperación y comprensión a la Doctora Dñ. Ana M<sup>a</sup> Moreno Fernandez, así como hacer extensivo dicho agradecimiento al Departamento de Citología e Histología Normal y Patológica y al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Virgen Macarena.

INDICE

INTRODUCCION

I) CLASIFICACION DE LOS TUMORES TIROIDEOS.....2

A) TUMORES EPITELIALES.....9

1.- Benignos.....9

    a.- Adenoma Folicular.....9

    b.- Otros adenomas.....10

2.- Malignos.....12

    a.- Carcinoma Folicular.....13

    b.- Carcinoma Papilar.....14

    c.- Carcinoma de células escamosas.....15

    d.- Carcinoma Indiferenciado o Anaplásico.....16

    e.- Carcinoma Medular.....18

B) TUMORES NO EPITELIALES.....21

C) TUMORES VARIOS.....21

1.- Carcinosarcoma.....21

2.- Hemangioendotelioma maligno.....22

3.- Linfoma.....23

4.- Teratomas.....24

D) TUMORES SECUNDARIOS.....24

E) TUMORES NO CLASIFICADOS.....25

F) LESIONES PSEUDOTUMORALES.....25

1.- Bocio nodular.....	26
2.- Lesiones quísticas.....	26
3.- Tiroiditis linfocitaria.....	27
4.- Tiroides aberrante.....	27
5.- Carcinoma asociado a struma ovarii.....	29
II) CRITERIOS ANATOMOPATOLOGICOS PARA EL DIAGNOSTICO DIFERENCIAL DE LOS TUMORES TIROIDEOS.....	35
A) LESIONES BENIGNAS.....	35
B) LESIONES MALIGNAS.....	37
III) CITOMETRIA EN PATOLOGIA TUMORAL TIROIDEA.....	46
A) NEOPLASIAS FOLICULARES.....	50
B) CARCINOMA PAPILAR.....	53
C) NEOPLASIA DE CELULAS DE HÜRTHLE.....	57
D) CARCINOMA ANAPLASICO.....	59
E) CARCINOMA MEDULAR.....	60
IV) VALORACION DE LA TEXTURA CROMATINICA EN LAS NEO- PLASIAS FOLICULARES.....	65
<u>PLANTEAMIENTO DEL TEMA.....</u>	74
<u>MATERIAL Y METODOS.....</u>	78
I) MATERIAL.....	79
A) TIROIDES TUMORAL Y AREAS ADYACENTES.....	79

B) TIROIDES NO TUMORAL.....	80
II) METODOS.....	81
A) TINCIÓN DE FEULGEN.....	81
B) MEDICIÓN DE LA TEXTURA CROMATÍNICA NUCLEAR...	83
C) ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	86
<u>RESULTADOS</u> .....	87
I) CARCINOMA FOLICULAR ENCAPSULADO.....	88
A) DATOS CITOMÉTRICOS.....	88
1.- Densidad óptica.....	88
2.- Otros datos citométricos.....	89
B) ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	91
II) CARCINOMA FOLICULAR AMPLIAMENTE INVASIVO.....	93
A) DATOS CITOMÉTRICOS.....	93
1.- Densidad óptica.....	93
2.- Otros datos citométricos.....	94
B) ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	96
<u>DISCUSIÓN</u> .....	116
<u>CONCLUSIONES</u> .....	129
<u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	134

## INTRODUCCION

## I) CLASIFICACION DE LOS TUMORES TIROIDEOS

Los distintos tumores de tiroides muestran netas diferencias en lo que se refiere a epidemiología, evolución, actividad funcional, pronóstico y respuesta al tratamiento.

En el tiroides, al igual que en otras glándulas en docrinas, es difícil distinguir entre lesiones hiperplásicas y neoplasias y entre tumores benignos y malignos. Este problema es aún más complejo en las zonas de bocio endémico, donde se asocian estados de hiperplasia y lesiones neoplásicas. Por otro lado, los criterios usuales de diagnóstico del cáncer (ej: atipia celular, actividad mitótica, etc...) no son siempre útiles en patología tiroidea para diferenciar una lesión maligna de otra benigna. Junto a ello, la amplia variedad de patrones morfológicos de los carcinomas, la ausencia de correlaciones anatomoclínicas, la terminología confusa y la ausencia de uniformidad de criterios para definir de terminadas neoplasias ha dado lugar a que la nomenclatura y clasificación de los carcinomas de tiroides haya estado en debate durante años, a pesar de que son pocos los tipos celulares parenquimatosos a partir de los cuales se puede desarrollar una neoplasia.

Gracias a características histopatológicas se diferenciarán los adenomas foliculares de los carcinomas foliculares encapsulados y a la vez éstos, de los adenomas atípicos, y aunque no siempre resulte fácil la distinción entre estas entidades, el apartado tumoral que probablemente presenta más dificultad en cuanto a clasificación es el de los carcinomas bien diferenciados derivados del epitelio folicular (carcinoma papilar y carcinoma folicular). También en ocasiones, el carcinoma anaplásico y el sarcoma son de difícil diferenciación, al igual que el carcinoma medular de uno mixto medular-folicular.

En cuanto al primer grupo aludido, la diferencia más importante entre un adenoma convencional y un adenoma atípico es el incremento de la actividad proliferativa (117). En esta entidad el grado mitótico es significativamente mayor que en el adenoma convencional y prácticamente igual al del carcinoma folicular encapsulado (79,121). De ello se deduce que la diferenciación entre ambas se basará en criterios de invasión (117). Una vez más se pone de manifiesto que el pleomorfismo en las neoplasias endocrinas no está necesariamente relacionado con un comportamiento biológico agresivo (101)

Es de gran importancia tener en cuenta ante un carcinoma bien diferenciado de tiroides derivado del epitelio folicular, que el 65% muestran un patrón mixto papilar-folicular (164) y que existen muy pocos casos de carcinoma papilar puro. Meissner y Warren (135) opinan que estos tumores se deberían denominar según el patrón histológico predominante. Otros autores, entre ellos Russell y cols. (165), los denominan "carcinomas mixtos" definidos como aquellos que presentan ambos componentes en una proporción semejante. Esta denominación ha sido ampliamente abandonada ya que con muy pocas excepciones los estudios clinicopatológicos han demostrado que el comportamiento biológico de los carcinomas mixtos no es significativamente diferente del carcinoma papilar con patrón clásico (96, 165). Estas observaciones son también válidas para los tumores en los cuales el componente folicular predomina sobre el papilar (165). Así pues el concepto aceptado por la mayoría de investigadores sobre esta materia es que si se identifican papilas en un tumor se debe orientar como un carcinoma papilar independientemente de la presencia y relevancia del componente folicular. Por otro lado, autores como Hedinger y Sobin (89), Chen y Rosai (42), Doniach (47), Franssila (54) y Rosai y cols. (159), opinan que todos los carcinomas con patrón folicular y núcleos en "vidrio esmeri-

lado", deben considerarse como carcinomas papilares debido a que su comportamiento biológico es superponible. Sin embargo, Saffos y cols. (166) piensan que en ocasiones se pueden comportar como verdaderos carcinomas foliculares, metastatizando a hueso. Lindsay (120) propone el término de "carcinoma papilar de variante folicular" para este tipo de tumores, definidos como aquellos que siendo citológicamente superponibles al carcinoma papilar convencional no presenta ninguna estructura papilar. Esta denominación ha sido aceptada u adoptada por la O.M.S. En cuanto al núcleo "en vidrio esmerilado" poco se sabe sobre su naturaleza (182). Es probable que se trate de un artefacto inducido por la fijación. Hapke y Dehner (82) observaron que esta característica nuclear estaba ausente o era poco relevante en los estudios histológicos por congelación. De ello se concluye que con esta técnica, el diagnóstico de carcinoma papilar de patrón folicular, sería verdaderamente muy complejo.

Otro importante desacuerdo en cuanto a la definición de estos tumores reside en el carcinoma anaplásico y los tumores malignos no epiteliales, principalmente el hemangioendotelioma y el sarcoma tiroideo, existiendo en muchas ocasiones criterios histológicos distintos para definir la misma entidad.

Recientemente se ha descrito casos de "carcinoma con patrón mixto folicular-medular" (80, 124, 125, 151) cuya imagen óptica suele ser la de un patrón trabecular-folicular, llegándose al diagnóstico de esta forma mixta mediante estudios inmunohistoquímicos (160).

Para evitar controversias y unificar criterios, en 1974, la O.M.S. (89) realizó una clasificación de los tumores de tiroides basada más en la histopatología que en la histogénesis del tumor, permitiendo estudios comparativos y correlaciones anatomoclínicas (cuadro I).

CUADRO I

CLASIFICACION HISTOLOGICA DE LOS TUMORES TIROIDEOS

(O.M.S. 1974)

A) TUMORES EPITELIALES

1/ BENIGNOS

a.- Adenoma Follicular

b.- Otros

2/ MALIGNOS

a.- Carcinoma Follicular

b.- Carcinoma Papilar

c.- Carcinoma de Células escamosas

d.- Carcinoma Indiferenciado (anaplásico)

\*) de c. fusiformes

\*) de c. gigantes

\*) de c. pequeñas

e.- Carcinoma Medular

B) TUMORES NO EPITELIALES

1/ BENIGNOS

2/ MALIGNOS

a.- Fibrosarcoma

b.- Otros

(continuación)

C) TUMORES VARIOS

- 1.- Carcinosarcoma
- 2.- Hemangioendotelioma maligno
- 3.- Linfoma maligno
- 4.- Teratoma

D) TUMORES SECUNDARIOS

E) TUMORES NO CLASIFICABLES

F) LESIONES PSEUDOTUMORALES

- 1.- Bocio nodular
- 2.- Lesiones quísticas
- 3.- Tiroiditis linfocitaria
- 4.- Tiroides aberrante
- 5.- Tiroides aberrante lateral
- 6.- Carcinoma asociado a struma ovarii

## A) TUMORES EPITELIALES

### 1/ BENIGNOS

#### a.- Adenoma Folicular

Se define como un tumor epitelial benigno con disposiciones estructurales y células análogas a las que se observan en la glándula tiroidea madura o en desarrollo. Es circunscrito, encapsulado, no invasor y se origina a partir de la célula folicular.

Histologicamente está rodeado por una cápsula fibrosa que con frecuencia contiene estructuras vasculares de luz amplia. Las células tumorales se organizan formando folículos o estructuras cordonaes, separadas por estroma hialino o edematoso, o por delicados tabiques fibrosos. Los núcleos tumorales son grandes y escasísimas las mitosis, pudiendo mostrar algunas células transformación oxifílica, o caracteres de células claras (58). Cuando el cambio oxifílico es difuso se denomina Adenoma de células de Hürthle, de Azkanazy o Adenoma Oxifílico.

Algunos adenomas muestran características indicativas de malignidad, tales como la presencia de gran celularidad, atipias nucleares o aumento de mitosis (117), pero se consideran benignos mientras no exista invasión capsular o vascular. Son los llamados adenomas atípicos (84).

b.- Otros adenomas

Algunos consideran un segundo tipo de adenoma, el llamado "adenoma papilar" (4), que consiste en un tumor perfectamente encapsulado y con patrón de crecimiento papilar puro o papilar con escasas formaciones foliculares. Las papilas deben estar centradas por un eje conectivo-vascular, y las mitosis y atipias son inusuales. El verdadero "adenoma papilar" es extremadamente raro (122) y la diferenciación con el carcinoma papilar se basará en que esta última entidad muestra imágenes de infiltración, células con núcleo "en vidrio esmerilado" y cuerpos de Psamoma (122), si bien podemos encontrar concreciones calcificadas en el interior de un adenoma papilar (135).

Recientemente, Mendelsohn (140), Rigaud y cols. (158), Gherardi (70) y Brisigotti y cols. (28), descri-

ben un tipo de adenoma derivado del epitelio folicular denominado "adenoma mucinoso de células en anillo de sello". Muestran una gran positividad para la inmunoreacción con tiroglobulina y para la detección histoquímica de mucinas neutras. Según Gherardi (70) estos hallazgos sugieren que las células foliculares muestran diferenciación doble, endocrina y no endocrina.

Schröder y cols. (173) describen un adenoma de células foliculares ricas en lípidos, opinando que podría tratarse de un cambio metaplásico por la analogía histológica con el carcinoma de mama rico en lípidos. Posteriormente, Schröder y cols. (172) lo denominan "adenolipoma de tiroides o tirolipoma".

El "adenoma trabecular hialinizante del tiroides" ha sido descrito recientemente por Carney y cols. (40) como entidad aparte, que puede simular un carcinoma papilar o uno medular. Son tumores encapsulados, constituidos por células elongadas, ovales o poligonales que se organizan formando trabéculas y/o nidos. El núcleo es oval u sinuoso y presenta vacuolas perinucleolares e inclusiones acidófilas siendo infrecuentes las mitosis. La fibrosis hialina perivascular y la degeneración celular que se observa en esta entidad pueden inducir a

la interpretación de amiloide, descartándose la presencia de esta sustancia con la tinción de Rojo Congo. En ocasiones se aprecian folículos que pueden mostrar invaginaciones papilares y contener material coloide y cuerpos de psamoma. Inmunohistoquímicamente, es tiroglobulina positivo y calcitonina negativo.

Por último, debemos comentar el "adenoma tóxico". Se trata de una entidad bien definida que se manifiesta con hipertiroidismo, generalmente en la edad media de la vida y sin asociación a bocio tóxico o a enfermedad de Graves (150). La relativa baja incidencia de clínica hipertiroidica en relación al número de nódulos autónomos, probablemente esté en relación con el tamaño del tumor, requiriéndose para ello, al menos un diámetro de tres cms. (150).

## 2/ MALIGNOS

Aquí se describirán someramente el grupo de neoplasias malignas más frecuentes del tiroides. Los carcinomas papilar, folicular, anaplásicos y el de células escamosas, derivan de la célula folicular tiroidea, mientras que el carcinoma medular tiene diferenciación supuesta o definida hacia las células C o parafolicular.

#### a.- Carcinoma Folicular

Se trata de un tumor epitelial maligno con disposición estructural y celularidad análoga a la de la glándula tiroidea madura o en desarrollo, y no muestra estructuras papilares, siendo este último un dato de interés. Está constituido por folículos de varios tamaños o por combinaciones de folículos y cordones, observándose, en ocasiones, patrón de crecimiento sólido. Los núcleos son compactos e hipercromáticos y el citoplasma es similar al de la célula folicular normal. Las principales características que lo diferencia del carcinoma papilar son la falta de papilas, de cuerpos de psamomas y de núcleos "en vidrio esmerilado" (53, 207). Focal o totalmente, se pueden observar células oxifílicas y células claras, y algunos autores, cuando la sustitución de la célula folicular por estas dos variantes es total los consideran entidades tumorales independientes. El carcinoma folicular se propaga por vía sanguínea y las metástasis linfáticas son poco frecuentes. Suele ser encapsulado y de crecimiento lento, si bien en ocasiones, la primera manifestación puede ser una metástasis a distancia que, por lo general, suele localizarse en el esqueleto (56, 95, 135, 207).

## b.- Carcinoma Papilar

Se define como un tumor epitelial maligno con estructuras papilares, centradas por un fino eje conjuntivo-vascular, rodeado por una hilera de células con núcleos superpuestos, escasa cromatina (núcleos en "vidrio esmerilado") y citoplasma claro o eosinófilo (53, 54). Son frecuentes los cuerpos esféricos y calcificados llamados "cuerpos de psamomas". La formación de folículos es casi constante y a veces extensa, pudiéndose también observar patrones de crecimiento sólido o trabecular. La mayoría de estos tumores no muestran encapsulación (165) y son con frecuencia multicéntrico (20-80%) (14), característica directamente proporcional a los cortes histológicos estudiados. Su crecimiento es lento y se disemina por vía linfática pudiendo permanecer las metástasis en el ganglio linfático durante mucho tiempo y en algunos casos, puede constituir el primer síntoma (56, 137, 207). En muchas ocasiones, se pueden encontrar focos microscópicos de carcinomas en los ganglios regionales examinados sistemáticamente.

Alrededor de un tercio a la mitad de los carcinomas papilares muestran infiltrados de linfocitos y células plasmáticas, frecuentemente sin infiltración linfocítica en la glándula (14).

Al hablar del carcinoma papilar debe comentarse el "carcinoma papilar oculto o carcinoma esclerosante oculto". Se trata de un tumor menor o igual a 1,5 cms. de diámetro clínicamente no detectable, y debe diferenciarse del "tumor de pequeño tamaño clínicamente aparente". En estos últimos tumores, ahora denominados "mínimos", el diámetro es igual o inferior a un cm., pero han sido diagnósticados ya antes de realizarse el estudio histopatológico (14). Según la O.M.S. es "oculto" aquel tumor clínicamente no diagnosticable. Pueden metastatizar a ganglios regionales pero las metástasis a distancia son muy raras (83).

#### c.- Carcinoma de células escamosas

Es un tumor epitelial maligno infrecuente, cuyas células muestran puentes intercelulares y son capaces de producir queratina con tendencia a la formación de globos córneos. Aunque histologicamente su imagen sea la de un tumor bien diferenciado, es altamente agresivo ya que su crecimiento es muy rápido, alcanzando gran tamaño y mostrando compresión traqueal o esofágica (10, 92, 135, 154). Estas neoplasias frecuentemente invaden estructuras vitales siendo entonces irresecables por lo que la supervivencia suele ser de meses (87, 92). No

deben confundirse con la propagación directa de un cáncer de laringe, tráquea o esófago, con metástasis y si diferenciarse de la metaplasia escamosa que se observa en algunos tumores y enfermedades no tumorales del tiroides (135, 136). Para ello, la atipia citológica y el grado de actividad mitótica son las características más útiles (86, 92, 135).

En cuanto a su histogénesis, la teoría más aceptada señala un origen a partir del epitelio folicular (71, 112).

#### d.- Carcinoma Indiferenciado o Anaplásico

Es el tumor epitelial maligno más indiferenciado y por tanto, el más maligno de los carcinomas de tiroides (39, 135, 148), representando en algunos casos la fase final de desdiferenciación de un carcinoma bien diferenciado (folicular, papilar o medular) (53, 87, 94, 136, 145, 207, 209). No suelen estar encapsulados y crecen rápidamente invadiendo estructuras vecinas y metastatizando a distancia. Los pacientes fallecen, generalmente a los pocos meses de realizarse el diagnóstico de la enfermedad (2, 55).

Histologicamente se diferencia tres tipos:

\* ) Carcinoma de células fusiformes: Está constituido por células de forma oval, con atipias y mitosis, dispuestas en un patrón de crecimiento fascicular. Por ello, debe diferenciarse del fibrosarcoma (94, 136, 145, 149, 207, 209), del fibrohistiocitoma y del hemangiopericitoma (149).

\* ) Carcinoma de células gigantes: Está integrado por células fusiformes y células gigantes, siendo estas últimas las que dominan el cuadro histológico. Son lesiones pleomórficas con abundantes núcleos bizarros y mitosis atípicas. En algunos ejemplos de estos tumores se encuentran células tipo osteoclastos (177).

\* ) Carcinoma de células pequeñas: Está formado por células foliculares más pequeñas que las del parénquima tiroideo normal, mostrando una forma redonda u oval con escaso citoplasma y núcleo hipercromático. El crecimiento es "en sábana" o en conglomerados compactos semejando al linfoma maligno (34). En función del patrón arquitectural de crecimiento se han reconocido dos variantes (patrón difuso y patrón compacto) que conllevan distinto comportamiento biológico (74). A estos dos patrones,

Meissner y Warren (135) los consideran como dos subtipos de este grupo tumoral. Actualmente, el "carcinoma anaplásico de células pequeñas de patrón compacto" no se considera una entidad anatomoclínica definida, puesto que bajo un cuadro histopatológico similar se engloba al "carcinoma insular" y a una variante morfológica peculiar del carcinoma medular (37, 39, 159). En cuanto al "carcinoma anaplásico de células pequeñas de patrón difuso", se ha demostrado, recientemente, mediante inmunohistoquímica, que si bien la mayoría son linfomas no hodgkinianos, también existen verdaderos carcinomas primitivos, y que éstos pueden presentar diferenciación folicular o parafofolicular (31, 131, 139, 144).

#### e.- Carcinoma Medular

Es un tumor epitelial maligno que muestra diferenciación supuesta o definida hacia la célula C o parafofolicular. Esta célula sintetiza calcitonina y otras sustancias (hormonales y no hormonales) y pertenece al sistema APUD (Amine Precursor Uptake and Decarboxylation). Los carcinomas medulares de tiroides pueden presentarse de forma esporádica o heredarse genéticamente (10%), de modo autosómico dominante (58). Estos últimos casos se pueden manifestar sólo o asociados a otros tumores en-

docrinos. La asociación con el feocromocitoma y la hiperplasia o adenoma de paratiroides constituyen la Adenomatosis Endocrina Múltiple (MEA) tipo IIa (20, 123, 179), mientras que si se presenta junto a un feocromocitoma y neuromas mucosos múltiples se denomina M.E.A. tipo IIb. Los casos esporádicos suelen ser unilaterales en contraposición con los familiares que suelen ser bilaterales.

Histológicamente está compuesto por células poligonales, fusiformes o redondas, a veces agrupadas en cordones o rosetas, limitados por tabiques fibrosos. Las mitosis son infrecuentes y el citoplasma eosinófilo y granular. Ocasionalmente, puede mostrar un patrón organoide. Raramente se encuentran áreas pseudopapilares (87) y estructuras foliculares benignas atrapadas (85, 87, 207, 209). Se han publicado casos de carcinoma medular con áreas foliculares malignas, que han sido denominados "carcinoma mixto folicular-medular" (80, 125). En ocasiones se pueden observar células gigantes y se debe realizar el diagnóstico diferencial con el carcinoma anaplásico (139). El estroma es escaso y con frecuencia contiene amiloide (85). Algunos autores insisten en que no deberían diagnosticarse un carcinoma medular sin presencia de esta sustancia (85, 146, 203), pero estudios

ultraestructurales e inmunológicos han concluido que existen verdaderos carcinomas medulares sin este componente (75, 146). Estudios de la misma índole (177, 190) demuestran que el amiloide es un depósito tisular de procalcitonina segregada por las células tumorales con plegamiento beta de las cadenas polipépticas, siendo esta configuración espacial la responsable de las características del amiloide.

La diseminación de esta neoplasia es preferentemente por vía linfática y su evolución es tórpida (56, 95, 204).

A nivel inmunohistoquímico, las células contienen, además de calcitonina, CEA (113), Histamina (138), Somatostatina (187) y, en ocasiones, 5-HT y ACTH (35). Martín-Lacave y cols. (132) en un estudio inmunohistoquímico realizado con ácido periódico de Schiff, Azulalción a pH de 2,5 y lectinas (UEA-I, Con A, PNA, RCA-I, Succ., WGA, SBA y LFA), concluyen que la presencia de mucosustancias es un hallazgo constante en los carcinomas medulares, siendo extracelulares en el 100% de los casos e intracelulares en el 53,3 % de los mismos.

## B) TUMORES NO EPITELIALES

Los sarcomas de la glándula tiroides son raros (87, 135, 136). Fundamentalmente se han diagnosticado como fibrosarcoma y, excepcionalmente, como condrosarcomas, osteosarcomas y hemangiopericitomas malignos (135, 137, 152). En general no muestran ninguna característica propia para diferenciarlos de los sarcomas de otros órganos y, en ocasiones, es verdaderamente difícil distinguirlos de los carcinomas indiferenciados. Así pues, Hedinger (88) reexaminó 197 casos diagnosticados como sarcomas de tiroides y concluyó que el 97 % eran en realidad carcinomas anaplásicos. De estos últimos, los sarcomas se diferencian por no contener focos de epitelio maligno y por presentar sustancias intercelular formada por las propias células tumorales.

## C) TUMORES VARIOS

En este apartado se recogen cuatro tipos de tumores poco frecuentes:

### 1.- Carcinosarcoma

Se trata de un tumor extremadamente raro, consti-

tuido por elementos carcinomatosos y sarcomatosos íntimamente mezclados y sólo puede diagnosticarse con certeza cuando ambos componentes se encuentran en la metástasis (89).

## 2.- Hemangiendotelioma maligno

Es un tumor maligno, necrotizante y hemorrágico con espacios pseudovasculares revestidos de células neoplásicas de tipo epitelial. Algunos autores europeos, principalmente suizos, apoyan la idea que se trata de una entidad propia y lo refieren con una elevada frecuencia en sus series (16 %) (49), mientras que los investigadores americanos piensan que es una variante del carcinoma anaplásico (49, 112, 135). Suele estar bien encapsulado y se caracteriza por la presencia de necrosis, focos hemorrágicos y quistes llenos de sangre. El rasgo histopatológico fundamental es la existencia de hendiduras irregulares, revestidas de células de tipo endotelial que pueden proliferar en forma de sincitio o de cordones. La eritrofagia es muy característica pero no constante. Las fibras reticulares son abundantes y adoptan diversas disposiciones. Las metástasis son con frecuencia muy hemorrágicas (89).

### 3.- Linfoma

El tiroides puede ser asiento de linfomas primarios (el 5 % de todos los cánceres tiroideos) y secundarios. En cuanto a estos últimos, algunos autores refieren que el 20 % de los linfomas sistémicos afectan a la glándula tiroides (135, 136). Macroscopicamente, puede afectar a un lóbulo o a toda la glándula aumentando considerablemente su tamaño, llegando a pesar, en muchas ocasiones, entre 200 y 300 gramos (142, 208). La mayoría infiltran y ya han sobrepasado la cápsula en el momento de la intervención, afectando ganglios linfáticos cervicales y partes blandas (142, 208). Histológicamente se han descrito todas las variedades (142, 208) pero los tipos histológicos más frecuentes son el "linfoma maligno inmunoblástico de alto grado de malignidad" (133) y el "linfoma maligno folicular con predominio de células grandes, de grado intermedio de malignidad", según la clasificación de la Working Formulation.

Varios autores hacen referencia a la relación que presenta con la tiroiditis de Hashimoto, con incidencias del 25 al 85 % según las series (119, 208), sugiriendo la evolución de la tiroiditis hacia el linfoma. El diagnóstico diferencial más importante debe hacerse

con el carcinoma anaplásico de células pequeñas, de peor pronóstico. La supervivencia es del 50 % a los cinco años (30).

#### 4.- Teratomas

Son tumores raros que aparecen tanto en el tiroides como en los tejidos adyacentes. Representan la proliferación neoplásica de células germinales ectópicas. La mayoría están descritos en niños y, aunque son histológicamente benignos, algunos pueden mostrar una evolución desfavorable por afectar al aparato respiratorio. Los casos malignos se presentan en adultos y muestran áreas de neuroectodermo embrionario, rhabdomyosarcoma o condrosarcoma (130).

#### D) TUMORES SECUNDARIOS

La afectación tiroidea por neoplasias originadas en otros puntos del organismo ha sido estudiada y clasificada por Gowing (76). Este autor la divide en tres categorías: a) por extensión directa de otras estructuras; b) por diseminación linfática retrógrada; y c) por metástasis hematógenas.

Los carcinomas de laringe (subglóticos y postcricoideos), de faringe y de esófago, infiltran directamente el tiroides. Según la experiencia de Gowing (76) la diseminación linfática retrógrada ocurre, principalmente, en los tumores de mama. Por vía hemática cualquier tipo de carcinoma puede asentar secundariamente en el tiroides, pero los lugares de origen más frecuentes son: mama, pulmón, riñon y piel (135).

Estudios necrópsicos detectan afectación tiroidea entre el 4 y el 24 % de los fallecidos por diseminación neoplásica (76, 209). Algunos autores apoyan la idea de que en el tiroides con patología previa, la incidencia de metástasis es mayor (205).

#### E) TUMORES NO CLASIFICADOS

En este apartado se recogen los tumores primitivos malignos o benignos que no se pueden clasificar en ningún grupo anterior.

#### F) LESIONES PSEUDOTUMORALES

Diversas lesiones no neoplásicas pueden desencadenar un aumento del volumen de la glándula y presentar

sintomatología de tumoración. Se agrupan en este apartado todas aquellas que pueden confundirse con una neoplasia, desde el punto de vista histológico.

#### 1.- Bocio nodular

Cada una de las etapas evolutivas de este proceso puede simular una neoplasia, como por ejemplo, la intensa hiperplasia de algunos bocios congénitos, la estructura macropapilar del epitelio hiperplásico y los nódulos del bocio adenomatoso. Las macropapilas que se pueden encontrar en esta entidad no nos deben confundir con verdaderos carcinomas papilares. En los nódulos del bocio adenomatoso pueden estar presentes características macroscópicas típicas del adenoma folicular, tales como la encapsulación neta y la compresión del tejido circundante (89).

#### 2.- Lesiones quísticas

Generalmente se trata de focos degenerativos de un bocio adenomatoso o de un adenoma folicular, aunque pueden ser también restos embrionarios. A pesar de ello, debe hacerse un estudio detallado, pues muchos carcinomas y, principalmente, los papilares pueden ser quísticos (89).

### 3.- Tiroiditis linfocitaria

La intensa infiltración del tiroides por linfocitos puede hacer pensar en un linfoma, aunque la presencia de madurez linfocitaria junto a folículos linfoides con centros germinales, células plasmáticas y folículos tiroideos residuales revestidos por células acidófilas, determinan que la diferenciación entre estas entidades no sea extremadamente difícil.

### 4.- Tiroides aberrante

La porción central del tiroides se origina en el "foramen cecum" de la lengua y durante el desarrollo fetal, desciende para situarse en su posición normal. El trayecto realizado se denomina "conducto tireogloso" y a cualquier altura del mismo se pueden encontrar restos de parénquima tiroideo y sufrir transformación neoplásica. En la lengua se han descrito alrededor de 21 casos de carcinomas de tiroides (153, 181). La serie mayor es la publicada por Smithers (181). Por otro lado, el carcinoma desarrolla a lo largo del conducto tireogloso es algo más frecuente, estando recogidos alrededor de 87 casos.

El patrón histológico suele ser el papilar puro o el mixto papilar-folicular, aunque en ocasiones también se describe la variedad escamosa (163, 176). A consecuencia de que en el momento del diagnóstico suelen coexistir con un carcinoma del parénquima tiroideo, se piensa que podría tratarse de metástasis o lesiones multifocales (130).

#### 5.- Tiroides aberrante lateral

Se define como la presencia de tejido tiroideo en situación lateral a la vena yugular. Debido a que frecuentemente asienta en ganglios linfáticos, debe diferenciarse de la metástasis de un carcinoma oculto de tiroides, y por lo tanto, no detectable clínicamente (32, 167), aunque algunos autores piensan que no es necesario realizar este diagnóstico diferencial (162). En pocas ocasiones debe diferenciarse del establecimiento de tejido tiroideo normal, transportado a través de los vasos linfáticos (140). Posteriormente a la cirugía de cuello, se puede encontrar tejido tiroideo ectópico en el seno de tejidos blandos de esta región, situación que debe también distinguirse del tiroides aberrante lateral (130).

## 6.- Carcinoma asociado a struma ovarii

El ovario puede ser asiento de tumores de tiroides primarios. En 1970, Kenpers y cols. (108) revisaron la literatura y concluyeron que en el seno del struma ovarii se podían desarrollar carcinomas de células foliculares, y que en su mayoría eran de tipo papilar. También se han descrito carcinomas secretores de calcitonina asociados o no a teratoma (130). La histogénesis de estos tumores no está aún bien establecida.

Ante un tumor tiroideo, además de conocer el tipo histológico al que pertenece, es necesario saber el grado de diferenciación y el estadio de diseminación para así poder establecer el pronóstico y el tratamiento. El grado de diferenciación es un concepto poco utilizado en los carcinomas de tiroides, ya que la nomenclatura utilizada lo expresa por sí misma, pero por el contrario, el conocimiento del grado de diseminación es fundamental para determinar el pronóstico. Para ello, Smedal y cols. (180) realizaron estudios quirúrgicos y patológicos (cuadro II) necesarios para un correcto tratamiento.

## CUADRO II

### ESTADIOS QUIRURGICOS Y PATOLOGICOS DEL

#### CARCINOMA DE TIROIDES

(Smedal y cols. 1967) (180)

#### ESTADIO I

A/ Limitado a un lóbulo.

B/ Bilateral, multicéntrico o en el istmo.

#### ESTADIO II

El tumor primario como en los estadios Ia o Ib y metástasis en los ganglios linfáticos.

- Ganglios linfáticos unilaterales

- Ganglios linfáticos bilaterales, en mediastino o en la línea media.

#### ESTADIO III

Invasión de otros tejidos o estructuras del cuello o mediastino con o sin afectación linfática.

#### ESTADIO IV

Metástasis a distancia.

Sin embargo, la clasificación clínicopatológica sobre la que se apoya la investigación oncológica es la denominada "TNM". Esta clasificación la propuso DENOIX en 1944 a la Unión Internacional Contra el Cancer (UICC) creándose el Comité para la Clasificación TNM, que ha publicado ya varias actualizaciones, la última en 1982 (184). Esta clasificación se basa en tres parámetros fundamentales:

"T" = Expresa el tamaño del tumor primario, su aumento gradual y/o extensión local del mismo (T1, T2, T3 T4).

Otras siglas son:

TO = no hay evidencia de tumor primario.

TX = no se puede establecer la extensión tumoral sin cirugía previa.

"N" = Expresa la afectación de los ganglios linfáticos.

En este caso, las siglas son:

N<sub>1</sub>: afectación de los ganglios homolaterales

N<sub>2</sub>: afectación de los ganglios contralaterales

N<sub>3</sub>: afectos los ganglios a mayor distancia del tumor

N<sub>0</sub>: no hay evidencia de ganglios

N<sub>x</sub>: imposible de valorar sin cirugía previa

"M" = Expresa la existencia ( $M_1$ ) o no ( $M_0$ ) de metástasis. Las siglas  $M_x$  expresan la imposibilidad clínica para determinar la presencia o ausencia.

En cuanto a los carcinomas de tiroides, la gradación (N) y (M) es la ya mencionada, pero existen dos apartados a propósito del tumor primario (T), dependiendo de si se ha realizado cirugía previa (cuadro III) o no (cuadro IV).

CUADRO III

CLASIFICACION CLINICA PRE-TRATAMIENTO (T)

- T<sub>is</sub> = Carcinoma preinvasivo
- T<sub>o</sub> = No evidencia de tumor primario
- T<sub>1</sub> = Nódulo simple en un lóbulo con o sin deformidad de la glándula y sin limitación de la movilidad.
- T<sub>2</sub> = Múltiples nódulos en un lóbulo con o sin deformidad de la glándula y sin limitación de la movilidad.
- T<sub>3</sub> = Tumor bilateral con o sin deformidad de la glándula y con limitación de la movilidad, o bien, un nódulo único en el istmo.
- T<sub>4</sub> = Tumor con extensión más allá de la cápsula.
- T<sub>x</sub> = Imposibilidad para acceder al tumor primario



#### CUADRO IV

##### CLASIFICACION HISTOLOGICA POSTCIRUGIA (pt)

- pT<sub>is</sub> = Carcinoma preinvasivo
- pT<sub>0</sub> = En el estudio de la pieza no se encuentra tumor
- pT<sub>1</sub> = Nódulo único de 1 cm. o menos de diámetro, que no invade más allá de la cápsula
- pT<sub>2</sub> = Nódulo único, de más de 1 cm. de diámetro, que no invade más allá de la cápsula
- pT<sub>3</sub> = Múltiples nódulos (uni o bilaterales) y/o nódulo ístmico que no invade más allá de la cápsula
- pT<sub>4</sub> = Tumor que invade más allá de la cápsula
- pT<sub>x</sub> = No se puede valorar la extensión de la invasión

II) CRITERIOS ANATOMOPATOLOGICOS PARA EL DIAGNOSTICO DIFERENCIAL DE LOS TUMORES TIROIDEOS. LESIONES BENIGNAS Y MALIGNAS.

A) LESIONES BENIGNAS

Dentro del grupo de las lesiones benignas, el diagnóstico diferencial que debe realizarse con más frecuencia es entre el adenoma folicular y un adenoma atípico, cuya distinción se basa en la existencia o no de invasión capsular y/o vascular (57, 130); si no se observa invasión, la lesión se considera benigna a pesar de que muestre una alta celularidad, atipias nucleares o aumento de mitosis (57), características histológicas del adenoma atípico.

Cuando el adenoma tiene como denominador común la atipia, con abundantes mitocrondrias en las células tumorales y muy escasas mitosis, con núcleos voluminosos y pudiendo manifestar un cambio oxifílico difuso se denomina "adenoma de células de Hürthle"(58).

Gracias a las características histológicas entre ellas, la invasión de los vasos sanguíneos, que es mejor indicador de malignidad que la invasión capsular

(117), se diferenciarán los "adenomas foliculares" de los "carcinomas foliculares encapsulados", aunque resulte más difícil su distinción con el adenoma atípico (117).

En ocasiones debe diferenciarse el "adenoma folicular" de la "hiperplasia adenomatosa", que se presenta casi siempre multinodular, no encapsulada, mostrando el parénquima circulante imagen de bocio no tóxico; también hay que tener en cuenta, que los adenomas, a menudo, muestran cicatrización fibrosa central y, ocasionalmente, contienen áreas de hemorragia. Estas zonas hiperplásicas probablemente representen el final de un proceso alternante entre hiperactividad e involución. La existencia de múltiples nódulos, la falta de encapsulación y la evidencia de un bocio no tóxico en la hiperplasia adenomatosa, la diferencia de procesos malignos como el carcinoma, aunque presenten notables dificultades (130, 134).

Otra lesión benigna, considerada por algunos autores como un segundo tipo de adenoma es el adenoma papilar (4), proceso extremadamente raro y cuyo diagnóstico diferencial hay que realizarlo con el "adenoma folicular", por cuyas características histológicas no es com-

plicado, al igual que con la "hiperplasia adenomatosa"; la diferenciación con el "carcinoma papilar" se basará, en que esta última entidad muestra imágenes de infiltración, células con núcleo en "vidrio esmerilado" y cuerpos de psamoma (122), si bien podemos encontrar concreciones calcificadas en el interior de un adenoma papilar (135).

#### B) LESIONES MALIGNAS

Respecto al carcinoma folicular, el diagnóstico diferencial histopatológico con el carcinoma papilar se fundan en varias características como el patrón de crecimiento e histológico, y algunas tan específicas como los cuerpos de psamoma y los núcleos en "vidrio esmerilado", típicos del carcinoma papilar (53, 207). Las metástasis a distancia son frecuentes en el carcinoma folicular, sobre todo, en hueso y pulmón (56, 95, 135, 207), en contraste son escasas las linfadenopatías regionales y la multicentricidad tumoral (cuadro V).

Se puede realizar con la tiroiditis de Hashimoto, que en ocasiones ha sido diagnosticada erróneamente como un carcinoma folicular (53). Esto probablemente, es debido a la marcada atipia que se puede observar en las células oxifílicas de esta enfermedad. Debemos

entonces recordar que la infiltración linfocítica y la atipia nuclear no son hallazgos comunes en el carcinoma folicular.

Aparte del difícil diagnóstico diferencial con el carcinoma folicular, el "carcinoma papilar" hay que diferenciarlo de la hiperplasia epitelial, proceso cuyos núcleos pueden mostrar el aspecto en "vidrio esmerilado", pero sin cambios bruscos de los tipos nucleares como se encuentran en la periferia de los carcinomas papilares. Las evaginaciones papilares que se proyectan hacia la luz de los folículos son cortas en la hiperplasia, y la estructura lobulillar se encuentra conservada, mientras que en el carcinoma todo el lobulillo se halla deformado por la fibrosis (1, 98).

En ocasiones, hay que distinguir al carcinoma papilar de las "estructuras macropapilares en el bocio nodular". Este se realiza, fundamentalmente, porque el núcleo no muestra un aspecto en "vidrio esmerilado" y las papilas son cortas y anchas, conteniendo, a menudo, folículos, lo que habitualmente no ocurre en los carcinomas papilares.

El carcinoma epidermoide es un tumor altamente agresivo que invade con frecuencia estructuras vitales, siendo de crecimiento muy rápido, alcanzando y mostrando comprensión traqueal o esofágica, por lo que no debe confundirse con la propagación directa de un carcinoma de laringe, tráquea y esófago ni con metástasis. Así mismo, debe distinguirse de la metaplasia escamosa que con frecuencia se observa en algunos tumores y enfermedades no tumorales del tiroides (135, 136); para ello, la atipia citológica y el grado de actividad mitótica son las características más útiles (86, 92, 111).

El carcinoma indiferenciado o anaplásico, es la forma más maligna de los carcinomas del tiroides, donde histológicamente se diferencian tres variedades:

De células fusiformes, que debido a su constitución por células en forma oval y su patrón de crecimiento de tipo fascicular, debemos diferenciarlo del "fibrosarcoma", "fibrohistiocitoma" y del "hemangiopericitoma" (94, 149, 209).

De células gigantes, debe de ser diferenciado de otra neoplasia tiroidea poco frecuente, compuesta por células del estroma y células gigantes del tipo osteo-

clasto (177), con una apariencia indistinguible de la del "tumor óseo de células gigantes" (177).

Con la introducción del método inmunohistoquímico y de microscopia electrónica en el estudio de los carcinomas anaplásicos de células pequeñas, han permitido concluir que bajo esta denominación se englobe tipos histogenéticos diferentes: "carcinoma anaplásico con patrón difuso" y "carcinoma anaplásico con patrón compacto". Actualmente no se considera a ésta última lesión una entidad anatomoclínica definida, puesto que bajo un cuadro histopatológico similar se engloba el carcinoma tiroideo pobremente diferenciado (carcinoma insular), y a una variante morfológica peculiar del carcinoma medular. La forma menos común es la de carcinoma anaplásico de células pequeñas de patrón difuso, cuyo diagnóstico diferencial con el linfoma maligno puede ser imposible (199), sólo las bandas y columnas de células tumorales pueden darnos el diagnóstico de certeza de un carcinoma. Idéntica situación ocurre con el diagnóstico diferencial de un carcinoma anaplásico de células pequeñas con patrón difuso y un carcinoma medular. Por tanto, en principio y bajo el punto de vista clínico, en el diagnóstico diferencial de este tumor deben incluirse todos los procesos expansivos del cuello que interesen tanto al tiroides como a los tejidos blandos adyacentes.

Todas las variedades del carcinoma anaplásico tienen un crecimiento acelerado y voluminoso del tiroides, que se desarrolla de modo rápido y distorsionan severamente el contorno del cuello, por lo que debe ser considerado como lesión primitiva del tiroides y entra dentro del contexto del diagnóstico diferencial clínico del carcinoma anaplásico. Entre los procesos intraglandulares, el diagnóstico diferencial debe realizarse principalmente con: Tiroiditis de Riedel; Tiroiditis de Hashimoto; Bocio o Adenoma con hemorragia masiva; Sarcomas primitivos; Carcinomas escamosos y Carcinomas metastásicos. Entre las lesiones extratiroides que cursan con marcada deformación del cuello caben señalar los Sarcomas de partes blandas. Aunque los datos clínicos y analíticos pueden orientar el diagnóstico en algunos pacientes, el diagnóstico definitivo se basa en el estudio histológico de fragmentos obtenidos por punción-aspiración, biopsia o tiroidectomía total o parcial.

Histológicamente, el carcinoma anaplásico puede distinguirse con facilidad de la tiroiditis de Hashimoto, bocio o adenomas con hemorragias y de algunos carcinomas metastásicos, y plantea problemas de diagnóstico diferencial importantes con la tiroiditis de Riedel, sarcomas y, a veces, con el carcinoma escamoso.

El diagnóstico diferencial entre el carcinoma medular y el "carcinoma papilar" puede resultar problemático si existen estructuras pseudopapilares (107), pero también, puede crear dificultad de diagnóstico, cuando el carcinoma medular no presenta su componente amiloideo (196), recurriendo a la determinación inmunohistoquímica de calcitonina (93). Sin embargo, recientemente se han descrito tumores con morfología de carcinoma folicular y, que además de contener tiroglobulina, son positivos para las reacciones inmunohistoquímicas de somatostatina y calcitonina (46, 124, 125, 151).

Ocasionalmente, en los carcinomas medulares se pueden observar células gigantes, en este caso hay que realizar el diagnóstico diferencial con el carcinoma anaplásico de células gigantes (139). También es importante diferenciar el carcinoma medular con células fusiforme de el carcinoma anaplásico respectivo (139).

Es verdaderamente difícil diferenciar a los tumores no epiteliales del tiroides de los carcinomas anaplásicos fusiformes, por carecer de epitelio maligno asociado y presentar sustancia intercelular formada por las propias células tumorales, por ejemplo, colágeno, osteoide y condroide (88, 89, 135).

Dentro del apartado de los tumores metastásicos del tiroides, cuyo estudio y clasificación fué realizado por Gowing (76), que lo dividió en tres categorías dependiendo de su extensión directa a estructuras adyacentes; diseminación linfática retrógrada; y metástasis sanguíneas, siendo los lugares de origen más frecuentes la mama, pulmón, riñon y piel (135). Es necesario hacer un diagnóstico diferencial entre una metástasis tiroidea de carcinoma renal de células claras y un carcinoma de células claras primario del tiroides, pudiendo llegar a ser, en ocasiones, muy difícil. Se debe emplear la determinación de tiroglobulina para este fin, tal y como se ha comentado por Franssila y cols. (57), que opinan que los verdaderos carcinomas de tiroides de células claras son extremadamente infrecuentes y que en su mayor parte representan metástasis de un carcinoma renal.

Como regla general para el diagnóstico diferencial de un tumor metastásico de tiroides, debemos tener en cuenta que la presencia de mucina epitelial en los tumores malignos localizados dentro de la glándula indican que, con toda probabilidad es de origen metastásico. De la misma manera, la presencia de mucina en un tumor metastásico de origen desconocido, practicamente des-

carta la posibilidad de que el tumor primario esté en la glándula tiroidea.

Por último, el diagnóstico diferencial de los tumores de células de Hürthle, tiene que realizarse básicamente con los "nódulos no tumorales de células de Hürthle", que se encuentran dispersos en el parénquima tiroideo y acontecen en pacientes de avanzada edad, principalmente en relación con tiroiditis de Hashimoto y bocio nodular. Estos nódulos no presentan encapsulación y muestran variables grados de atipia nuclear (53).

CUADRO V

DIAGNOSTICO DIFERENCIAL HISTOLOGICO ENTRE  
CARCINOMA PAPILAR Y FOLICULAR

(Anderson, 1986)

	Papilar	Folicular
Encapsulación	Rara	Frecuente
Invasión	Muy invasor	Menos invasor
Focos tumorales múltiples	Frecuentes	Raros
Invasión de vasos sanguíneos	Rara	Frecuente
Patron celular	Papilas, Folículos, Grupos celulares sólidos	Folículos, Trabéculas, hay papilas.
Cuerpos de psamomas	Aproximadamente un 50%	Ninguno, pero puede aparecer coloidal calcificado
Núcleos	"en vidrio esmerilado", superpuestos.	Normocrómicos ó Hiperocrómicos, no superpuestos.

### III ) CITOMETRIA EN PATOLOGIA TUMORAL TIROIDEA

La evaluación analítica microfotométrica de las imágenes digitalizadas de células y tejidos ha adquirido, en los últimos años, un amplio desarrollo ya que proporciona datos objetivos para la gradación de cambios patológicos. De esta forma, las determinaciones de la ploidia en muestras estadísticamente adecuadas se ha transformado en una técnica viable que proporciona útiles guías pronósticas (18). Por otro lado, la introducción de video-microfotómetros de bajo precio y rápidos ha llevado a que la evaluación de los patrones ploides de una lesión dada sea casi un método de rutina en bastantes laboratorios de patología clínica. Por ello, la metodología se ha transferido de la fase de investigación a la de uso práctico en el laboratorio.

Así mismo, se ha trabajado durante bastantes años en el desarrollo de nuevos procedimientos de análisis de imagen, incluyendo el uso de los datos microfotométricos y la medida de la textura de la cromatina nuclear para la caracterización y clasificación de las células (19). Esta metodología se ha perfeccionado de tal manera que hoy es aplicable de forma rutinaria a las citologías y biopsias para resolver problemas de diagnóstico clínico.

En resumen, el descubrimiento de guías diagnósticas subvisuales ha sido uno de los resultados más sorprendentes de la evaluación analítica de las células, puesto que ha ampliado nuestra capacidad de detectar, objetivamente, sutiles cambios que no se pueden advertir con el examen visual.

Como antecedentes de la utilización de la citología de alta resolución en el diagnóstico de diferentes patologías podemos señalar como la expresión de imágenes marcadoras en displasias ó carcinoma de cérvix fué descrita primeramente por WIED (201), BIBBO (16 ) y BARTELS (11 ), todos ellos según la metodología TICAS (Taxonomic Intra-cellular Analytic System). Este hecho fué descrito simultaneamente por BURGER (29 ) y desde entonces ha sido confirmado por VOOIJS (198), REINHARDT (157 ), ROSENTHAL (161) y FU (64 ). KWIKKEL y cols. que describieron resultados similares en 1985 (116).

Previamente, en 1974, KLAWE y ROWINSKI (110) habían informado la existencia de cambios mensurables en frotis bucales de pacientes con enfermedad maligna. SHERMAN y KOSS descubrieron en 1983 la existencia de imágenes marcadoras similares en células uroteliales aparentemente normales (175). KING y MAYALL encontraron, también, idénticos cambios en células espumosas de pacientes con cáncer de mama (109).

Respecto a las lesiones tiroideas se han realizado varios trabajos sobre la valoración citométrica de las lesiones malignas ó benignas, ya que existen, en algunas ocasiones, numerosas dificultades para distinguir las lesiones benignas de los carcinomas malignos, y más aún, cuando no existe una clara infiltración capsular ó invasión vascular. Por ello, es lógico encontrar en la bibliografía numerosos antecedentes sobre la imposibilidad de clasificar, por ejemplo, a una lesión folicular como un adenoma atípico (84 ) ó un carcinoma folicular no invasivo (81 ); sobre todo, cuando se han descrito como algunas lesiones histológicamente benignas producen metástasis y, por lo tanto, tienen un comportamiento maligno (135,178). Las limitaciones que han impuesto los métodos histológicos en las neoplasias tiroideas foliculares enfatiza la necesidad de alternar otros métodos que posibiliten el diagnóstico de una malignidad potencial de estas lesiones (89 ,98 ,126 ,135,183, 210). Para ello se han realizado diversos trabajos que aplican métodos citométricos ó de cuantificación del ADN nuclear (156 ,168). Según FREUDENBERG ( 61), " la cuantificación del ADN por citofotometría convencional es un método de gran utilidad para distinguir los diversos tipos de carcinomas ".

JOHANNESSEN en 1981, realizó un amplio trabajo al estudiar mediante citometría de flujo el ADN nuclear en multitud de lesiones tiroideas, tanto neoplási

cas benignas y malignas, como no neoplásicas. Entre sus conclusiones podemos resaltar, como dentro de la población aneuploide, que siempre se había considerado como un signo de malignidad (169), pueden encontrarse tanto lesiones benignas como malignas, y además, un grado de aneuploidía en una lesión benigna puede ser un dato relevante sobre un potencial maligno. De igual manera, nos podemos encontrar carcinomas foliculares con un patrón diploide y, no por ello, descartar este diagnóstico. En cuanto a otras lesiones, los carcinomas anaplásicos siempre tienen, según este autor, un patrón aneuploide y las lesiones no tumorales un patrón unimodal diploide característico.

En esta misma línea, BIBBO y cols. en 1986 ( 19 ), estudiaron diversos parámetros citométricos nucleares para evidenciar signos subvisuales de malignidad, como la densidad óptica (OD), el tamaño ó la forma del núcleo, etc., a nivel del carcinoma papilar, carcinoma folicular, adenoma folicular y carcinoma de células de Hürtler. Estos autores manifiestan la existencia de diferencias estadísticamente significativas, respecto a la densidad óptica, al comparar los carcinomas con los controles de normalidad; no así, con los carcinomas de células de Hürtle, en donde no se observan claras diferencias.

Un dato importante que hay que señalar en este trabajo es la valoración de la densidad óptica, así como otros parámetros a nivel de las áreas adyacentes al tumor, lo cual puede ser un dato aproximativo relevante sobre su supuesta malignidad. Hay que tener en cuenta que la presencia del tumor puede inducir a cambios genéticos en las células, los cuales pueden llegar a ser detectados prematuramente con estos métodos.

#### A) NEOPLASIAS FOLICULARES

Como hemos indicado, el análisis citométrico no sólo permite aportar nuevos datos para el diagnóstico de una lesión, sino que en ocasiones, puede comportarse como un instrumento imprescindible para realizar el diagnóstico diferencial entre lesiones microscópicas similares. Este fué el caso planteado por el adenoma folicular y el carcinoma folicular encapsulado que fueron estudiados, por vez primera, por BOON y cols. (24 ) y SPRENGER y cols. (185), mediante planimetría en extensiones obtenidas por punción-aspiración y citometría, respectivamente. Con los métodos planimétricos se realizó un estudio de 21 adenomas foliculares, 13 carcinomas foliculares y 7 bocios no tóxico, con medición de las áreas nuclear y citoplásmica en 50 células por cada caso para diferenciar ambas lesiones. Entre los resultados encuentran que todos los carcinomas foliculares te-

nían un área nuclear media superior a  $90 \text{ nm}^2$ , mientras que solamente 4 de los 21 adenomas superaban esta cifra. Así pues, los valores de área nuclear media inferiores a  $90 \text{ nm}^2$  eran muy indicativos de lesión folicular benigna, mientras que aquellos superiores a  $90 \text{ nm}^2$  indicaban una alta probabilidad de carcinoma (76% en esta serie). Tras interrogarse acerca de la potencialidad evolutiva de las 4 lesiones con diagnóstico histológico de benignidad, pero con valores de área nuclear semejantes a los de los carcinomas foliculares, los autores postulan la existencia de diferencias significativas del área nuclear media entre los aspirados de neoplasias foliculares benignas y malignas. En un estudio ulterior (25) sobre 23 tumores tiroideos foliculares (13 adenomas y 10 carcinomas) y 10 metástasis de carcinomas foliculares tiroideos, BOON y cols. (24), informan que cuando se valoran otros parámetros cuantitativos adicionales, además del área nuclear (fundamentalmente la razón tamaño núcleo/ tamaño citoplasma, el tamaño nuclear medio y el perímetro nuclear medio) fue posible alcanzar una discriminación preoperatoria entre adenomas y carcinomas foliculares en todos, excepto uno de los 33 casos de la serie. Por el contrario SPRENGER y cols. (185) no han podido confirmar estas observaciones. Del mismo modo, JOHANNESSEN y cols. (104) en un trabajo sobre morfometría ultraestructural en neoplasias tiroideas, llegan a la conclusión, tras comparar los resultados de 6 ade-

nomas y 4 carcinomas foliculares, que los parámetros morfométricos tales como el tamaño nuclear y celular no permiten separar los adenomas de los carcinomas foliculares.

Posteriormente, se realizaron nuevos estudios sobre el contenido de ADN en los tumores foliculares por citometría en secciones histológicas. Los resultados obtenidos en un principio fueron muy ambíguos, puesto que se encontraron valores diploides, hiperploides y poliploides tanto en adenomas como en carcinomas foliculares (69, 79, 121, 156, 185, 129). Frente a estos antecedentes GALERA y cols. (66) estudiaron por técnicas de alta resolución diversos signos subvisuales nucleares sobre la morfología nuclear en 6 adenomas foliculares y 6 carcinomas foliculares encapsulados. Según sus resultados observó una diferencia estadísticamente significativa del área nuclear, siendo mayor en los carcinomas que en los adenomas, así mismo la densidad óptica media fue significativamente inferior en los carcinomas foliculares y superior en los adenomas.

Por otro lado, BIBBO y cols. (19) realizaron un estudio de análisis de imagen en cortes histológicos encaminados al igual que los anteriores autores comentados, a identificar hallazgos subvisuales que permitieran la distinción entre las células, aparentemente, sanas adyacentes a tumores y sus propias neoplasias en pa

cientes no sólo con adenomas y carcinomas foliculares sino con otras lesiones malignas del tiroides. Según es tos resultados de 20 parámetros investigados, la varian za de los valores de densidad óptica nuclear y el valor de la diferencia media de densidad óptica entre pixels adyacentes en los núcleos aparentemente sanos fueron los dos parámetros que más se aproximaban cuando tenemos que diferenciar las células tumorales de las no tumorales.

#### B) CARCINOMA PAPILAR

Los estudios morfométricos de carcinomas papi lares señalan aumento significativo del área nuclear me dia (129), así como de los volúmenes nuclear y celular (103).

Los estudios por citometría convencional y ci tometría de flujo del contenido nuclear de ADN de estos carcinomas han proporcionado diversos resultados. En los trabajos publicados, los núcleos de los carcinomas papilares han arrojado valores de ADN hipodiploide ( 97 , 99 , 121), diploides ( 9 , 44 , 169, 100), tetraploides (102), ligeramente aneuploides (13 , 69 , 121) ó aneuploi des ( 9 , 15, 44 , 97 ). Muchas de las series mencionadas recogen únicamente un reducido número de casos, por lo que resulta difícil extraer conclusiones definitivas.

Entre las series más numerosas figuran la de COHN y col. (44 ), de 90 casos, y la de JOHANNESSEN y cols. (99 ), de 22 casos de carcinoma papilar. COHN y cols. (44 ), han estudiado el contenido de ADN nuclear en 90 casos de carcinoma papilar practicando análisis citométrico en cortes histológicos de 71 casos, en material citológico de 14 casos, y tanto en cortes histológicos como en aspirados citológicos de los 15 casos restantes. En cada caso se realizó la medición sobre 70-100 células tumorales y se calculó el porcentaje de células aneuploides. De los 90 enfermos, 80 habían sobrevivido 10 años, y 10 enfermos habían muerto a causa del tumor. Los resultados de esta serie señalaron que todos los tumores del grupo de los 10 enfermos fallecidos a causa del carcinoma arrojaron porcentajes de células aneuploides superiores al 70%, mientras que ningún tumor del grupo de los 80 pacientes vivos tras los 10 años de seguimiento presentó porcentaje de células aneuploides superior al 60 %. Por otra parte, se obtuvieron porcentajes concordantes de células aneuploides en las muestras citológica e histológica en los 15 casos en que se realizó la determinación del ADN nuclear en ambos tipos de material. Los dos histogramas reproducidos en la publicación corresponden a un paciente fallecido (histograma aneuploide con valores muy dispersos de ADN) y a un paciente vivo (histograma diploide, con un pico en la región del valor 2c). COHN y cols. (44 ), basados en los

resultados susodichos, sugieren la existencia de una correlación entre la sobrevivencia de los pacientes y el contenido de ADN de las células tumorales, y abogan por la utilidad que puede prestar la determinación del ADN en aspirados citológicos de carcinomas papilares para evaluar el pronóstico y seleccionar los casos subsidia-rios de cirugía más extensa.

AUER y cols. ( 9 ) y KRAEMER y cols. (114), sugieren igualmente que la determinación del ADN nuclear puede ser útil en la diferenciación entre carcinomas tiroideos de curso clínico indolente y aquellos otros de curso agresivo. La citometría de flujo realizada en los 7 casos de carcinoma papilar de KRAEMER y cols., arrojó patrones diploides de ADN en 4 lesiones de curso indolente, y patrones aneuploides de ADN en 3 casos con curso clínico agresivo.

JOHANNESSEN y cols. ( 99,102), encuentran distribuciones de ADN de tipo unimodal en 21 de los 22 casos de carcinomas papilares estudiados con citometría de flujo a partir de muestras tisulares. En los 21 casos el contenido modal medio de ADN nuclear fue significativa-mente inferior al valor medio obtenido de tejido tiroi-deo normal. También el porcentaje de células en fase S fue inferior al del tejido tiroideo normal.

No se encontraron diferencias de ploidía entre

la lesión primaria y las metástasis en 8 de los 9 casos en que estas fueron analizadas. De los caracteres histológicos y citológicos considerados (patrón predominante, cuerpos de psamoma, células de Hürthle, núcleos en vidrio esmerilado, pleomorfismo nuclear e infiltrado linfocitario del estroma), sólo el predominio de las células de Hürthle (2 casos) modificó significativamente el contenido de ADN. Estos dos tumores presentaron un contenido medio de ADN superior a los demás. Los casos con abundantes núcleos claros mostraron un aumento significativo del porcentaje de células en fase S, que de todas formas seguía siendo menor que el del tejido tiroideo normal. El único caso de la serie que no mostró distribución unimodal correspondía a un tumor de evolución indolente, pero con múltiples metástasis a distancia. Tanto en la lesión primaria - estudiada con citometría convencional -, como en las metástasis - estudiadas con citometría de flujo -, la mayoría de las células tumorales presentaron un contenido tetraploide de ADN. También fue este el único caso en que se observó un patrón de ADN completamente diferente de la lesión primaria y altamente atípico, en una sola de sus localizaciones metastásicas.

Los 9 casos de carcinoma papilar estudiados por BENGTTSSON y cols. (15) con citometría a partir de improntas de piezas quirúrgicas produjeron histogramas de ADN incluidos en los grupos de histograma propios de las lesiones malignas (2 casos fueron clasificados en

el grupo III, 4 en el grupo IV y 3 en el grupo IV +), pero no se precisan detalles acerca de su curso clínico.

Con respecto a la variedad de carcinomas esclerosante oculto, IZUO y cols. (97) han estudiado con citometría a partir de cortes histológicos teñidos con técnicas de Feulgen 6 casos de esta entidad, y comparado los resultados con los de 5 casos de la variedad habitual (clínicamente detectable). Los histogramas de ADN de los carcinomas esclerosantes ocultos son similares a los de la variedad habitual. En ambas entidades la mayoría de los casos presentaron histogramas con un pico hipodiploide y sólo una minoría mostró patrones francamente aneuploides, con amplia dispersión de valores de ADN.

### C) NEOPLASIAS DE CELULAS DE HÜRTHLE

En cuanto al tumor de células de Hürthle que presenta un diagnóstico controvertido, no sólo por su baja incidencia sino por la ausencia de criterios histopatológicos fidedignos para su diagnóstico, como la invasión vascular y capsular ó el tamaño del tumor. La mayoría de los autores lo consideran una variedad morfológica muy peculiar del adenoma folicular y carcinoma papilar con transformación secundaria (91, 89, 122, 129). Sin embargo, otros autores lo consideran como un grupo aparte, y por tanto, diferente de otras variedades tumorales del tiroides (43, 60, 72, 193, 78, 155), denominán

dolas Oncocitomas con capacidad de metastatizar. En este sentido y para concretar, la Sociedad Oncológica Americana recomendó en 1951, la aplicación del término Carcinoma de células de Hürthle para dar énfasis a su naturaleza maligna.

Al igual que en otras lesiones tiroideas, las conclusiones morfométricas han aportado una nueva e importante ayuda en el diagnóstico y pronóstico del tumor de células de Hürthle, como lo han demostrado BONDESON y cols. (23 ), mediante estudios morfométricos del núcleo en extensiones obtenidas por punción-aspiración con aguja fina y GONZALEZ-CAMPORA y cols. (73 ). Estos autores estiman, entre otros datos, la importancia práctica de la valoración morfométrica del tamaño y el grado de atipia nuclear. No obstante, otros autores (129, 100, 9 ) han indicado que el análisis del contenido de ADN es un signo de gran valor para este diagnóstico.

En base a estos antecedentes, GALERA y cols. (66 ) han correlacionado el grado de ploidia de esta lesión tumoral con otros patrones clínicos e histológicos (edad, sexo, tamaño del tumor, patrón de crecimiento, grado de pleomorfismo e invasión o matástasis etc...) con la finalidad de aunar los distintos datos presentes en la literatura y establecer un patrón fidedigno que ayude al diagnóstico y pronóstico de este tumor.

Entre los resultados obtenidos está el grado de aneuploidia nuclear íntimamente ligado a una mayor frecuencia de metástasis o recurrencias, mientras el grado de euploidia y poliploidia se encuentran presente en los tumores que no desarrollan metástasis, conclusiones que corroboran los resultados obtenidos por GARNEAU y cols. en 1965 (69 ).

Por otro lado, este mismo autor, demuestra la relación entre el grado de malignidad, expresado como recurrencia o matástasis, con algunos antecedentes clínicos e histopatológicos como el pleomorfismo nuclear, mayor tamaño nuclear y atipia nuclear. En cuanto al patrón de crecimiento, de 5 tumores con metástasis, 2 presentaban incremento papilar, 3 un modelo sólido y 1 trabecular, sin que ninguno mostrara un patrón folicular. Es importante señalar que no se demostró una relación directa entre el mayor tamaño del tumor y el grado de malignidad como había sido indicado por otros autores ( 23, 36, 73).

#### D) CARCINOMA ANAPLASICO

Respecto a los carcinomas anaplásicos, los estudios morfométricos junto a la cuantificación del ADN nuclear han mostrado un gran valor en su diagnóstico, como lo han señalado numerosos autores (94 ,147,156, 100, 44, 9 ). En la literatura se apoya la hipótesis de que estos carcinomas pueden constituir por transforma-

ción de un carcinoma tiroideo diferenciado preexistente (145, 2 ). Como además tienen muy mal pronóstico, es obvio su gran importancia en el conocimiento precoz de signos subvisuales que pudieran indicar una tendencia a la transformación anaplásica. En este sentido se han realizado multitud de trabajos sobre el grado de ploidía de estos tumores (147,156,189,100, 9 ,114, 67), con la evidencia de que los carcinomas anaplásicos presentan, por regla general, un modelo aneuploide característico, lo que plantea la hipótesis de que los carcinomas diferenciados con aneuploidia representan un grupo de alto riesgo.

#### E) CARCINOMA MEDULAR

Con respecto a los carcinomas medulares, al igual que en anteriores lesiones se ha demostrado que la cuantificación del ADN, permite diferenciar o por lo menos añadir un valor pronóstico sobre la agresividad del tumor (129,121, 9 ,188,174, 68). De todas formas, los datos que se tienen al respecto son contradictorios puesto que se incluyen valores diploides, poliploides y aneuploides. SCHRÖDER y cols. (174) indican que la mayoría de los carcinomas medulares de tiroides expresan un modelo diploide y, además, es más frecuente un curso benigno de la enfermedad en pacientes con patrón diploide que con un alto contenido de ADN.

Los estudios con citometría de flujo (114,188) en estos tumores han encontrado casos con distribución unimodal del ADN nuclear y otro con distribución bimodal, sin que fuera posible relacionar esta diferencia de patrones de ADN con ninguna característica histológica ni ultraestructural de las lesiones. En una serie de 10 casos de carcinoma medular estudiados con citometría de flujo por TANGEN y cols. (188), 6 tumores mostraron distribución unimodal, y los 4 restantes distribución bimodal del ADN nuclear. Este estudio indicó asimismo que el contenido modal medio de ADN de los carcinomas medulares no es mayor que el de las células del parénquima tiroideo de aspecto histológico normal. Los patrones bimodales parecían ocurrir con más frecuencia en los focos metastásicos que en las lesiones primarias. En estos tumores uno de los picos del histograma de ADN se localiza usualmente en la región del valor diploide de ADN (2c), mientras que el otro se sitúa algún punto del área hiperdiploide (valores de ADN superiores a 2c) del histograma. En la mayoría de los casos no se producen diferencias entre el patrón de ADN de la lesión primaria y el de las matástasis, pero en algunos pacientes coexisten diferentes patrones de ADN, por lo general más irregulares en las metástasis que en la neoplasia primaria (114,188).

En la serie de TANGEN (188), y aún cuando el seguimiento clínico fue corto en muchos pacientes, los

patrones bimodales anormales no parecían conllevar implicaciones pronósticas. Por otra parte, el valor medio del porcentaje de células en fase S en los carcinomas medulares de esta serie fue de  $6,7 \% \pm 2,5$ , cifra significativamente más elevada que la encontrada en tejido tiroideo normal, que es de  $4,4 \% \pm 1,9$ . También es superior a la observada en carcinomas foliculares y papilares, pero inferior a la de los carcinomas anaplásicos (99,100).

Según GALERA y cols. (68), el grado de ploidia de un tumor sólo tiene una utilidad pronóstica después de valorar una serie de observaciones clínicas como el estado de la lesión, edad y sexo. De tal forma, que sólo tendría un valor prioritario para medir el grado de morbilidad. Por otro lado, se relaciona las conclusiones obtenidas después de la cuantificación del ADN de 37 carcinomas medulares de tiroides con otros parámetros citométricos nucleares (área, forma, textura cromatínica, distancia entre núcleos), y los resultados clínicos e histológicos obtenidos.

Entre sus resultados es importante señalar, en primer lugar, la falta de relación entre los parámetros cariométricos y el estado clínico; aunque los pacientes con historia familiar de carcinoma medular de tiroides presentaron altos valores en la desviación

standar de la ploidia, del área y de la elongación nuclear.

Por otro lado, al establecer una relación entre el patrón histológico y los valores cariométricos se demuestra que los tumores con un patrón clásico presentan una menor distancia internuclear que en otros tumores con patrón papilar, glandular o de células pequeñas. Además los pacientes con metástasis locales o a distancia, recurrencia o muerte, muestran un mayor grado de elongación nuclear, y una diferencia estadísticamente significativa respecto a los pacientes con carcinoma medular de tiroides menos agresivos.

Entre otros resultados, podemos comentar el análisis de COX (45 ) sobre el índice de supervivencia y mortalidad, donde señaló que solamente la edad, sexo y el grado de ploidia ( mayor o igual a 5 n.), en este orden decreciente, tiene un valor pronóstico. De forma que se podría decir, por ejemplo, que un carcinoma medular de tiroides tiene muy mal pronóstico cuando se presenta en un individuo de edad avanzada y con valores superiores a 5 n.

Por último, teniendo en cuenta solamente valores morfométricos, se comprobó que a mayor número de núcleos, alta celularidad y núcleos elongados, el pronóstico era peor.

Como se ha podido comprobar a lo largo de la bibliografía, las mediciones micromorfométricas y el análisis de imagen han demostrado su utilidad para la detección de pequeñas diferencias en células y tejidos. Además, se ha demostrado que la evolución estadística de datos micromorfométricos proporcionan una serie de características diagnósticas mensurables que suministran información para el diagnóstico. Tales resultados son referidos como signos subvisuales, puesto que no pueden ser percibidos con seguridad y fiabilidad por la sola inspección visual. Por ello, y para concluir este apartado, podemos señalar como las conclusiones computadas constituyen una nueva información que no ha sido previamente aplicada al diagnóstico y que puede ofrecer mayor potencial para una discriminación más fina, sensible y segura de cambios patológicos.

#### IV) VALORACION DE LA TEXTURA CROMATINICA EN LAS NEOPLASIAS FOLICULARES

Los criterios morfológicos habituales empleados en el diagnóstico de las distintas variedades de neoplasias foliculares benignas y malignas del tiroides se muestran con frecuencia insuficientes para el establecimiento de un diagnóstico diferencial preciso, así como para la predicción del comportamiento biológico. Por lo tanto es obvio la necesidad de métodos adicionales más sensibles para evaluar el potencial maligno de las neoplasias foliculares.

Diversos trabajos han puesto en evidencia que la determinación del contenido nuclear de ácido desoxirribonucleico (ADN) puede proporcionar información sobre el comportamiento tumoral ( 6 , 7 , 8 , 44, 50,115, 191).

Según CASPERSSON ( 41), la cituquímica cuantitativa nace cuando se logra la estimación de la cantidad de ADN y ARN en células individuales. De este modo, el contenido celular de ADN adquiere interés diagnóstico en la década de los años 50, cuando se descubre que las células tumorales presentan cantidades aumentadas de ADN ( 22 ). Muchos investigadores han mostrado que cuanto más maligno es un tumor más alto y más ampliamente

te disperso es el contenido de ADN de las células tumorales ( 22, 38, 50,211. ). Más aún, a mayor potencial maligno de la neoplasia se corresponde un porcentaje más alto de células aneuploides y un porcentaje menor de células con contenido de ADN de  $2n$  ( 44). Por otra parte, dado que las variaciones del ADN propias de la transformación neoplásica no siempre se manifiestan en cariotipos patológicos, como testimonian los tumores con cariotipos diploides aparentemente normales (170), parece útil determinar directamente el contenido de ADN nuclear en lugar de circunscribirse al estudio del cariotipo de las células tumorales.

Esta cuantificación del ADN nuclear se ha realizado mediante diversos métodos citoquímicos como la citometría de flujo, citometría de alta resolución y otros sistemas híbridos. Siendo la citometría de alta resolución ó sistema computarizado de análisis de imagen, la que ha permitido estudiar más objetivamente una célula en términos matemáticos y, por lo tanto, obtener una valoración exacta de la textura cromatínica.

En el caso de las neoplasias foliculares del tiroides son diversos los trabajos realizados mediante métodos citométricos para la cuantificación del ADN, ofreciendo en conjunto resultados y conclusiones muy heterogéneas ( 9 ,15 ,77 ,100,129,185).

BENGTSSON y cols. (15 ) encuentran una clara diferencia en el contenido del ADN entre los adenomas foliculares y los carcinomas foliculares. En su trabajo emplearon improntas de las piezas quirúrgicas obtenidas de 94 pacientes, entre los que había 8 casos de adenoma folicular y 6 casos de carcinoma folicular. La medición de ADN, efectuada con citofotometría con luz ultravioleta cuantificó célula a célula la cantidad de ADN de 50 células en cada impronta. Los histogramas obtenidos a partir de estos valores presentaron características diferenciadas para los adenomas foliculares y los carcinomas foliculares. Los primeros se comportaron como lesiones euploides, mientras que los segundos ofrecieron perfiles aneuploides de ADN. En la clasificación de los histogramas de ADN por los autores, los 8 adenomas foliculares reúnen los requisitos de alguno de los tres primeros grupos de histogramas, propios de las lesiones benignas (3 adenomas desarrollaron histogramas del grupo I, 3 del grupo II y 2 del grupo II +). Por el contrario, los 6 carcinomas foliculares presentaron histogramas de ADN que reunían los requisitos de los grupos de histograma característicos de las lesiones malignas: 5 casos fueron incluidos en el grupo IV, y el caso restante en el grupo IV +.

LUCKACS y cols. (129), han comunicado también diferencias llamativas en el contenido y distribución de ADN en las neoplasias foliculares benignas y malignas.

Mediante el empleo de técnicas citofluorimétricas en im-  
prontas procedentes de 22 casos de adenomas foliculares  
y 11 casos de carcinomas foliculares, se observa que  
los carcinomas foliculares presentan contenido alto de  
ADN, alrededor del 250 % del valor diploide, mientras  
que en los adenomas sólo se advierte un incremento mode-  
rado del contenido de ADN, que solamente alcanza el 130  
por ciento del valor diploide. Además, la desviación tí-  
pica de los datos obtenidos fue más de tres veces supe-  
rior en los carcinomas que en los adenomas. En esta se-  
rie dos casos diagnosticados de adenomas dieron valores  
elevados de ADN, comparables a los obtenidos en el gru-  
po de los carcinomas. Los autores opinan que en estos  
casos de discrepancia entre un diagnóstico histológico  
de benignidad y valores de ADN sugestivos de carcinoma  
es aconsejable reconsiderar el diagnóstico histológico  
en más bloques, puesto que es bastante posible que se  
haya iniciado la transformación maligna en alguna parte  
del nódulo.

AUER y cols. ( 9 ), en una serie de diversas  
lesiones tiroideas estudiadas con citometría e alta re-  
solución y con citometría de flujo sobre aspirados ti-  
roideos con aguja fina o en cortes histológicos inclu-  
yen 5 adenomas foliculares y 3 carcinomas foliculares.  
Los resultados obtenidos con la citometría de alta reso-  
lución y la citometría de flujo fueron concordantes.

Los histogramas de ADN de los adenomas foliculares fueron similares a los de las células tiroideas no neoplásicas, es decir exhibieron patrones de distribución de ADN euploides o poliploides. Por otra parte, en los carcinomas foliculares y otros carcinomas diferenciados se podían observar perfiles de ADN similares a los de las lesiones benignas (es decir patrones de distribución de ADN diploides o poliploides) ó bien histogramas de ADN aneuploides, es decir, claramente desviados de los patrones diploides y poliploides, con células con contenidos de ADN elevados y dispersos entre 2c y 4c ó superiores a 4c. Los tumores con histogramas aneuploides se acompañaron de supervivencias inferiores a los 5 años, mientras que los carcinomas con histogramas euploides con cantidades de ADN diploides y tetraploides pertenecían a pacientes que vivían 10 años después del diagnóstico. Fundados en estos datos, AUER y cols. ( 9 ), llegan a las siguientes conclusiones: a) la ausencia de aneuploidía no excluye la existencia de un tumor maligno; b) en la glándula tiroides la aneuploidía sólo se encuentra en neoplasias malignas; y c) en contraste con el valor diagnóstico limitado de las mediciones de ADN, éstas constituyen un importante indicador pronóstico.

GREENEBAUM y cols. ( 77 ), mediante citometría de flujo a partir de muestras tisulares o de aspirados con aguja fina, ó de ambos, obtienen patrones de ADN diploides en dos de 5 lesiones con diagnóstico histológico

de adenoma folicular, y patrones de ADN claramente aneuploides en los 3 restantes. Un caso de carcinoma folicular mostró igualmente un histograma de ADN aneuploide. La revisión por patólogos, no conocedores de los resultados de las mediciones de ADN, de las preparaciones histológicas de las 3 lesiones con patrón de ADN aneuploide y diagnóstico histológico previo de adenoma folicular condujo a la reclasificación de estas 3 neoplasias como carcinomas foliculares no invasores, basados en la pronunciada atipia celular, y a pesar de la ausencia de invasión capsular o vascular inequívocas. En un apartado a su publicación, GREENEBAUM y cols. ( 77 ), comunican patrones de ADN diploides en 7 adenomas foliculares, y patrones aneuploides en 4 carcinomas foliculares. Los autores concluyen que la aneuploidía en lesiones tiroideas sugiere un comportamiento maligno potencial, y aconsejan la revisión del diagnóstico histológico previo en casos de histogramas de ADN anormales. No obstante, el corto período de seguimiento de los casos (inferior a los dos años) no permite establecer juicios definitivos acerca del valor pronóstico de los resultados.

HAEMMERLI y cols. ( 79 ) en una serie de 235 lesiones nodulares de diferente aspecto microscópico, incluyendo 8 carcinomas, realizaron determinaciones de ADN mediante citofotometría con luz visible y con luz ultravioleta sobre las improntas obtenidas de 235 piezas tiroideas. Estas mediciones revelaron que el 77,5 %

de los nódulos con estructura microfolicular y el 78,5 por ciento de aquellos con cambio oncocítico poseían valores de ADN por encima del valor diploide (la mayoría de ellos con picos en torno al punto 3c y 3,5c respectivamente). Por el contrario los nódulos de estructura macro o normofolicular como los 8 carcinomas dieron valores de ADN dentro de la región del valor 2c.

SPRENGER y cols. (185) tampoco encuentra factible la distinción neta entre adenoma y carcinoma foliculares mediante determinación citofotométrica del ADN en aspirados con aguja fina practicados preoperatoriamente en 13 casos que fueron diagnosticados histológicamente de adenomas foliculares (4 casos), carcinomas foliculares (5 casos) y bocios nodulares coloides (4 casos). Los histogramas de ADN de los adenomas foliculares fueron poliploides con valores más frecuentes en las regiones 2c y 4c. Los carcinomas dieron histogramas puramente diploides en unos casos y valores de ADN muy dispersos hasta la región tetraploide (en 2 casos) o hasta la región octaploide (en 1 caso). Por último, los bocios nodulares coloides mostraron histogramas diploides con unas pocas células tetraploides (1 caso) o histogramas con valores ampliamente dispersos con picos en 2c y 4c (3 casos).

JOHANNESSEN y cols. (100) en su serie realizan citofotometría de flujo a partir de muestras tisula

res de 19 lesiones tiroideas entre las cuales figuraban 4 adenomas foliculares y 4 carcinomas foliculares. De ellos, 3 adenomas presentaron una distribución unimodal diploide del ADN nuclear, es decir, sus histogramas eran similares a los obtenidos de tejido tiroideo normal, con un pico único situado en la región del valor diploide de ADN (2c). El adenoma folicular restante mostró una distribución bimodal, es decir, con 2 picos de valores de ADN. De los 4 carcinomas foliculares, uno presentó una distribución bimodal, mientras que en los tres restantes se obtuvo una distribución o patrón de ADN unimodal diploide, similar a la observada en tejido normal, en los tres primeros adenomas, en cinco casos de tiroiditis de Hashimoto y en un caso de bocio hiperplásico (enfermedad de Graves) pertenecientes a la misma serie. Por otra parte, la media de los porcentajes de células en la fase S del ciclo celular fue similar en los carcinomas foliculares, en los adenomas foliculares, en las tiroiditis de Hashimoto y en el tejido tiroideo normal. En todas estas lesiones fue mucho más pequeña que en los 2 casos de carcinoma anaplásico de la serie.

Frente a estos antecedentes, GALERA y cols. (66) estudiaron por técnicas de alta resolución diversos signos subvisuales de la textura cromatínica junto con otros caracteres de la morfología nuclear, en 6 adenomas foliculares y otros tantos foliculares encapsulados, y sin olvidar las áreas adyacentes al tumor. Según

este trabajo, existen varios rasgos diferenciales que pueden aclarar en gran medida el clásico diagnóstico diferencial entre ambas lesiones foliculares, tales como la densidad óptica media, que fué significativamente inferior en los carcinomas foliculares, siendo el área nuclear mayor en dichos carcinomas. Estos resultados resuelve en cierta medida la problemática planteada en el diagnóstico diferencial de estas lesiones a la vez que impulsa el estudio de nuevas variables cariométricas en una serie más amplia de lesiones foliculares.

PLANTEAMIENTO DEL TEMA

Se ha demostrado que la evaluación computarizada de imágenes digitalizadas y la evaluación estadística de datos micromorfométricos proporciona una serie de características diagnósticas mensurables que suministran información para el diagnóstico. Tales datos diagnósticos son también referidos como datos subvisuales y constituyen una nueva información que no ha sido previamente aplicada al diagnóstico y que puede ofrecer un gran potencial para una discriminación más fina, sensible y segura de cambios patológicos.

El descubrimiento de la expresión de imágenes marcadoras en el tejido histológicamente normal que rodea a las lesiones premalignas o malignas en núcleos de células foliculares tiroideas obtenidos fuera de los tumores encapsulados plantean cuestiones de gran importancia: ¿Estos signos se desarrollan en tejidos que están sufriendo un cambio preneoplásicos y sólo en este momento son mensurables o estas imágenes marcadoras reflejan un "efecto de campo" y se expresan sólo en tejidos inmediatamente adyacentes a las lesiones malignas?.

Por otro lado, desde el punto de vista de la medicina práctica, a causa de las dificultades en el diagnóstico diferencial entre las lesiones foliculares be-

nignas y malignas en el tiroides y de la amplia variación en la presentación clínica, hallazgos histopatológicos y pronósticos de los tumores, los carcinomas de tiroides han constituido un enigma. Como resultado de estos confusos aspectos, la terapia de las lesiones tiroideas sigue siendo altamente controvertida en lo que respecta a la indicación y extensión de la resección quirúrgica, extensión de la resección de ganglios linfáticos regionales, uso del iodo radiactivo e, incluso, la práctica de la supresión tiroidea postoperatoria. La controversia sobre el modo de tratar a los pacientes con carcinoma tiroideos refleja la incapacidad de los médicos para predecir con exactitud la historia natural de esta enfermedad.

Si el verdadero comportamiento biológico del carcinoma folicular de tiroides bien diferenciado y el del nódulo adenomatoso de tiroides se pudiera predecir mediante análisis microfotométrico de la textura nuclear, algunos de los puntos en discusión podrán resolverse y evitarse así tratamientos agresivos innecesarios, determinándose la extensión de la cirugía por el conocimiento, mediante la expresión de las imágenes marcadoras del potencial biológico de un tumor particular. Así mismo, con este método, el diagnóstico histopatológico y

la eventual evaluación pronóstica de tumores tiroideos podrá ser un procedimiento objetivo en lugar de uno subjetivo y controvertido, como ha sido hasta ahora. Además, la utilidad diagnóstica de la evolución de la textura de la cromatina está siendo reconocida por un número creciente de investigadores y puede aplicarse junto con las determinaciones del patrón ploide, como se evidenció en el reciente Simposium Internacional de Detección Automatizada del Cáncer en Bruselas.

Con este planteamiento nos proponemos, en primer lugar, hacer un estudio sistemático de la extensión de estos cambios en el tejido histológicamente normal, valorando si dichos cambios, que han sido interpretados por otros como premalignos, se difunden por todo el tejido o bien se circunscriben a la vecindad de las lesiones. En segundo lugar, nos proponemos hacer un estudio amplio de estos cambios en lesiones foliculares benignas y malignas con provada evolución biológica a través de un seguimiento de duración fiable con la finalidad de examinar la utilidad diagnóstica de los datos subvisuales computados y determinar nuevos valores estadísticamente significativos para realizar el diagnóstico diferencial entre ambas lesiones.

MATERIAL Y METODOS

## I) MATERIAL

### A) TIROIDES TUMORAL Y AREAS ADYACENTES

Se ha seleccionado 20 pacientes de edades comprendidas entre 15 y 45 años que no presentan signos clínicos o bioquímicos de hipo o hiperfunción ni signos histológicos de hiperplasia o enfermedad inflamatoria difusa. Sólo se ha estudiado casos con el diagnóstico clínico o citológico de tumores diferenciados, dividiendolo en dos grupos de diez pacientes cada uno, según el diagnóstico patológico:

- a) Carcinoma folicular ampliamente invasivo (CFA).
- b) Carcinoma folicular microinvasivo ó encapsulado (CFE).

De las piezas quirúrgicas (tiroidectomias parciales ó totales), según nos refiramos al carcinoma microinvasivo o al carcinoma folicular ampliamente invasivo, obtuvimos por punción-aspiración con aguja fina el material citológico a estudiar. Descartamos las citologías obtenidas por punción con fines diagnósticos, debido a la dificultad en diferenciar las células normales de las anormales, lo cual no sería válido para microfotometría.

La punción se orientó por palpación, ultrasonidos y radioisótopos, así como por medio de los cortes realizados para la biopsia por congelación.

Además de los aspirados del área tumoral se obtuvieron aspirados de las áreas adyacentes al tumor, consideradas como tejido tiroideo normal, en todos los casos seleccionados (CFE/N y CFA/N).

#### B) TIROIDES NO TUMORAL

Constituye el grupo control (CONTROL) y está formado por 18 pacientes que no muestran lesiones tiroideas, en los que se ha realizado una extirpación de las paratiroides por hiperparatiroidismo sintomático ó progresivo, o bien en portadores de otras patologías cervicales no tumorales que han permitido el fácil acceso a la glándula tiroidea.

Al igual que en el grupo de tiroides tumoral se obtuvieron extensiones citológicas por punción-aspiración con aguja fina de las piezas quirúrgicas.

## II) METODOS

Los frotis obtenidos del grupo de trabajo y control se tiñeron con la técnica de Feulgen (1924) de acuerdo con los protocolos estandarizados en nuestro laboratorio para citomorfometría cuantitativa. La tinción ha tenido y tiene las mejores cualidades para su reproducibilidad y una dispersión mínima en los extensos análisis con multivariantes que hemos realizado.

### A) Protocolo para tinción de Feulgen.

Podríamos seguir el procedimiento de trabajo del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas (AFIP), de los doctores MIKEL y BAHR para una tinción con Feulgen reproducible y de confianza (1985).

Equipos y soluciones requeridas:

- Reactivo de Schiff's.
- Acido sulfuroso blanqueador.
- 23 recipientes de tinción.

Procedimiento:



1. Xileno	10 minutos
2. Xileno	5 "
3. Etanol 100%	5 "
4. Etanol 95%	5 "
5. Etanol 70%	5 "
6. Etanol 50%	5 "
7. Etanol 30%	5 "
8. Agua destilada	5 "
9. 5N HCl	60 "
10. Agua destilada	Un instante
11. Reactivo de Schiff's	60 minutos
12. Acido sulfuroso blanqueador	10 "
13. Acido sulfuroso blanqueador	10 "
14. Acido sulfuroso blanqueador	10 "
15. Agua corriente	5 "
16. Agua destilada	5 "
17. Etanol 30%	5 "
18. Etanol 50%	5 "
19. Etanol 70%	5 "
20. Etanol 95%	5 "
21. Etanol 100%	5 "
22. Xileno	5 "
23. Xileno	25 "
24. Montar	

Puntos de énfasis:

- 1.- Este paso es para extraer la parafina del corte.
- 2.- O más de tres horas, hasta que se extraiga la parafina.
- 9.- Hidrólisis.
- 11.- pH=1,5. El reactivo de Schiff's debe prepararse cada vez.
- 12.- La solución blanqueadora debe hacerse inmediatamente antes de usarse y debe guardarse en un frasco con tapón de rosca.

B) Textura de la cromatina nuclear.

La textura de la cromatina nuclear se evaluó computando una serie de características que describen la distribución espacial. Entre los rasgos para evaluar las propiedades tintoriales tenemos la suma total de la densidad óptica (D.O.), suma total de cromofoco/núcleo, densidad media de tinción, histograma de densidades ópticas, imágenes espectrales tales como la relación de densidades rojo/verde, contraste rojo/azul y contraste verde/azul. Entre las propiedades estadísticas tenemos la varianza de los valores de D.O. de los núcleos, la frecuencia con que aparecen ciertas diferencias de D.O.

entre pixels adyacentes, la relación entre áreas del núcleo con cromatina densamente teñida y áreas levemente teñidas. Para evaluar la distribución espacial de la cromatina tenemos la proyección de los valores de D.O. sobre el radio nuclear como un perfil polar, medidas de la tendencia de agregación de la cromatina en el centro ó la periferia del núcleo y la uniformidad o distribución en grumos de la cromatina. En las imágenes microfotométricas incluimos área nuclear, redondez y forma, tales como elipticidad y los valores de los coeficientes de Fourier de los contornos nucleares más ajustados. Concluyendo de que en cada núcleo se computarizaron un total de 337 hallazgos cariométricos.

Las imágenes celulares fueron digitalizadas a una densidad de muestreo de ocho pixels por micrómetro en un vídeo fotómetro de tres canales. El canal verde se utilizó para videofotometría; las imágenes se observaron a través de un objetivo de X40 con un n.a.= 1 y se recogieron en un sistema MATROX.

De cada extensión fueron medidas 50 núcleos procedentes de cada tumor y otros 50 del tejido adyacente no tumoral de aspecto normal. En los casos controles se midieron un total de 450 núcleos.

El estudio comparativo se llevó a cabo independientemente en cada entidad tumoral con sus respectivos controles. Se formaron grupos de prueba de 250 núcleos de CFE, CFE/N y de CFA, CFA/N tomados de cinco pacientes respectivamente, y 250 núcleos de los pacientes CONTROL. Para darle validez a la selección de hallazgos se realizó un tets de independencia de grupos con los restantes 250 núcleos de cada tipo de tumor (CFA y CFE) y de sus tejidos adyacentes (CFA/N y CFE/N) de los otros cinco pacientes, y con los 200 núcleos CONTROL restantes.

Cada grupo de núcleos estaba codificado según el diagnóstico histopatológico y el lugar de la aspiración de la siguiente forma:

\* Carcinoma Folicular microinvasivo o encapsulado:

CONTROL = grupo control o tiroides normal.

CFE = lesión tumoral.

CFE/N = zonas adyacentes al tumor histológicamente normal.

\* Carcinoma Folicular ampliamente invasivo:

CONTROL = grupo control o tiroides normal.

CFA = lesión tumoral.

CFA/N = zonas adyacentes al tumor histológicamente normal.

### C) Análisis Estadístico

Todos los análisis de varianza siguieron el diseño de agrupamiento en dos niveles, uno de tejidos con nivel fijo, y otro de pacientes con nivel aleatorio. Además se constituyeron subgrupos con núcleos individualizados.

En todos los análisis discriminantes por pasos se escogió como criterio la minimación de la Lambda de WILKS. El nivel de entrada para una variable se fijó en  $F= 3.0$ , bastante alto para minimizar la inclusión de variables falsas y suficientemente bondadosas para considerar como moderadas a las variables discriminantes.

## RESULTADOS

## I) CARCINOMA FOLICULAR ENCAPSULADO

### A) Datos Citométricos.

En las tablas I, II y III, aparecen consignados los patrones de ploidía, densidad óptica total y otros datos citométricos de los 10 carcinomas foliculares encapsulados y áreas adyacentes al tumor de apariencia histológicamente normal, así como del grupo control. En cada caso se indican los resultados obtenidos al realizar el análisis estadístico discriminatorio.

#### 1.- Densidad óptica.

En primer lugar, se estudió la distribución de la densidad óptica (DO) total en los núcleos CONTROL, CFE y CFE/N, según aparece recogido en la tabla I.

Los valores medios respectivos estaban en picos bien definidos en la región diploide o próxima a la diploide. La desviación a valores mayores de ploidía es muy evidente cuando se comparan las distribuciones de los núcleos CONTROL y los de CFE.

El análisis de varianza nos reveló que el discreto incremento de DO total en CFE/N es estadísticamente significativo, ya que al comparar las medias cuadradas paciente a paciente, el lugar de muestreo represen-

ta el 87.3 % del total de las medias cuadradas, siendo por consiguiente insignificante la variabilidad entre núcleos individuales.

En este tipo de tumor (CFE) el valor total de la densidad óptica aumentó un 5.7 % respecto a los valores normales, mostrando un grado diploide de 2.28 N. Lo cual es altamente significativo si lo comparamos con el grado de ploidía del carcinoma folicular ampliamente invasivo que es de 2.15 N.

## 2.- Otros datos citométricos.

La selección de hallazgos para la discriminación entre núcleos CONTROL y núcleos de CFE proporcionó un número sustancial de caracteres potencialmente útiles. Para el análisis discriminante se escogió un subgrupo de 10 hallazgos cariométricos con alto poder discriminatorio y representativos de los diferentes tipos de rasgos nucleares. Como se indicó en el apartado de "Material y Métodos", los grupos de prueba se constituyeron con los 250 núcleos CONTROL y 250 núcleos CFE. El algoritmo discriminante introdujo 8 de estos grupos en el proceso de discriminación. La tabla II muestra los valores medios de los hallazgos seleccionados y sus coeficientes estandarizados en las categorías CONTROL y CFE.

Como se demuestra en la tabla II, la medida del área nuclear provee la más óptima discriminación seguida del contaje del número de pixels en los extremos de mayor (pixels negros) y menor (pixels blancos) densidad óptica, en este mismo orden. Además hay que indicar que todos los hallazgos proporcionaron un rango-F en exceso de 5.0. La discriminación condujo a una reducción de la lambda de Wilks a 0.2573 y a un rango-F de 157.1 con 9 y 490 grados de libertad. La media de clasificación correcta en los grupos de prueba fue correspondientemente alta (95.8 %) (96.8 % para los núcleos CONTROL y 94.8 % para los núcleos de CFE). El test de independencia de grupos clasificó correctamente el 98.4 % de los casos (100 % de los núcleos CONTROL y 97.2 % de los núcleos de CFE).

En la figura 1 se muestra los valores medios observados en los 19 casos incluidos en la comparación de los dos mejores hallazgos discriminantes como son: área nuclear y número de pixels "negros" en el núcleo.

La selección de hallazgos para la discriminación de núcleos CONTROL y de CFE/N, proporcionó fundamentalmente descubrimientos descriptivos de la textura de la cromatina nuclear, tales como: varianza de los valores de la DO nuclear (RMS), relativa frecuencia de aparición de valores de DO en el rango 0.45 - 0.60, frecuencia de reaparición en la media superior de la DO,

RUN LENGTH NONMEASURE, medidas del nivel gris no uniforme, RUN LENGTH NON UNIFORMITY, homogeneidad y heterogeneidad en la DO, densidad media de tinción y el número de pixels en el núcleo que caen dentro del rango de la DO media.

## B) Análisis Estadístico

Puesto que el análisis discriminante de estos núcleos proporciona la base para una detección de marcadores nucleares en preparaciones de punción-aspiración con aguja fina; para su realización se consideraron dos grupos adicionales de prueba, como se describió en la sección de material y métodos. El primer grupo proporcionó una función discriminante basada en cinco de los hallazgos seleccionados previamente. La tabla III muestra los valores medios y sus coeficientes estandarizados en la función discriminatoria. Las variaciones en los grados de grises en el núcleo proporcionó la mejor diferenciación, seguido de la RUN LENGTH NON UNIFORMITY y de la media densidad de tinción. La lambda de Wilks se redujo a 0.3699, con un rango-F de 168.0 a 5 - 494 grados de libertad, sugiriendo una distinción excelente.

La clasificación correcta global para los grupos de prueba fue del 88.8 % (91.6 % para núcleos CONTROL y 86.0 % para los núcleos de los CFE/N). En la matriz de clasificación, la primera prueba de independen-

cia de grupos de 500 núcleos clasificó correctamente en el 83.6 % de los núcleos (84.4 % para los núcleos CONTROL y 82.8 % para los núcleos de los CFE); en la segunda prueba, también de grupos de 500 núcleos, la clasificación correcta media fué del 89.78 % (90.5 % para los núcleos CONTROL y 89.2 % para los núcleos del CFE). En la tercera prueba de grupos de 450 núcleos, la clasificación correcta media fue del 87.3 % (88.0 % para los núcleos CONTROL y 86.8 % para los núcleos de los CFE).

Como ya hemos indicado, al comparar el grupo CONTROL y el grupo CFE/N, es evidente que los núcleos de la región adyacente al carcinoma folicular encapsulado y de apariencia histológicamente normal exhibe una alta varianza de la densidad óptica cromatínica, siendo este rasgo el mejor carácter discriminante. Estos resultados se muestran gráficamente en la figura 2, al estudiar las distribuciones de la varianza de D.O. en 250 núcleos de los casos CONTROL y CFE/N.

## II) CARCINOMAS FOLICULARES AMPLIAMENTE INVASIVOS.

### A) Datos Citométricos.

En las tablas IV y VII se recogen los patrones de ploidía, densidad óptica total, contenido nuclear medio y otros datos citométricos de los 10 carcinomas foliculares ampliamente invasivos y, así mismo, los resultados obtenidos al compararlos con los alcanzados en el grupo CONTROL y en las áreas adyacentes al tumor de apariencia histológica normal.

#### 1.- Densidad óptica.

En la tabla IV se recogen las distribuciones correspondientes a las DO totales de los núcleos CONTROL CFA/N y CFA con sus respectivos niveles de confianza.

El análisis de varianza mostró que el incremento de DO en los núcleos CFA, del orden del 7.2 %, es estadísticamente significativo cuando se tiene en cuenta la variabilidad paciente a paciente, a un valor de F de 7.1, con 2 y 27 grados de libertad, y un valor de significación de alfa menor de 0.005. El valor crítico de la tabla es de 6.49. Los límites de confianza fueron computarizados en la media cuadrada de la tabla del ANOVA (tabla V). Se observa que el 86.1 % de la variabilidad total en los datos se debe a diferencias en el

origen tisular, mientras que sólo el 12.1 % está en relación con la variabilidad entre pacientes. La variabilidad entre núcleos individuales contribuye sólo al 1.7 por ciento de la media cuadrada. Las medidas de DO total se llevaron a cabo con el coeficiente de variación 13.4 por ciento.

El valor medio de la ploidía de los núcleos de CFA y CFA/N fue de 2.15 N, si al núcleo CONTROL se le asignaba un valor de 2 N. El incremento, aunque significativo, es demasiado pequeño para hacer de la DO total un marcador potencial para la presencia de un proceso maligno, si bien es de destacar que el incremento se ve tanto en los núcleos de CFA como CFA/N en la misma extensión.

## 2.-Otros datos citométricos.

La RMS fue uno de los marcadores útiles para la presencia de tumor maligno tiroideo en el estudio realizado en carcinomas foliculares encapsulados. La presente serie, también muestra un cambio estadísticamente significativo en los núcleos CFA/N, cuando se comparan con los valores de los núcleos CONTROL. La figura 5 muestra los valores medios obtenidos en 50 núcleos de cada uno de los 10 pacientes.

En la tabla VI, el ANOVA indica que en más de la mitad de los 10 pacientes con CFA la RMS está aumen-

tada en un 32 %. Este cambio, estadísticamente significativo y mayor que la variabilidad entre pacientes, conduce a un valor de F de 24.2, con 1 y 18 grados de libertad, y un nivel de significación menor de 0.0001. El valor crítico de la tabla es 15.4. La varianza de los valores de la DO nuclear ha sido medida con un coeficiente de variación de 22.7 %.

Por consiguiente, la RMS es un marcador potencial y señala al histograma de la DO como una fuente de marcadores adicionales. El histograma de las DO nucleares (fig. 4) indican una pronunciada desviación hacia la izquierda (cromatinas mas densamente teñidas) en la muestra CFA/N. En las regiones tumorales, por otro lado, los núcleos exponen un histograma con valores máximos de DO por debajo de los encontrados en los núcleos CONTROL.

La tendencia vista en los histogramas de DO de los núcleos CONTROL y CFA/N es sistemática. Si uno selecciona como hallazgo descriptivo la relativa frecuencia de ocurrencia de pixels con una DO de 0.15 - 0.20, por ejemplo en el cuarto intervalo del histograma, se advierte una diferencia estadísticamente significativa, ya que la variabilidad total de los datos se debe a diferencias en el origen tisular (86.4 %).

En la tabla VII se recogen los hallazgos descriptivos con sus respectivos valores medios, de la tex

tura cromatínica que pueden servir como marcadores nucleares, obtenidos en 50 núcleos de cada uno de los 10 pacientes, por ejemplo, una muestra de 500 núcleos para el origen tisular.

La figura 3 señala la distribución de pacientes CONTROL (círculos densos) y CFA/N (círculos claros) para los hallazgos RMS y RULENGTH NON UNIFORMITY.

### B) Análisis Estadísticos

Para conocer si las diferencias estadísticamente significativas son suficientes para permitir el reconocimiento de la muestra de un paciente portador de un CFA, incluso no siendo la susodicha de la región tumoral, ó si las diferencias pueden incluso permitir una clasificación individual de los núcleos de acuerdo con el tejido de origen, se llevaron a cabo varios análisis discriminantes. El resultado fue la identificación de 18 hallazgos con alto potencial discriminatorio entre los núcleos procedentes de la muestra CONTROL y los de CFA. El algoritmo discerniente lineal por pasos, seleccionó 10 de ellos que juntos nos llevaron a una reducción de la lambda de Wilks a 0.2757, con 10 y 498 grados de libertad, y una F-radio de 128.4, resultando una discriminación altamente significativa.

La tabla VIII indica los coeficientes de la

función discriminante estandarizados. En ella estan reflejados los hallazgos que contribuyen, principalmente, a la separación; cuanto mayor es su valor absoluto, tan to mayor es su contribución.

Los valores obtenidos en los grupos de prueba aparecen reflejados en la tabla IX. Es evidente que en las regiones tumorales los núcleos tienen mayor área nu clear. La DO total de los núcleos en el grupo de prueba fue de  $5248 \pm 454$  desviación standar, en los núcleos CON TROL, y de  $5481 \pm 1095$  desviación standar en los núcleos del CFA.

En la tabla X se muestra la matriz de clasifi cación. Es de destacar que de los ocho núcleos CONTROL mal clasificados, siete provenian del mismo paciente. De igual modo de los 35 núcleos de CFA mal clasificados, 33 de ellos procedian del mismo paciente.

En el subgrupo de prueba de 250 núcleos del grupo CONTROL y de muestra de CFA, se obtuvo una clasi ficación practicamente idéntica, confirmandose un "over trainig".

La selección de descubrimientos para la dis criminación de los núcleos CONTROL de los CFA/N, propor cionó 23 hallazgos con potencial discriminante. De es tos, el cálculo aritmético y algebraico discerniante por

pasos seleccionó a seis que podrian servir como marcadores nucleares para la presencia de CFA. La tabla XI refleja estos datos con los coeficientes estandarizados de sus funciones.

En la matriz de clasificación se ordenaron correctamente el 75.4 por ciento de los casos. Este resultado sugiere que realmente una proporción grande de núcleos de CFA/N expresan marcadores de lesiones malignas. La discriminación es estadísticamente muy significativa, con una lambda de Wilks final de 0.665, y una F-radio aproximada de 35.34 con 7 y 492 grados de libertad, a un nivel de alfa menor de 0.00001.

Debido al significado clínico diagnóstico de esta clasificación, y a la utilidad clínica potencial de la expresión de marcadores nucleares, se formó un grupo de prueba independiente adicional que se sometió al análisis discriminante, usando los mismos hallazgos de selección.

En el test de independencia de dos muestras de 250 núcleos cada uno procedentes del grupo CONTROL y CFA/N, se obtuvo una clasificación correcta para el grupo CONTROL del 71.5 por ciento y para el grupo CFA/N del 80.4 por ciento. La lambda de Wilks disminuyó a cifras de 0.6617 diferentes, con una F-radio de 56.88, 4 y 445 grados de libertad, y un nivel de alfa inferior a 0.00001.

El primer grupo estaba constituido por 250 núcleos CONTROL, y 250 núcleos de CFA/N de cinco pacientes cada uno, siendo la clasificación correcta en el 78.8 por ciento de los núcleos CONTROL y del 84.4 por ciento en los pertenecientes a los CFA/N. La lambda de Wilks se redujo a 0.5377. La separación de grupos es significativa a una radio-F de aproximadamente 46.8, con 490 grados de libertad y una alfa menor de 0.00001.

Para el segundo grupo, la matriz de clasificación resultante demuestra una clasificación correcta en el 83.0 por ciento de los núcleos CONTROL y del 83.2 por ciento de los núcleos del CFA/N. La lambda de Wilks disminuyo a 0.5519, siendo la separación de grupos significativa a una radio-F de 39.68, con 9 y 440 grados de libertad, y un nivel aproximado de significancia menor de 0.00001.

TABLA I: DENSIDAD OPTICA TOTAL Y PLOIDIA NUCLEAR EN LOS GRUPOS CONTROL,  
CFE/N Y CFE.

	MEDIA U.A.	Co VARIACION	PLOIDIA
CONTROL	5108.7	10.8	2
CFE/N	5418.0	5.7	2.11
CFE	5837.0	12.4	2.28

U.A. = unidades arbitrarias

TABLA II: HALLAZGOS CARIOMETRICOS INCLUIDOS EN EL ALGORITMO PARA LA DISCRIMINACIÓN ENTRE GRUPOS CONTROL Y CFE.

HALLAZGO	VALOR MEDIO		Co STANDARD
	CONTROL	CFE	
Densidad óptica total	5108.8	5837.0	0.2352
Area nuclear	23.32	38.78	0.8572
Intervalo DO 10-15	3.02	14.70	0.4662
Elementos concurrencia	0.0004	0.0193	0.1825
Media RUN LENGTH	191.78	1622.11	-0.3928
Perímetro nuclear	16.07	21.11	-0.2475
DO media *100	56.40	40.80	-0.1519
Pixels negros	344.64	819.99	-0.5276
Pixels blancos	325.27	679.14	0.4474

TABLA III: HALLAZGOS NUCLEARES SELECCIONADOS EN EL PRIMER GRUPO DE PRUEBA PARA LA DISCRIMINACIÓN DE NUCLEOS CONTROL Y CFE/N.

HALLAZGO STANDAR	VALOR MEDIO		Co STANDARD
	CONTROL	CFE/N	
Varianza de los valores de DO nuclear.	14.64	25.15	-1.6792
Frecuencia concurrencia	0.0007	0.0003	-0.3774
RUN LENGTH NON UNIFORM.	16.34	22.32	1.3763
DO media *100	56.40	71.36	0.7339
Pixels grises	868.37	545.55	0.4013

TABLA IV: DENSIDADES OPTICAS NUCLEARES Y NIVELES DE CONFIDENCIA EN GRUPOS CONTROL, CFA/N Y CFA.

	Media U.A.	CL <sub>95%</sub>
CONTROL	5108.7	5088.35 - 5129.05
CFA	5524.4	5475.15 - 5515.80
CFA/N	5495.5	5504.05 - 5544.75

U.A. = unidades arbitrarias

TABLA V: ANALISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE LA DENSIDAD OPTICA NUCLEAR.

FUENTE	DF	% MEDIA AL CUADRADO	F	ALFA
Origen tisular	2	86.1	7.098	-0.005
Pacientes	27	12.1	6.956	-0.005
Núcleos	1470	1.7		

TABLA VI: ANALISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE LA DENSIDAD OPTICA NUCLEAR.

FUENTE	DF	% MEDIA AL CUADRADO	F	ALFA
Origen tisular	1	95.8	24.19	-0.001
Pacientes	18	3.9	16.36	-0.001
Núcleos	980	0.2		

TABLA VII: HALLAZGOS CARIOMETRICOS DESCRIPTIVOS CON SUS VALORES MEDIOS.

HALLAZGO	CONTROL	CFA/N	CFA
RUN LENGTH NON UNIFORM.	16.40	20.10	9.73
Heterogeneidad DO	0.4394	0.5063	0.5992
Condensación de cromatina	0.3265	0.3815	0.4179
DO media en núcleos	0.564	0.639	0.398
Nº de pixels en los núcleos	324.25	377.40	726.27

TABLA VIII: HALLAZGOS SELECCIONADOS PARA LA DISCRIMINACION ENTRE NUCLEOS CONTROL Y CFA.

HALLAZGO	Co DE FUNCION ESTANDARIZADO
Area nuclear en micras al cuadrado.	0.526
DN/N DO Histograma:	
interv. 2	-0.339
interv. 3	0.888
interv. 4	0.785
Matriz de concurrencia 1.2 elemento.	0.494
Hallazgo de matriz RUN LENGTH NON UNIFORMITY.	-0.518
	-0.606
	-0.675
Nº de pixels muy oscuros en el núcleo.	-0.421
Nº de pixels claros en el núcleo.	0.869

TABLA IX: SELECCION DE HALLAZGOS EN LOS GRUPOS DE PRUEBA.

HALLAZGOS	CONTROL	CFA
AREA NUCLEAR	23.31	42.68
DN/N DO HISTOGRAMA INTERVALO 3	2.1 %	19.7 %
RUN LENGTH NON UNIFORMITY	60.2	153.6
Nº DE PIXELS MUY OSCUROS	347.9	843.9

TABLA X: MATRIZ DE CLASIFICACION DE LOS GRUPOS DE PRUEBA.

CLASIFICACION		
ORIGEN TISULAR	CONTROL	CFA
CONTROL	96.8 %	3.2 %
CFA	14.0 %	86.0 %

TABLA XI: HALLAZGOS SELECCIONADOS EN EL ALGORITMO DISCRIMINANTE POR PASOS  
 PARA DIFERENCIAR LOS NUCLEOS DE CFA/N DE LOS NUCLEOS CONTROL.

HALLAZGOS	Co ESTAND. DE FUNCION DISCRIM.
RMS	-0.727
DN/N DO HISTOGRAMA	
INTERVALO 2	-0.376
MATRIZ DE CONCURRENCIA	
1.2 ELEMENTO	0.198
	0.290
RUN LENGTH NON UNIFORMITY	-0.211
Nº DENSIDAD MEDIA PIXELS	
EN EL NUCLEO	-0.502

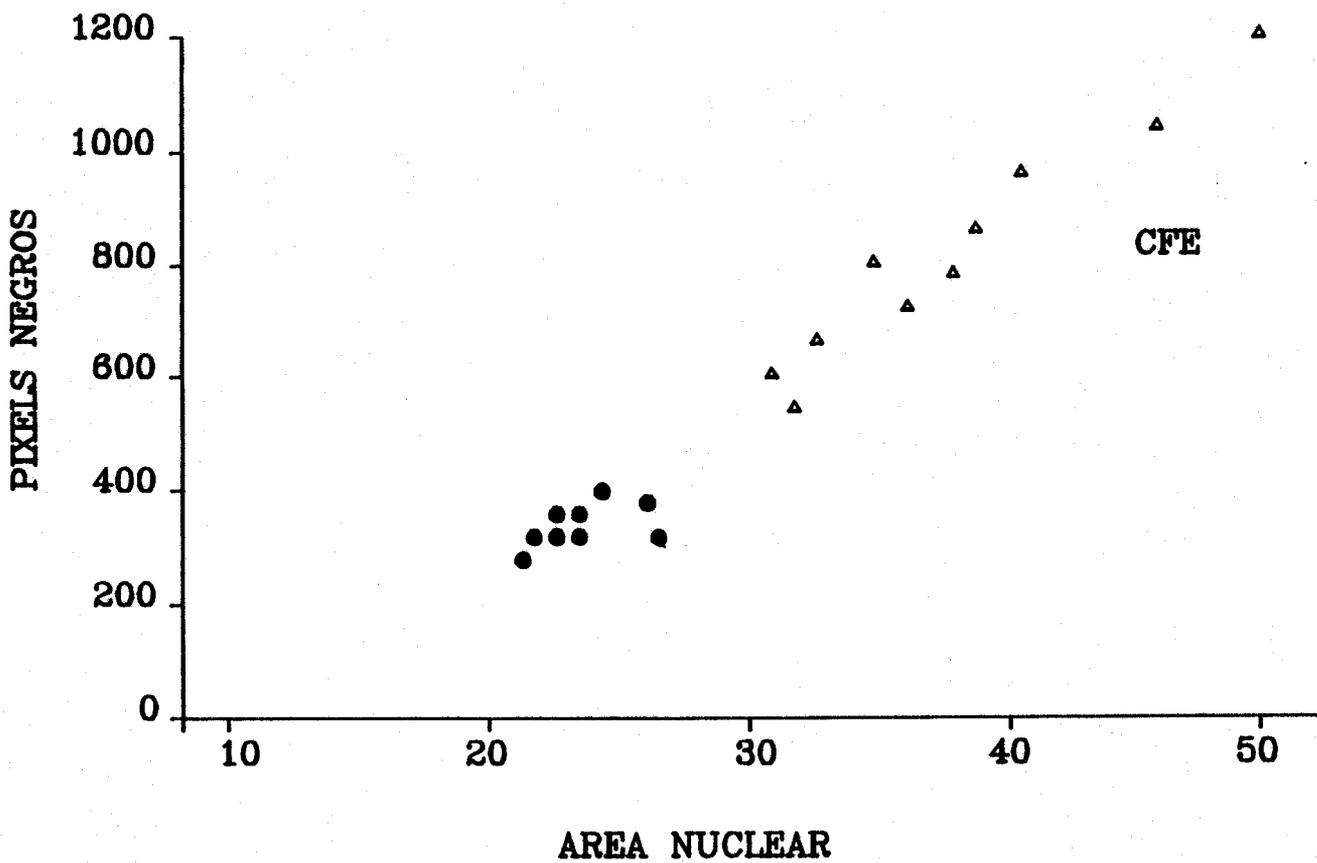
FIGURAS:

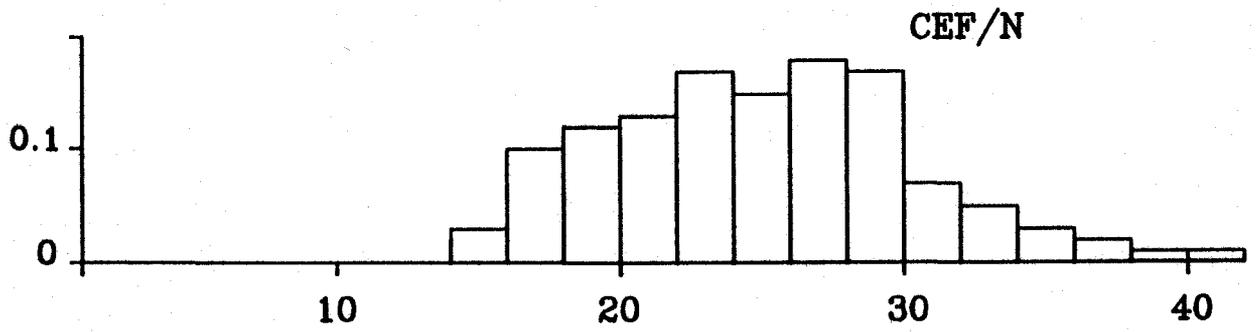
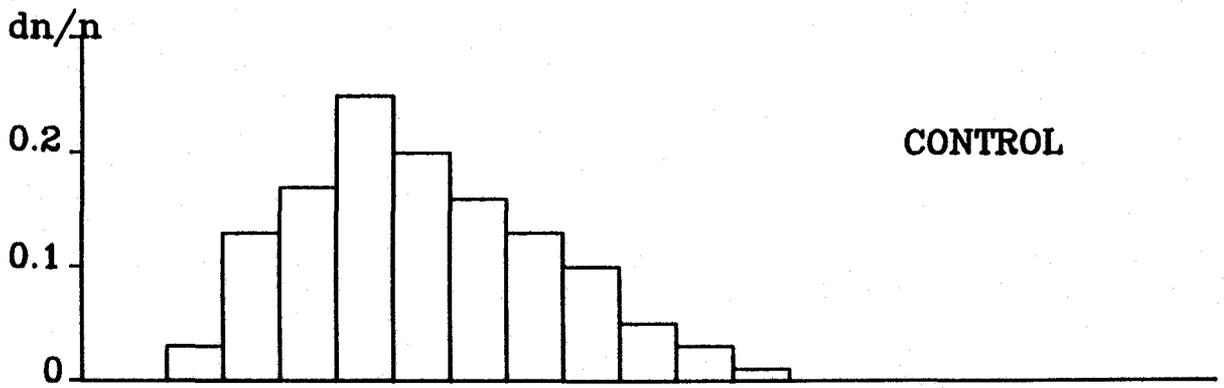
Fig. 1: Representación del área nuclear y del número de pixels negros por núcleo existentes en las muestras CONTROL y CFE.

Fig. 2: Histograma de la varianza de los valores de densidad óptica en muestras CONTROL y CFE/N.

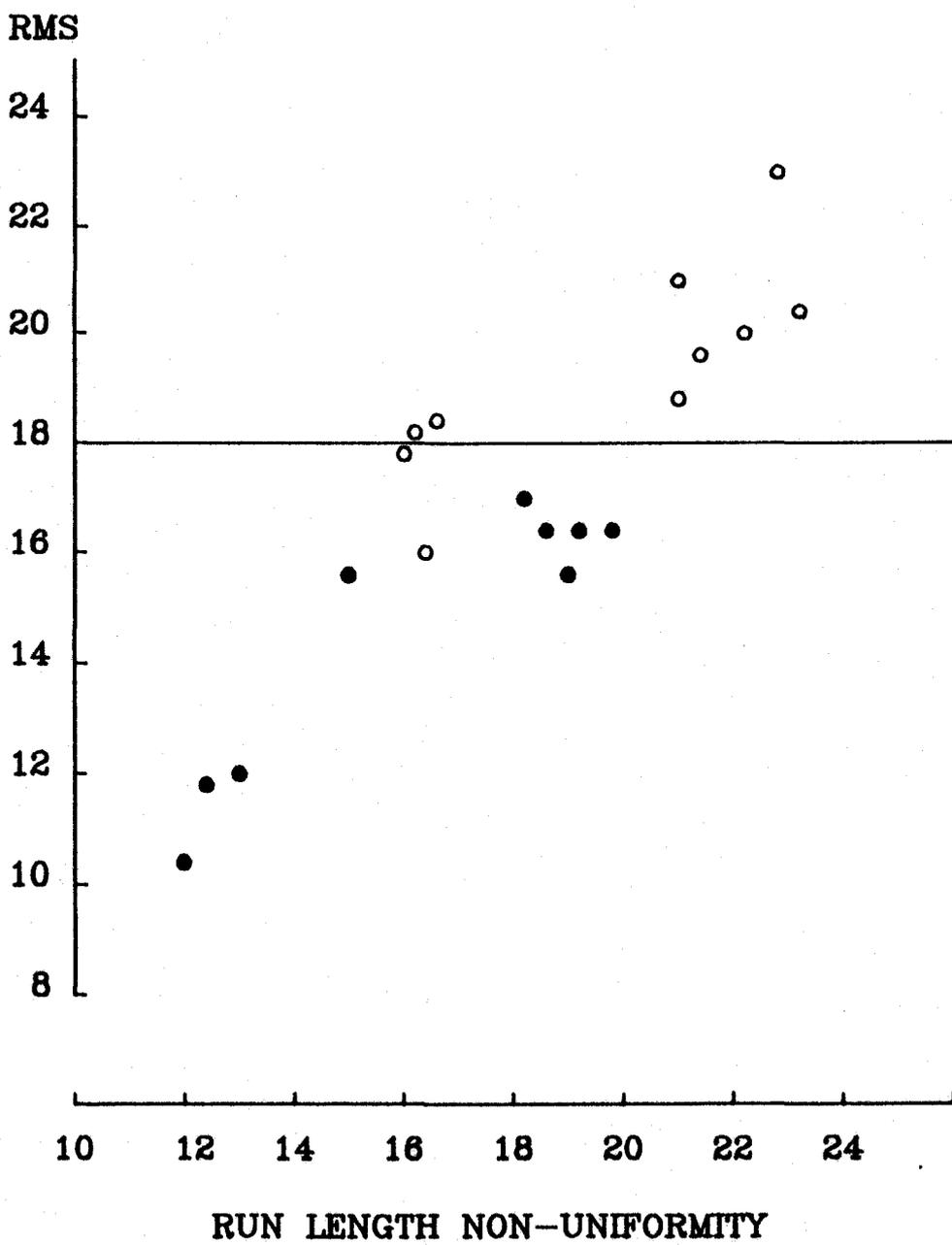
Fig. 3: Representación de los valores medios para los hallazgos RMS (varianza de valores de densidad óptica en el núcleo) y el "run length non-uniformity" obtenidas en pacientes del grupo CONTROL (círculos densos) y CFA/N (círculos claros)

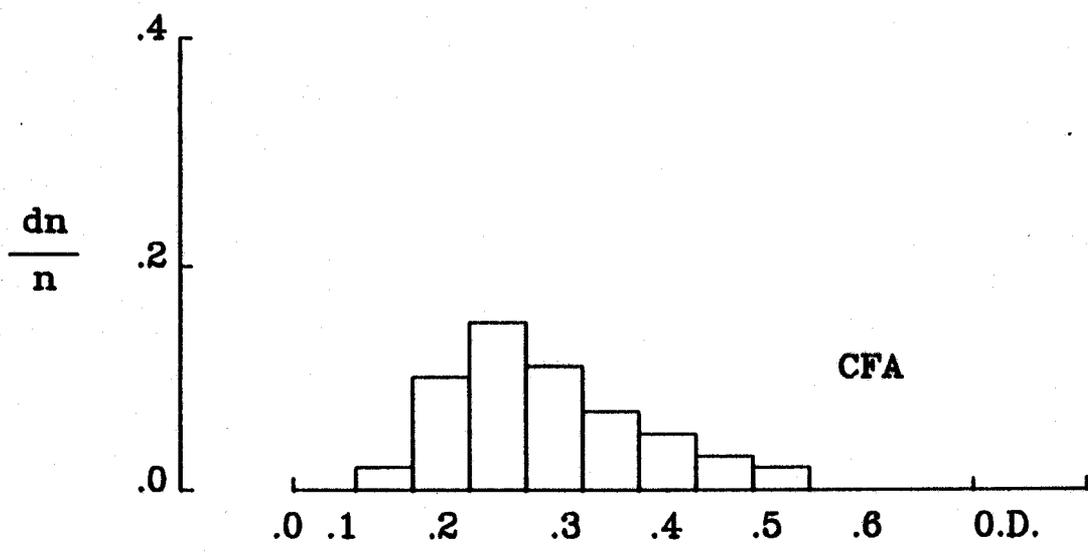
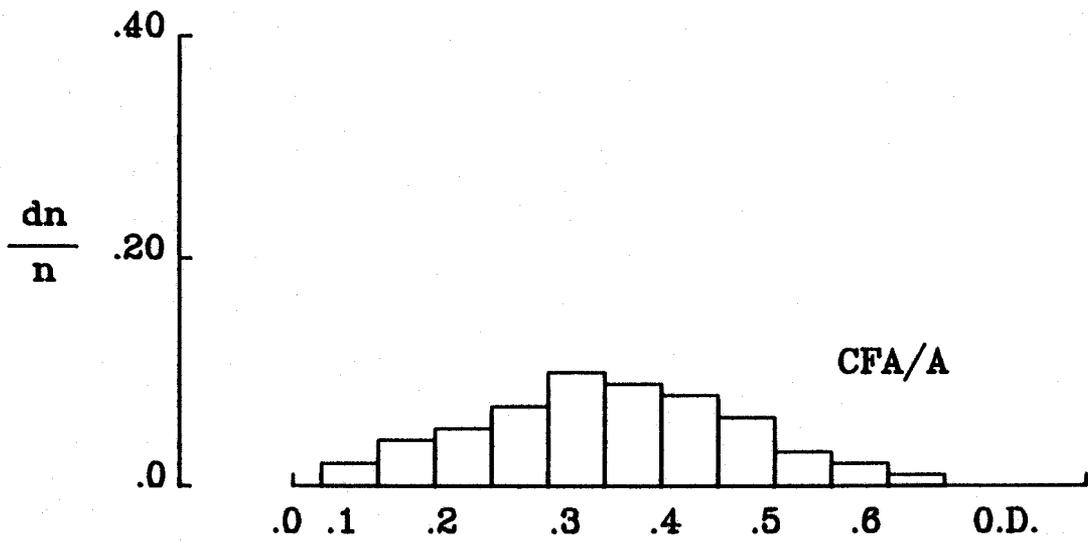
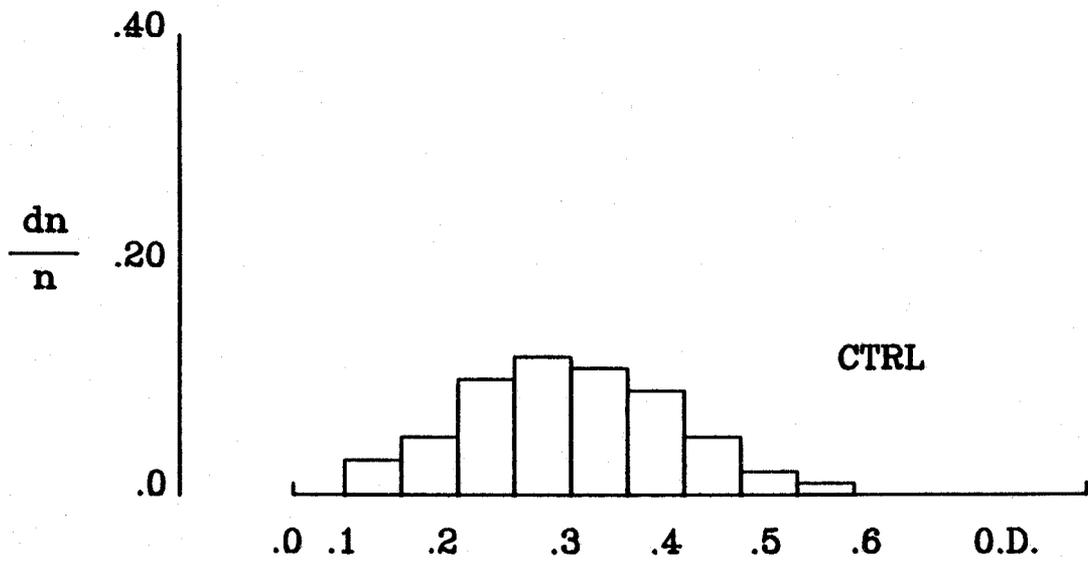
Fig. 4: Histogramas de los valores de densidad óptica nuclear en muestras CONTROL, CFA/N y CFA.





VARIANZA DE LA D.O.





DISCUSION

De acuerdo con el grado de invasión del tejido tiroideo, se distingue dos subtipos de carcinoma folicular de tiroides que conllevan diferentes pronósticos: Carcinoma folicular encapsulado o microinvasivo y el Carcinoma invasivo (207, 33, 59). Mientras que en el primero la supervivencia media a los diez años oscila entre el 70 a 95 por ciento; en el segundo desciende notablemente hasta el 35-45 por ciento (207, 55).

Habitualmente no existe gran dificultad al realizar el diagnóstico diferencial entre un carcinoma con clara invasión vascular y capsular, y una lesión benigna. Sin embargo, estas dificultades aparecen cuando el diagnóstico debe de hacerse entre un carcinoma encapsulado y un adenoma folicular, siendo este último punto uno de los más conflictivos de la patología tiroidea (171, 90). Fruto de esta controversia se han establecido una serie de criterios morfológicos que estudian el grado de invasión vascular y capsular, aumentando la extensión del número de bloques analizados (200, 117, 106). De todas formas, los resultados obtenidos no han podido ayudar con profundidad a la resolución de la problemática planteada.

Los estudios citométricos y planimétricos han apor

tado nuevas vías para distinguir rotundamente las lesiones benignas de los carcinomas foliculares. En este sentido, nuestros resultados del análisis citométrico de alta resolución del ADN nuclear se caracterizan por el hallazgo de un conjunto de criterios cariométricos que permiten una mejor discriminación entre los núcleos de los carcinomas foliculares encapsulados y los carcinomas foliculares ampliamente invasivos y los núcleos de las áreas adyacentes a estos tumores, e incluso entre estos núcleos y los controles.

En el carcinoma folicular encapsulado, los hallazgos que permiten una mejor discriminación entre núcleos CONTROL y CFE fueron el área nuclear y el número de pixels en los extremos de mayor y menor densidad óptica. En el caso del carcinoma folicular ampliamente invasivo los mejores caracteres incluían la relativa frecuencia de aparición de pixels con una D.O. en el tercer intervalo del histograma (DN/N histograma de D.O.: intervalo 3), y el número de pixels claros en el núcleo junto a una mayor área nuclear de las células tumorales.

Respecto a las áreas adyacentes, el mejor criterio cariométrico que las diferencia de las células CONTROL y más las aproxima a las células neoplásicas, tanto en

el carcinoma folicular encapsulado como en el neoplásico, es la varianza de los valores de densidad óptica nuclear.

Nuestros resultados plantean dos problemáticas de distinta interpretación: el hallazgo de rasgos cariométricos diferenciales entre las células tumorales del carcinoma folicular encapsulado e invasivo y las células no tumorales; y el descubrimiento de criterios discriminatorios en las áreas adyacentes a tumores foliculares.

En la primera cuestión, el análisis citométrico indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las medias aritméticas de las áreas nucleares de los CFE y CFA, respecto a las células CONTROL. En nuestra serie, por lo tanto, el área nuclear media permite clasificar con cierta fiabilidad una neoplasia folicular, de modo que valores superiores a 42 micrómetros cuadrados sugieren con mayor posibilidad una lesión folicular maligna. Siendo superiores los valores, generalmente, en el carcinoma folicular encapsulado que en el invasivo. Nuestros resultados están en la misma línea que los publicados por BOON y cols. (25, 26) que fueron obtenidos en preparaciones citológicas

de punción-aspiración; por el contrario no concuerdan con las observaciones de JOHANNESSEN y cols. (100, 101) ni de LUCK y cols. (127), quienes no han encontrado diferencias significativas entre las áreas nucleares medias, aunque en el presente caso se incluyan adenomas y carcinomas foliculares. Tales divergencias pueden obedecer por una parte al tipo de material empleado (frotis o fragmento tisular) y al método de medición, pero es posible asimismo, que al menos en parte obedezcan a las limitaciones inherentes al diagnóstico histológico de estas lesiones, agravadas por la difícil comprobación biológica de su naturaleza benigna o maligna, máxime cuando el tratamiento quirúrgico modifica su evolución natural. A este respecto es preciso recordar que lesiones clasificadas como benignas desde el punto de vista histológico, todas con área nuclear media inferior a 42 micrómetros cuadrados, deben considerarse al menos como potencialmente malignas. De este modo, la determinación del área nuclear media no mejorará por sí sola la exactitud diagnóstica de la microscopía convencional.

GALERA y cols. (66) han descrito resultados similares aunque en una serie más limitada. En este caso, se analiza el área nuclear de células procedentes de

seis adenomas foliculares y seis carcinomas foliculares encapsulados respecto a las células CONTROL, observándose una clara diferencia entre los carcinomas (69.09 U.I.) y los adenomas (41.9 U.I.).

Como se ha comprobado en nuestros resultados los mejores hallazgos discriminatorios se basan en la valoración de la textura nuclear. En el ejemplo del carcinoma folicular encapsulado, la valoración del número de pixels en los extremos del intervalo de la D.O. constituye el criterio más afortunado, mientras que en el carcinoma folicular ampliamente invasivo es el número de pixels en el intervalo 3 del histograma de la D.O.. Estos resultados no los podemos comparar con los de otros autores puesto que no hemos encontrado referencias en anteriores publicaciones. No obstante, existen descripciones de algunos datos de la textura cromatínica como la D.O. nuclear media que es significativamente superior en los carcinomas foliculares e inferior (60 %) en los adenomas foliculares (66). La N.D.I.F. (valor de la diferencia media de la densidad óptica entre pixels adyacentes) según BIBBO y cols. (19), también determina una evidente discriminación entre núcleos controles y núcleos de células de carcinoma folicular, sin hacer referencia a si es encapsulado o invasivo.

Respecto a la varianza de valores de D.O. nuclear, nuestros resultados indican una diferencia estadísticamente significativa entre los núcleos de las áreas adyacentes del carcinoma folicular encapsulado y ampliamente invasivo con relación a las células CONTROL. Aunque estos resultados son muy variables respecto a los valores obtenidos en cada caso, debido sobre todo a la variabilidad entre pacientes, estos cambios de la textura cromatínica se expresaron con claridad en más de las dos terceras partes de los pacientes con carcinoma folicular. Estos datos concuerdan con los obtenidos por diferentes autores (66,19) no sólo en los carcinomas foliculares sino también en los carcinomas papilares.

Es importante señalar que estos resultados complementan los datos obtenidos en anteriores publicaciones (66), donde se hace referencia a los valores encontrados en los adenomas y carcinomas foliculares. Para estos autores, la varianza de la D.O. nuclear fué mayor en las áreas tumorales y adyacentes de los adenomas e inferior en las de los carcinomas foliculares. Por lo cual podemos decir que el valor alcanzado por este rasgo cariométrico es muy importante para el diagnóstico de cualquier lesión, estando muy elevado en las lesiones benignas y en las áreas adyacentes a los carcinomas

foliculares tanto encapsulado como ampliamente invasivo. De todas formas se desconoce las causas de los cambios en la textura nuclear de las células adyacentes a tumores, podrían ser el resultado de la influencia carcinogénica sobre la glándula tiroidea en su totalidad o bien, el resultado de la influencia humoral secundaria a la presencia del tumor. Estos hallazgos podrían explicarse por cambios biomoleculares del material genético que no se puede apreciar con los medios actualmente a nuestro alcance.

Además de estos rasgos cariométricos claramente diferenciales entre los núcleos de las células tumorales y de las áreas adyacentes de los CFA y CFE, existen otras características que permiten discernir y por lo tanto ampliar la posibilidad de un mejor diagnóstico diferencial. Nos referimos, en este caso, a la valoración del contenido de ADN o ploidia nuclear de estas células. En el presente trabajo, los análisis citométricos del ADN nuclear se caracterizan por una evidente superposición entre las dos categorías histológica de carcinomas e incluso una superación del grado de ploidía en los carcinomas foliculares encapsulados. En efecto, se advirtieron un aumento estadísticamente significativo del contenido de ADN, tanto en las células tumorales del

CFE y CFA, así como en sus áreas adyacentes. Sin embargo, dicho aumento fué superior en el carcinoma folicular encapsulado donde se encontro un valor de 2.28. En el carcinoma folicular ampliamente invasivo se obtuvieron patrones ligeramente aneuploide de 2.15.

Nuestros resultados plantean dos problemas de interpretación: el hallazgo de patrones levemente aneuploide en carcinomas evidentemente invasivos por un lado, y el hallazgo de patrones aneuploide en células adyacentes a las tumorales, consideradas histológicamente normales, por otro.

Se ha informado de la existencia de carcinomas con patrones de ADN en el rango diploide en distintos órganos, incluido el tiroides (6, 9, 44, 69, 100, 102, 185). Se sabe que los tumores malignos diploides o ligeramente aneuploides de colon (206), mama (7, 8, 50, 62), pulmón (21), próstata (7, 191, 211) y ovario (50,62) conservan su carácter invasor y su potencial metastásico pero cursan con mejor pronóstico que tumores similares con patrones aneuploides. El mismo comportamiento ha sido observado en carcinomas tiroideos papilares (102) y foliculares (9). En realidad, a la luz de las teorías vigentes en la actualidad sobre la oncogénesis (170),

no resulta sorprendente el hallazgo de valores de ADN normales o próximos a la normalidad en algunos tumores malignos. En efecto, las alteraciones cromosómicas suficientes para originar una neoplasia pueden ser demasiado pequeñas para estar objetivadas con los métodos citométricos. De hecho, cabe observar tumores malignos con un cariotipo aparentemente normal, cuyos cromosomas sólo revelan escasas alteraciones tras empleo de técnicas de bandeado adecuadas (170). En otro trabajo (118) se ha descrito un ejemplo de un tumor maligno con patrón de ADN euploide, de una evolución clínica relativamente quiescente, pero indudablemente maligna, ya que determinó metástasis a distancia. GARNEAU (69) y GREENEBAUM (77) han descrito casos similares por técnicas de alta resolución. Sin embargo, tanto en el tumor definido por GARNEAU - estudiado con citometría estática-, como en los dos de GREENEBAUM - estudiado con citometría de flujo - la lesión primaria y la metastásica compartían un patrón similar de ADN, de tipo euploide o ligeramente aneuploide. Aún cuando el patrón ploide de los tumores suele comportarse como un marcador estable en sentido temporal y espacial, una proporción variable de diversos tumores, como por ejemplo el carcinoma pulmonar de células pequeñas o el melanoma, presenta metástasis con patrón ploide diferente de la lesión primaria ( 63 ).

Cabe pensar que esta divergencia entre lesión primaria y metastásica obedece al fenómeno de la heterogeneidad tumoral o heterogeneidad clonal, en el sentido de que las metástasis se habría originado a partir de una clona celular con mayores anormalidades del ADN nuclear, que habría sido seleccionada a partir de la lesión primaria, donde quizás se encontraba escasamente representada.

Los patrones de ADN aneuploides en las lesiones con diagnóstico histológico de carcinoma folicular encapsulado plantean, así mismo, problemas de interpretación; por un lado, este aumento es significativamente superior al obtenido en los carcinomas foliculares ampliamente invasivos, y por otro lado se registra tanto en las células tumorales como en las adyacentes. Por lo cual podemos indicar que la valoración del grado de ploidía no es por sí sólo un rasgo totalmente discriminatorio de malignidad. Como así lo han planteado numerosos autores (69, 13, 121, 185, 195, 99). Sin embargo, tiene un gran valor discriminatorio ante lesiones foliculares con un diagnóstico dudoso de malignidad como es el caso de los "adenomas atípicos" descritos hace 36 años por HAZARD y KENYON (84), que definían a un 2.7 % de adenomas foliculares con atipias citológicas sin eviu

dencia de invasión capsular o vascular. Para estos autores, los adenomas atípicos podrían ser adenocarcinomas encapsulados sin aparente invasión vascular.

GREENEBAUM y cols. (77) sugirieron sobre esta cuestión, que todas las lesiones foliculares diagnosticadas en un principio de benignas pero con las características descritas por HAZARD y KENYON asociadas a un patrón de aneuploidia es extremadamente indicativo de un carcinoma folicular microinvasivo. Estas afirmaciones fueron investigadas también por MILLER y cols. (141) y LUKACS y cols. (129), planteando la posibilidad de que los adenomas atípicos pueden representar verdaderos carcinomas "in situ", los cuales podrían transformarse posteriormente en carcinomas invasivos.

Según hemos indicado anteriormente, nuestros resultados, obtenidos sobre la textura nuclear, han aportado nuevas soluciones a este problema, ya que los marcadores cariométricos contribuyen a distinguir los núcleos de los carcinomas encapsulados frente a otras lesiones. Complementariamente, GALERA y cols. (66) señalaron caracteres cariométricos diferenciales entre los adenomas y carcinomas foliculares.

Es de gran importancia el grado de aneuploidía presente en las áreas adyacentes a los tumores puesto que nos está indicando graves alteraciones genéticas en estas células consideradas histológicamente normales.

Es importante considerar que estas células también mostraban alteraciones subvisuales de la textura cromatínica; por lo tanto, podíamos concluir que las zonas adyacentes a los tumores muestran una serie de signos que las aproxima a las células neoplásicas y que por lo tanto tienen un papel decisivo en el diagnóstico diferencial entre una lesión folicular maligna y una lesión benigna con diagnóstico dudoso. Aunque se desconocen las causas de los cambios en la textura nuclear de las células adyacentes a estos tumores, podrían ser, según argumenta GALERA y cols. (66) el resultado de la influencia carcinogénica sobre la glándula tiroides en su totalidad o bien, el resultado del efecto humoral secundario a la presencia de un tumor.

CONCLUSIONES

1) En la práctica histopatológica habitual no existe dificultad para establecer el diagnóstico diferencial entre carcinoma folicular invasivo y lesión benigna. Por el contrario, el grado de dificultad es acusado cuando se trata de distinguir entre carcinoma folicular encapsulado o microinvasivo y adenoma folicular, llegando en muchas ocasiones a ser prácticamente imposible tal distinción.

2) Los estudios citométricos apuntan nuevas fórmulas para distinguir objetivamente lesiones benignas de carcinomas foliculares.

3) En el carcinoma folicular encapsulado, los datos cariométricos que permiten una mejor discriminación entre los núcleos del tumor y los núcleos controles, son el área nuclear y el número de pixels en los extremos de mayor y de menor densidad óptica.

4) En el carcinoma folicular ampliamente invasivo, los datos cariométricos de mayor valor para la discriminación entre los núcleos tumorales y los controles, incluyen la frecuencia relativa de pixels con una densidad óptica determinada en el tercer intervalo del histograma (DN/N Histograma de Densidad Optica) y el número de

pixels claros en el núcleo, además de una mayor área nu  
clear en las células tumorales.

5) La varianza de los valores de densidad óptica (RMS) en el núcleo es el dato cariométrico que facilita la dis  
criminación entre los núcleos controles y los núcleos del tejido, aparentemente normal, adyacente tanto a car  
cinomas foliculares encapsulados como a carcinomas foli  
culares invasivos. Es decir, en el carcinoma folicular, cualquiera que sea su variedad, la varianza de los valo  
res de densidad óptica es el criterio cariométrico que permite diferenciar las células del tejido histológica-  
mente normal que se encuentra junto al tumor, de aque-  
llas células verdaderamente normales de un tiroides li-  
bre de tumor. Por consiguiente, este dato cariométrico de las células adyacentes al tumor, es el signo subvi-  
sual que más las aproxima a las células tumorales.

6) El número de pixels de densidad media también facili  
ta la particular discriminación entre los núcleos con-  
trol y los núcleos del tejido adyacente a carcinomas fo  
liculares invasivos.

7) La valoración de la ploidía nuclear o contenido de ADN demuestra solapamiento de las dos variedades histo-

lógicas de carcinoma folicular, tanto en las áreas tumorales como en las áreas adyacentes al tumor.

8) El área nuclear media permite clasificar con cierta fiabilidad las neoplasias foliculares de modo que valores superiores a 42 micrómetros cuadrados son sugestivos de tumor maligno, siendo estos valores incluso superiores en el tumor invasivo. No obstante, la difícil comprobación biológica de la naturaleza benigna o maligna de los tumores estudiados, impide descartar de forma radical la potencialidad maligna en tumores encapsulados con área nuclear media inferior a 42 micrómetros cuadrados. De este modo, el área nuclear media no mejora, por sí sola, el diagnóstico de la microscopía convencional.

9) Algunos carcinomas foliculares invasivos pueden presentar patrón diploide o ligeramente aneuploide, y por el contrario, patrones claramente aneuploides pueden hallarse en carcinomas foliculares encapsulados. Modificaciones cuantimétricas del DNA se expresan también en el tejido adyacente a estos tumores. En consecuencia, se puede indicar que la valoración del grado de ploidía no es por sí sola un dato discriminatorio de malignidad.

10) Se desconocen las causas de los cambios descritos en la textura nuclear de las células adyacentes a tumores, pero podrían ser el resultado de las influencias carcinogénicas sobre la totalidad de la glándula tiroidea, o bien el resultado de la influencia humoral secundaria a la presencia del tumor.

11) Las modificaciones en la textura nuclear podrían explicarse por cambios biomoleculares del material genético, que no resultan apreciables con los procedimientos actualmente a nuestro alcance.

**BIBLIOGRAFIA**

1.- ALBORES-SAAVEDRA J., ALTAMIRANO-DIMAS M., ALCOR TA-ANGUIZOLA B., SMITH M.: Fine structure of human papillary thyroid carcinoma. Cancer 28: 763-774, 1971.

2.- ALDINGER K. A., SAMAN N. A., IBÁÑEZ M., HILL C. S.: Anaplastic carcinoma of the thyroid. Cancer 41: 2267-2275, 1978.

3.- ANDERSON J. R.: Muir's textbook of pathology. Ed. J.R. Anderson. Twelfth edition. 1985. Maryland, U.S.A.

4.- ASHLEY D. J.: Tumors of the thuroid gland. En: Evan's Histological appearances of tumors. Ashley D.J. (ed), 3<sup>a</sup> ed., CHURCHILL LINNGSTONE. Nueva York, pp. 239-271, 1978.

5.- ATKIN N. B.: Modal deoxyribonucleic acid value and survival in carcinoma of the breast. Br. Med. J. 1: 271-272, 1972.

6.- ATKIN N.B., KAY R.: Prognostic significance of modal DNA valve and other factors in malignant tumours, based on 1465 cases. Br. J. Cancer, 40: 210-221, 1979.

7.- AUER G., ZETTERBERG A.: The prognostic significance of nuclear DNA content in malignant tumors of breast, prostate and cartilage. En: KOSS L G y COLEMAN D V (eds.): advances in clinical cytology, vol. 2 pp.

123-134. Masson publishing U.S.A., Inc. New York, 1984.

8.- AUER G., ERIKSSON E., AZAVEDO E.: Prognostic significance of nuclear DNA content in mammary adenocarcinomas in humans. Cancer Res. 44: 394-396, 1984.

9.- AUER G., BÄCKDAHL M., FORSSLUND G. M., ASKENTEN U. G.: Ploidy levels in nonneoplastic and neoplastic thyroid cells. Analyt Quant Cytol Histol. 7: 97-105 1985.

10.- BAHULEYAN C. K., RAMACHANDRAN P.: Primary squamous cell carcinoma of thyroid. Indian J. Cancer 9: 98, 1972.

11.- BARTELS P. H., BIBBO M., DYTCH H. E., PISHOTTA F. T., YAMAUCHI K., WIED G. L.: Diagnostic markers displays for intermediate cells from the uterine cervix. Acta Cytol., 26: 29-34, 1982.

12.- BARTELS P. H., WEBER J. E., BIBBO M.: Ploidy pattern analysis statistical considerations. Analytical and Quantitative Cytology and Histology. vol. 7, nº 2, June 1985.

13.- BEIERWALTES W. H., AL-SAAD I A. A.: Chromosome abnormalities in human thyroid disease. J. Clin. Endocr 26: 729-734, 1966.

14.- BEIERWALTES W. H.: Natural history of thyroid cancer. En: The thyroid. Ingbar S.H, Braverman L.E. (eds.), 5<sup>a</sup> ed, Lippincott Co. Philadelphia, pp. 1319-1328, 1986.

15.- BENGTTSSON A., MALMAEUS J., GRIMELIUS L., JOHANSSON H., PONTEN J., RASTAD J.: Measurement of nuclear DNA content in thyroid diagnosis. World J. Surg. 8: 481-486, 1984.

16.- BIBBO M., BARTELS P. H., SYCHRA J. J., WIED G. L.: Chromatin appearance in intermediate cells from patients with uterine cancer. Acta Cytol. 25: 23-28, 1981.

17.- BIBBO M., BARTELS P.H., DYTCH H.E., WIED G.L.: Computed cell image information. In Computer-Assisted Image Analisis Cytology. Edited by S.D. Greenberg. In Monographs in Clinical Cytology. Edited by G.L. Wied. Ninth vol. Basel, S. Karger, pp. 62-100, 1984.

18.- BIBBO M. y cols.: Ploidy measurement by high-resolution cytometry. Analyt. Quant. Cytol. Hitol. 7: 81-88 y 126-130, 1985.

19.- BIBBO M., BARTELS P.H., GALERA H., DYTCH H.E., WIED G.L.: Markers for malignancy in the nuclear texture of histologically normal tissues from patients with thyroid tumors. Analyt. Quant. Cytol. Histol., 8: 167-175, 1986.

20.- BIGNER S.H., MENDELSON G., WELLS S.A., COX E.B., BAYLIN S.B., EGGLIESTON J.L.: Medullary carcinoma of the thyroid in the multiple endocrine neoplasia IIa syndrome. Am J Surg Pathol. 5: 459-472, 1981.

21.- BLONDAL T., BENGTSSON A.: Nuclear DNA measurements in squamous cell carcinoma of the lung: A guide for prognostic evaluation. Anticancer Res., 1: 79-86, 1981.

22.- BOHM N., SANDRITTER W.: DNA in human tumors : A cytophotometric study. Curr. Top. Pathol. 60: 152-219, 1975.

23.- BONDESON L., BONDESON A.G., LINDHOLM K., LJUNGBERG O., TIBLIN S.: Morphometric studies on nuclei in smears of fine needle aspirates from oxyphilic tumors of the thyroid. Acta Cytol. 27: 437-440, 1983.

24.- BOON M.E., LÖWHAGEN T., WILLEMS J.S.: Planimetric studies on fine needle aspirates from follicular adenoma and follicular carcinoma of the thyroid. Acta Cytol. 24: 145-148, 1980.

25.- BOON M.E., LÖWHAGEN T., CARDOZO P.L., BLONK D.I., KURVER P.J.H., BAAK J.P.A.: Computation of preoperative diagnosis probability for follicular adenoma and carcinoma of the thyroid on aspiration smears. Analyt. Quant. Cytol. 4: 1-5, 1982.

26.- BOON M.E., LÖWHAGEN T., LOPEZ CARDOZO P., BLONK D.I., KURVER P.J.H., BADK J.P.A.: Computation of preoperative diagnosis probability for follicular adenoma and carcinoma of the thyroid on aspiration smears. *Analyt. Quant. Cytol.* 4: 1-5, 1983.

27.- BOQUOI E., KREBS S., KREUZER G.: Feulgen-DNA-cytophotometry on mammary tumor cells from aspiration biopsy smears. *Acta Cytol.* 19: 326-329, 1975.

28.- BRISIGOTTI M., LORENZINI P., ALESSI A., FABRETTI G., BALDONI C.: Mucin-producing adenoma of the thyroid gland. *Tumori* 72: 211-214, 1986.

29.- BURGER G., JUTTING U., RODENACKER K.: Changes in benign cells populations in cases of cervical cancer and its precursors. *Analyt. Quant. Cytol.* vol. 3, n° 4, pp. 261-271, 1981.

30.- BURKE J.S., BUTLER J.J., FULLER L.M.: Malignant lymphomas of the thyroid. *Cancer* 39: 1587-1602, 1977.

31.- BURT A.D., KERR D.J., BRAUN I.L., BOYLE P.: Lymphoid and epithelial markers in small cell anaplastic thyroid tumors. *J Clin. Pathol.*, 38: 893-896, 1985.

32.- BUTLER J.J., TULINIUS H., IBANÉZ H.L., BALLANTYNE A.J., CLARK R.J.: Significance of thyroid tissue in lymphodes associated with carcinoma of the head, neck or lung. Cancer 20: 103-112, 1967.

33.- CADY B., SEDGWICK C.E., MEISSNER W.A., WOOL M.S. SALZMAN F.A., WERBER J.: Risk factor analysis in differentiated thyroid cancer. Cancer 43: 810-820, 1979.

34.- CAMERON R.G., SEEMAYER T.A., WANG N.S., AHMED M. N., TABAH E.J.: Small cell malignant tumors of the thyroid. Hum. Pathol. 6: 731-740, 1975.

35.- CAPELLA C., BORDI C., MONGA G., BUFFA R., FONTANA P., BONFANTI S., BUSSOLATI G., SOLCIA E.: Multiple endocrine cell types in thyroid medullary carcinoma. Evidence for calcitonin, somatostatin, ACTH, 5-HT and small granule cells. Virchows Arch (Pathol. Anat.) 377: 111-128, 1978.

36.- CAPLAN R.H., ABELLERA R.M., KISKEN W.A.: Hürthle-cells tumors of the thyroid gland: A clinicopathologic review and lang-term follow-up. JAMA 251: 3114-3117, 1984.

37.- CARCANGIU M.L., ZAMPI G., ROSAI J.: Poorly differentiated ("insular") thyroid carcinoma. A reinterpretation of langhans "Wuchernde struma". Am J Surg Pathol. 8:655-668, 1984.

38.- CARCANGIU M.L., ZAMPI G., PUPI A., CASTAGNOLI A. ROSAI J.: Papillary carcinoma of the thyroid. A clinico pathologic study of 241 cases treated at the University of Florence, Italy. Cancer 55: 805-828, 1985.

39.- CARCANGIU M.L., STEEONER T., ZAMPI G., ROSAI J.: Anaplastic thyroid carcinoma. A study of 70 cases. Am J Clin. Pathol. 83: 135-158, 1985.

40.- CARNEY J.A., RYAN J., GUELLNER J.R.: Hyalinizing trabecular adenoma of the thyroid gland. Am J Surg Pathol. 11: 583-591, 1987.

41.- CASPERSSON T.: Über deu chemischen aufban der strukturen des zellkernes. Skand. Arch. Phys. Suppl. 8: 73, 1936.

42.- CHEN K.T.K., ROSAI J.: Follicular variant of thyroid papillary carcinoma: A clinicopathologic study of six cases. Am J Surg Pathol. 1: 123-130, 1977.

43.- CHESKY V.E., DREESE W.C., HELLWIG C.A.: Hürthle cell tumors of the thyroid. J. Endocrinol. Metab. 11: 1535-1548, 1951.

44.- COHN K, BACKDAHL M, FORSSLUND G, AUER G, LUNDELL G, LÖWHAGEN T.: Prognostic value of nuclear DNA content in papillary thyroid carcinoma. World J Surg 8: 470-480, 1984.

45.- COX D.R.: Regression models and life tables (with discussion). J. Roy Statist Soc series B, 34: 187-220, 1972.

46.- DE LELLIS R.A., NUNNEMACHER G., WOLFE H.J.: C-cells hyperplasia. An ultrastructural analysis. Lab. Invest. 36: 237-248, 1977.

47.- DONIACH I.: Pathology of the thyroid. En: Systemic Pathology. Symmers W St C (ed), vol. 4. CHURCHILL LIVINGSTONE. Londres, pp. 1976-2037, 1978.

48.- DYTCH H.E., BIBBO M., PULS J.A., BARTELS P.H., WIED G.L.: Software design for an inexpensive, practical microcomputer-based DNA cytometry system. Analyt. Quant. Cytol. Histol. 8: 8-18, 1986.

49.- EGLOFF B.: The hemangioendothelioma. En: Thyroid Cancer. Hedinger Ch.E. (ed), International Union Against Cancer, vol. XII, Springer-Verlag, Berlin, pp. 52, 1969.

50.- ERHARDT K., AUER G., BJORKHOLM E., FORSSLUND G, MOBERGER B., SILFVERSWARD C.: Prognostic significance of nuclear DNA content in serous ovarian tumors. Cancer Res., 44: 2198-2202, 1984.

51.- FEULGEN R., ROSSENBECK H.: Mikroskopisch-chemischer nachweis einer nukleinsäure von typus der thymonukleinsäure und die darauf beruhende elektive färbung von zellkernen in mikroskopischen präparaten. Z. Physiol. Chem. 125: 203, 1924.

52.- FOSS S.D.: Nuclear Feulgen DNA content and nuclear size in human breast carcinoma. Human Pathol. 13: 626-630, 1982.

53.- FRANSSILA K.O.: Value of histologic classification of thyroid cancer. Acta Pathol. Microbiol. Scand (suppl.), 225: 1-5, 1971.

54.- FRANSSILA K.O.: Is the differentiation between papillary and follicular thyroid carcinoma valid ?. Cancer 32: 853-864, 1973.

55.- FRANSSILA K.O.: Prognosis in thyroid carcinoma. Cancer 36: 1138-1146, 1975.

56.- FRANSSILA K.O.: Natural history of thyroid cancer. En: Radiation-associate thyroid carcinoma. De Groot L.J. (ed), Grune y Stratton. Nueva York, pp. 75, 1977.

57.- FRANSSILA K.O., ACKERMAN L.V., BROWN C.L., HEDINGER C.E.: Follicular carcinoma. Seminars in diagnostic Pathology, 2: 101-122, 1985.



58.- FRANSSILA K.O.: Tiroides. En: Patologia. Kissane J.M., Anderson W.A.D. (ed), 8a. ed, Panamericana S.A. Buenos Aires, pp. 1647-1672, 1986.

59.- FRAUENHOFFER C.M., PATCHEFSKY A.S., COBANOGU A: Thyroid carcinoma: A clinical and pathologic study of 125 cases. Cancer 43: 2414-2421, 1979.

60.- FRAZELL E.L., DUFFY B.J.: Hürthle cell cancer of the thyroid: A review of forty cases. Cancer 4: 952-956, 1951.

61.- FREUDENBERG N.: DNS- zytometrie. Zytopathologie. Ed. by N. Freudenberg. Stuttgart, New York, F.K. Schattner-Verlag, 1980.

62.- FRIEDLANDER M.L., TAYLOR J.W., RUSSELL P., MUGROVE E.A., HEDLEY D.H., TATTER-SALL M.H.N.: Ploidy as a prognostic factor in ovarian carcinoma. Int. J. Gynecol. Pathol., 2: 55-63, 1983.

63.- FRIEDLANDER M.L., HEDLEY D.W., TAYLOR I.W.: Clinical and biological significance of aneuploidy in human tumors. J Clin. Pathol., 37: 961-974, 1984.

64.- FU Y.S., REAGAN J.W., FU A.S., JANIGA: Adenocarcinoma and mixed carcinoma of the uterine cervix. Prognostic value of nuclear DNA analysis. Cancer 49: 2571-2577, 1982.

65.- GALERA H., BIBBO M., BARTELS P.H., DYTCH H.E., PULS J.H., WIED G.L.: Correlation between automated DNA ploidy measurements of Hürthle-cell tumours and their histopathologic and clinical features. *Analyt. Quant. Cytol. Histol.* 8: 157-166, 1986.

66.- GALERA-DAVIDSON H., BIBBO M., BARTELS P, DYTCH H.E, GONZALEZ-CAMPORA R, SANCHEZ F, WIED G. L.: Differential diagnosis between follicular adenoma and follicular carcinoma of the thyroid by marker features. *Analyt. Quant. Cytol. and Histol.* 8: 195-200, 1986.

67.- GALERA H., BIBBO M., DYTCH H.E., GONZALEZ-CAMPORA R., FERNANDEZ A., WIED G.L.: Nuclear DNA in anaplastic thyroid carcinoma with a differentiated component. *Histopathology*, 11: 715-722, 1987.

68.- GALERA-DAVIDSON H., GONZALEZ-CAMPORA R., MORAMARIN J.A., MATILLA-VICENTE A., DYTCH H.E., BARTELS PH, LERMA-PUERTAS E., ANDRADA-BECERRA E., BIBBO M.: Cytophotometric DNA measurements in medullary thyroid carcinoma. *Cancer*, 65: 2255-2259, 1990.

69.- GARNEAU R., BRUNET J.: Etude cytospectrophotométrique de PADN dans les tumeurs thyroïdiennes humaines. *Rev. Canad. Biol.* 24: 123-129, 1965.

70.- GHERARDI G.: Signet ring cell "mucinous" thyroid adenoma a follicle cell tumour with abnormal accumulation of thyroglobulin and a peculiar histochemical profile. *Histopathology*, 11: 317-326, 1987.

71.- GOLDBERG H.M., HARVEY P.: Squamous cell cysts of the thyroid. *Br. J Surg.* 43: 565, 1956.

72.- GOLDENBERG I.S.: Hürthle cell carcinoma. *Arch. Surg.* 67: 495-501, 1953.

73.- GONZALEZ-CAMPORA R., HERRERO- ZAPATERO A., LERMA E., SANCHEZ F., GALERA H.: Hürthle cell and mitochondrion-rich cell tumors. *Cancer* 57: 1154-1163, 1986.

74.- GONZALEZ-CAMPORA R., OTAL C., MARTIN-LACAVE I., SANCHEZ F., GALERA H.: Tumores de células pequeñas del tiroides. *Neoplasia: vol. 5, nº 3*: 97-103, 1988.

75.- GORDON P.R., HUVOS A.G., STRONG E.W.: Medullary carcinoma of the thyroid gland. *Cancer* 31: 915-924, 1973.

76.- GOWING N.F.C.: The pathology and natural history of thyroid tumors. En: *Tumors of the thyroid gland*. Smithers D. (ed), E. y S., Livingstone. Edinburgo, pp. 103, 1970.

77.- GREENEBAUM E., KOSS L.G., ELEQUIN F., SILVER C. E.: The diagnostic value of flow cytometric DNA measurements in follicular tumors of the thyroid gland. Cancer 56: 2011-1018. 1985.

78.- GUNGRY S.R., BURNEY R.E., THOMPSON N.W., LLOYD R.: Total thyroidectomy for Hürthle cell neoplasm of the thyroid. Arch. Surg. 118: 529-532, 1983.

79.- HAEMMERLI G., STRÄULI P., SCHLÜTER G.: Deoxyribonucleic acid measurements on nodular lesions of human thyroid. Lab. Invest. 18: 675-680, 1968.

80.- HALES M., ROSENAU W., OKERLUND M.D., GALANTE.: Carcinoma of the thyroid with a mixed medullary and follicular pattern. Morphologic, immunohistochemical, and clinical laboratory studies. Cancer 50: 1352-1359, 1982.

81.- HAMBURGER J.I., MILLER J.M., KINI S.R.: Clinical-pathological evaluation of thyroid nodules. In: Handbook and Atlas, 1979. Limited edition private publication: 30-33.

82.- HAPKE M.R., DENNER L.P.: The optically clear nucleus. A reliable sign of papillary carcinoma of the thyroid ?. Am J Surg. Pathol. 3: 31-38, 1979.

83.- HARACH H., FRANSSILA K.O.: Occult papillary carcinoma of the thyroid appearing as lung metastasis. Arch. Pathol. Lab. Med. 108: 529-530, 1984.

84.- HAZARD J.B., KENYON R.: Atypical adenoma of the thyroid. Arch. Pathol. 58: 554-563, 1954.

85.- HAZARD J.B., HAWK W.A., CRILE G.J.: Medullary (solid) carcinoma of the thyroid - A clinicopathological entity -. J Clin. Endocr. Metab. 19: 152-161, 1959.

86.- HAZARD J.B.: Neoplasia. En: The Thyroid. Hazard J.B, Smith D.E. (eds.), Williams y Wilkins. Baltimore, pp. 139, 1964.

87.- HAZARD J.B.: Nomenclature of thyroid tumors. En: Thyroid Neoplasia. Young S, Inman D.R. (eds.), Academic Press. London, pp. 3, 1968.

88.- HEDINGER Ch.E.: Sarcomas of the thyroid gland. En: Thyroid Cancer. Hedinger Ch.E. (ed), International Union Against Cancer, vol. XII, Springer-verlag. Heidelberg, pp. 47, 1969.

89.- HEDINGER Ch.E., SOBIN L.H.: Tipos histológicos de tumores tiroideos. Clasificación Histológica Internacional de Tumores, nº 11. O.M.S. Ginebra, p. 20-27, 1974.

90.- HOLM L.E., LÖWHAGEN T., SILFVERSWARD C.: The reliability of malignant thyroid tumor diagnosis in the swedish cancer registry. Review of 200 cases. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand (A), 88: 251-254, 1980.

91.- HORN R.C.: Hürthle-cell tumors of the thyroid. Cancer 7: 234-244, 1954.

92.- HUANG T., ASSOR D.: Primary squamous cells carcinoma of the thyroid gland. Am J Clin. Pathol. 55: 93-98, 1971.

93.- HUANG S-N., GOLTZMAN D.: Electron and immunoelectron microscopic study of thyroidal medullary carcinoma. Cancer 41: 2226-2235, 1978.

94.- HUTTER R.V., TOLLEFSEN H.R., DE COSSE J.J., FOOTE F.W., FRAZEL E.L.: Spindle and giant cell metaplasia in papillary carcinoma of the thyroid. Am J Surg. 110: 660-668, 1965.

95.- IBAÑEZ M.L., RUSSELL W.O., ALBORES-SAAVEDRA J., LAPERTICO R., WHITE E.C., CLARK R.L.: Thyroid carcinoma biologic behavior and mortality. Cancer 19: 1039-1052, 1966.

96.- ITO J., NOGUCHI S., MURAKAMI N., NOGUCHI A.: Factors affecting the prognosis of patients with carcinoma of the thyroid. Surg. Gynecol. Obstet. 150: 539-544, 1980.

97.- IZUO M., OKAGAKI T., RICHART R.M., LATTES R.: Nuclear DNA content of occult sclerosing and frank papillary carcinoma of the thyroid. Cancer 27: 902-909, 1971.

98.- JOHANNESSEN J.V., GOULD V.E., JAO W.: The fine structure of human thyroid cancer. Hum. Pathol. 9: 385-400, 1978.

99.- JOHANNESSEN J.V., SOBRINHO-SIMÕES M., TANGEN K.O., LINAMO T.: A flow cytometric deoxyribonucleic acid analysis of papillary thyroid carcinoma. Lab. Invest. 45: 336-341, 1981.

100.- JOHANNESSEN J.V., SOBRINHO-SIMÕES M., LINDMO T., TANGEN K.O.: The diagnostic value of flow cytometric DNA measurements in selected disorders of the human thyroid. Am J Clin. Pathol. 77: 20-25, 1982.

101.- JOHANNESSEN J.V., SOBRINHO-SIMÕES M.: The fine structure of follicular thyroid adenomas. Am J Clin. Pathol. 78: 299-310, 1982.

102.- JOHANNESSEN J.V., SOBRINHO-SIMoes M., LINDMOT T, TANGEN K.O., KAALHUS O., BRENNHORD I.O.: Anomalous papillary carcinoma of the thyroid. Cancer, 51: 1462-1467, 1983.

103.- JOHANNESSEN J.V. y cols.: Well differentiated thyroid tumors. Problems in diagnosis and understanding. Sommer S.C, y Rosen P.O, (eds.). Pathology Annual, vol. 18, part. A, Nueva York, Appleton-Century-Crofts, pp. 255-285, 1983.

104.- JOHANNESSEN J.V., SOBRINHO-SIMoes M., FINSETH J, PILSTROM L.: Ultrastructural morphometry of thyroid neoplasm. Am. J. Clin. Pathol., 79: 166-171, 1983.

105.- JOHNSON R.L., HARTMANN W.H.: Thyroid Neoplasms. Principles and Practice of Surgical Pathology, vol. II. Silverberg S.G, (ed.), John Wiley y Sons Co. Nueva York pp. 1415-1441, 1983.

106.- KAHN N.F., PERZIN K.H.: Follicular carcinoma of thyroid: An evaluation of the histologic criteria used for diagnosis. En: Pathology Annual, part. I, vol. 13. Sommers S.L, Rosen P.P, (eds.), Appleton-Century-Croft Nueva York, pp. 221-253, 1983.

107.- KAKUDO K., MIYAUCHI A., TAKAI S., KATAYAMA S., KUMA K., KITAMURA H.: C-cell carcinoma of the thyroid: Papillary type. Acta Pathol. Jpn 29: 653-659, 1979.

108.- KEMPERS R.D., DOCKERTY M.B., HOFFMAN D.L., BARTHOLEMEW L.G.: Struma ovarii-ascitic, hyperthyroid and asymptomatic syndromes. Ann Intern. Med. 72: 883-890, 1970.

109.- KING E., CHU K.L., MAYALL B., PETRAKIS L.: Foam cell measurements may be useful in diagnosis of breast cancer. International Conference on Analytical Cytology and Cytometry. Fifth International Symposium of Flow-Cytometry-Society for Analytical Cytology Schloss Elmau. Bavaria. Octubre, 1982.

110.- KLAWE H., ROWINSKI J.: Malignancy associated changes (mac) in cells of buccal smears detected by means of objective image analysis. Acta Cytol. 18: 30-33, 1974.

111.- KLINCK G.H., MENK K.F.: Squamous cells in the human thyroid. Mil. Surg., 109: 406, 1951.

112.- KUNCK G.M.: Hemangioendothelioma and sarcoma of the thyroid. En: Thyroid Cancer. Hedinger Ch.E, (ed), Internat. Union Against. Cancer, vol. XII, Springer-Verlag Berlin, pp. 60, 1969.

113.- KODOMA T., FUJIMO M., ENDO Y.: Identification of carcinoembryonic antigen in the C-cell of the normal thyroid. *Cancer*, 45: 98-101, 1980.

114.- KRAEMER B., SPRIGLEY J.R., BATSAKIS J.G., SILVA E.G., GOEPPERT H.: DNA flow cytometry of thyroid neoplasma. *Arch. Otolaryngol.* III: 34-38, 1985.

115.- KREICEBERGS A., SODERBERG G., ZETTERBERG A.: The prognostic significance of nuclear DNA content in chondrosarcoma. *Analyt. Quant. Cytol.* 2: 271-279, 1980.

116.- KWIKKEL H-J., BOON E.M., MARTIN M.M., VAN RIJSWIJK, RIETVELD W.J., STOLK J.G.: Masking effect of hormonal contraceptives on discriminating quantitative features of visually normal intermediate cells in positive and negative cervical smears. *Analyt. and Quant. Cytol. and Histol.*, vol. 8, nº 3, pp. 227-232, 1986.

117.- LANG W., GEORGII A., STAUTCH G., KIENZLE E.: The differentiation of atypical adenomas and encapsulated follicular carcinomas in the thyroid gland. *Virchows Arch. (Pathol. Anat.)*, 385: 125-141, 1980.

118.- LEAL BERMUDEZ J.: Citometria de alta resolución en tumores tiroideos. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla, 1986.

119.- LINDSAY S., DAILEY M.E.: Malignant lymphoma of the thyroid gland and its relation to Hashimoto disease: A clinical and pathology study of 8 patients. J. Clin. Endocrinol. Metab., 15: 1332, 1955.

120.- LINDSAY S.: Carcinoma of the thyroid gland. A clinical and pathology study of 293 patients at the University of California Hospital. Charles C. Thomas. Springfield, 1960.

121.- LINDSAY S.: Microspectrophotometric measurements of deoxyribonucleic acid in human thyroid carcinomas. Surg. Gynecol. Obstet., 131: 905-913, 1970.

122.- LIVOLSI V.A.: Pathology of thyroid cancer. In: Thyroid Cancer. Greenfield L.P, (ed), CRC Press. Florida, pp. 85-141, 1978.

123.- LIVOLSI V.A., MERINO M.J.: Hystopathology differential diagnosis of the thyroid. Pathol. Ann. 16 (2): 357-406, 1981.

124.- LJUNGBERG O.: On medullary carcinoma of the thyroid. Acta Pathol. Microbiol. Scand (A), 231 (suppl.): 1, 1972.

125.- LJUNGBERG O., BONDENSON L., BONDENSON A.G.: Differentiated thyroid carcinoma, intermediate type: A new tumor entity with features of follicular and parafollicular cell carcinoma. *Hum Pathol.* 15: 218-228, 1984.

126.- LÖWHAGEN T., SPRENGER E.: Cytologic presentation of thyroid tumors in aspiration biopsy smears. *Acta Cytol.* 18: 528-530, 1974.

127.- LUCK J.B., MUMAW V.R., FRABLE W.J.: Fine needle aspiration biopsy of the thyroid: Differential diagnosis by videoplan image analysis. *Acta Cytol.*, 26: 793-796, 1982.

128.- LUDWIG A.S., AKAGAGI T., RICHART R.M., LATTES R.: Nuclear DNA contents of lobular carcinoma in situ of the breast. *Cancer*, 31: 1553-1560, 1973.

129.- LUKACS G.L., BALAZS G.Y., Zs-NAGY I.: Cytofluorimetric measurements on the DNA contents of tumor cells in human thyroid gland. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 95: 265-271, 1979.

130.- LUPULESCU A., ANDREANI D., MONACO F., ANDREOLI M.: Ultrastructure and soluble iodoproteins in human thyroid cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 28: 1257-1268, 1968.

131.- MAMBO N.C., IRWIN S.M.: Anaplastic small cell neoplasms of the thyroid. An immunoperoxidase study. Hum. Pathol., 15: 55-60, 1984.

132.- MARTIN-LACAVE I., GONZALEZ-CAMPORA R., MORENO-FERNANDEZ A., SANCHEZ-GALLEGO F., MONTERO-LINARES C., GALERA H.: Mucosubstances in medullary carcinoma of the thyroid. Histopathology, 13: 55-66, 1988.

133.- MAURER R., TAYLOR C., TERRY R., LUKES R.J.: Non-Hodgkin lymphomas of the thyroid: A clinico-pathological review of 29 cases applying the lukes-collins classification and immunoperoxidase method. Virchows Arch. (Pathol. Anat.), 383: 293-317, 1979.

134.- MEISSNER W.A., LAHEY F.H.: Cancer of the thyroid in a thyroid clinic. J. Clin. Endocrinol. Metab., 8:749-761, 1948.

135.- MEISSNER W.A., WARREN S.: Tumors of the thyroid gland. Atlas of Tumor Pathology, (2<sup>a</sup> series), fasc. 4. Armed Forces Institute of Pathology. Washington D.C., 1969.

136.- MEISSNER W.A.: Surgical Pathology. En: Surgery of the thyroid gland. Sedgwick C.E, (ed.), W.B. Saunders Philadelphia, pp. 24, 1974.

137.- MEISSNER W.A.: Patología del Tiroides. En: El Tiroides. Meissner W.A, (ed.), Salvat Editores. Barcelona. pp. 258, 1977.

138.- MENDELSON G., EGGLESTON J.C., WEISBURGER W.R., GANN D.S., BAYLIN S.B.: Calcitonin and histaminase in C-cell hiperplasia and medullary thyroid carcinoma: A light microscopic and inmunohistochemical study. Am J Pathol. 92: 35-52, 1978.

139.- MENDELSON G., BIGNER S.H., EGGLESTON J.C., BAYLIN S.B., WEEL S.A.: Anaplastic variants of medullary thyroid carcinoma. A light-microscopy and inmunohistochemical study. Am J Surg Pathol., 4: 333-341, 1980.

140.- MENDELSON G.: Signet-cell-simulating microfollicular adenoma of the thyroid. Am J Surg. Pathol., 8: 705-708, 1984.

141.- MILLER R.H., ESTRADA R., SNEED W.F., MACE M.L.: Hürthle cell tumors of the thyroid gland. Laryngoscope, 93: 884-888, 1983.

142.- MIKAL S.: Primary lymphoma of the thyroid gland. Surgery, 55: 233-239, 1964.

143.- MIKE U.V., FISHBEIN W.N., BAHR G.F.: Some practical considerations in quantitative absorbance microspectrophotometry: Preparation techniques in DNA cytophotometry. *Analyt. Quant. Cytol. Histol.*, 7: 107-118, 1985.

144.- NIEUWENHUITZEN A.C., BOSMAS F.T., VAN BERGEN J. C., CRAMER-KNIJNENBURG G., BRUTEL DE LA RIVIERE G.: Medullary differentiation of anaplastic thyroid carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.*, 77: 541-547, 1982.

145.- NISHIYAMA R.H., DUNN E.L., THOMPSON N.W.: Anaplastic spindle-cell and giant cell tumour of the thyroid gland. *Cancer*, 30: 113-127, 1972.

146.- NORMAN T., JOHANNESSEN J.V., GAUTVIK K.M., OLSEN B.R., BRENNHOVD J.O.: Medullary carcinoma of the thyroid. *Cancer*, 38: 366-377, 1976.

147.- ORII T.: Microspectrophotometric studies on deoxyribonucleic acid (DNA) content in nuclei of various thyroid diseases. *Shiushu Med. J.* 16: 427-440, 1967.

148.- OTAL C, GALERA H, GONZALEZ-CAMPORA R, MATILLA A, SANCHEZ J, AMERIGO J: Carcinoma anaplasico del tiroides. *Patologia*, 14: 59-65, 1981.

149.- OTAL C., GONZALEZ-CAMPORA R., FERNANDEZ A., MARTIN-LACAVE I., GALERA H.: Tumores anaplásicos de células gigantes y fusiformes del tiroides. Neoplasia, 4: 260-267, 1987.

150.- PANKE T.W., CROXSON M.S., PARKER J.W., CARRIERE D.P., ROSOFF L., WARNER N.: Triiodothyronine-secreting (toxic) adenoma of the thyroid gland. Cancer, 41: 528-537, 1978.

151.- PFALTZ M., HEDINGER C.E., MUHLETHALER J.P.: Mixed medullary and follicular carcinoma of the thyroid. Virchows Arch. (Pathol. Anat.), 400: 53-59, 1983.

152.- PIOVELLA F., NALLI G., MALAMONI G.D., MAJOLINO I., FRASSONI F., SITAR G.M.: The ultrastructural localization of factor VIII antigen in human platelets. Megakaryocytes and endothelial cells utilising a ferritin labeled antibody. Br. J. Haematol. 39: 209-213, 1978.

153.- POTDAR G.G., DESAI P.B.: Carcinoma of the lingual thyroid. Laryngoscope, 81: 427, 1971.

154.- PRAKASH A., KUKRETI S.C., SHARMA M.P.: Primary squamous cell carcinoma of the thyroid gland. Int. Surg 50: 538, 1968.

155.- PULS J.H., BIBBO M., DYTCH H.E., BARTELS P.H., WIED G.L.: Microticas: The design of an inexpensive video-based microphotometer computer system for DNA ploidy studies. *Analyt. Quant. Cytol. Histol.*, 8: 1-7, 1986.

156.- RABENHORST G.: The diagnostic value of the DNA content of fine needle biopsies of the thyroid gland. *Virchows Arch. B cell Pathol.*, 16: 379-383, 1974.

157.- REINHARDT E.R., LENZ R., GREINER W., SCHENK U.: Diagnostic relevance of visually non-suspect cells for cancer diagnosis: Part. I: Results of feature evaluation and their consequences for automated specimen analysis. *Analyt. Quant. Cytol. Histol.*, 4: 157, 1982.

158.- RIGAUD C., PELTIER F., BUGOMOLETZ W.V.: Mucin producing microfollicular adenoma of the thyroid. *J Clin Pathol.*, 38: 277-280, 1985.

159.- ROSAI J., ZAMPI G., CARCANGIU M.L.: Papillary carcinoma of the thyroid. A discussion of its several morphologic expressions, with particular emphasis on the follicular variant. *Am J Surg Pathol.*, 7: 809-817, 1983

160.- ROSAI J., CARCANGIU M.L.: Pathology of thyroid tumors: Some recent and old questions. *Hum. Pathol.* 15: 1008-1012, 1984.

161.- ROSENTHAL D.L., SUFFIN S.: Predictive value of digitized cell images for the prognosis of cervical neoplasia. Computer-assisted Image Analysis Cytology Ed. S. D. Greenberg. Monographs in Clinical Cytology, Ed. G.L. Wied, vol. 9, Basel S. Karger, 163-180, 1984.

162.- ROTH L.M.: Inclusions of nonneoplastic thyroid tissue within cervical lymph nodes. Cancer, 18: 105, 1965.

163.- RUPPMANN E., GEORGSSON G.: Squamous carcinoma of the thyroglossal duct. Ger. Med., 11: 442, 1966.

164.- RUSSELL W.O., IBÁÑEZ M.L., CLARCK R.L., HILL C. S., WHITE E.C.: Follicular (organoid) carcinoma of the thyroid gland. Thyroid Cancer. Hedinger Ch.E, (ed), International Union Against Cancer, vol. XII, Springer-Verlag. Berlin, pp. 14, 1969.

165.- RUSSELL M.A., GILBERT E.F., JAESCHKE W.F.: Prognostic features of thyroid cancer. A long-term followup of 68 cases. Cancer, 36: 553-559, 1975.

166.- SAFFOS R.O., MAHONEY J.P., RHATIGAN R.M.: Optically clear nuclei in a follicular carcinoma of the thyroid. Arch. Pathol. Lab. Med., 104: 164-165, 1980.

167.- SAMPSON R.J., OKA H., KEY C.R., BUNCHE C.R., II-  
JIMA S.: Metastases from occult thyroid carcinoma. An  
autopsy study from Hiroshima and Nagashaki - Japan -.  
Cancer, 25: 803-813, 1970.

168.- SANDRITTER W.: Über den Nucleinsäurebehalt in  
verschiedenen tumoren. Frankfurter, 2 Pathol., 63: 423-  
446, 1952.

169.- SANDRITTER W., CARL M., RITTER W.: Cytophotome-  
tric measurements of the DNA contents of human malignant  
tumors by means of the Feulgen-reaction. Acta Cytol.,  
10: 26-30, 1966.

170.- SAN MARTIN DIEZ M.V.: Contribución al estudio  
de la variabilidad cromosomica en neoplasias. Tesis Doc-  
toral. Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla  
1984.

171.- SAXEN E., FRANSSILA K., BJARNASON O.: Observer  
variation in histologic classification of thyroid can-  
cer. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand (A), 86:483  
-486, 1978.

172.- SCHRÖDER S., BUCKER W., HUSSELMANN H., DRALLE H:  
Adenolipoma (thyrolipoma) of the thyroid gland. Report  
two cases and review of literature. Virchows Arch. (Pa-  
thol. Anat.), 404: 99-103, 1984.

173.- SCHRÖDER S., HUSSELMANN H., BUCKER W.: Lipidrich cell adenoma of the thyroid gland. Report of a peculiar thyroid tumour. Virchows Arch. (Pathol. Anat.), 404: 105-108, 1984.

174.- SCHRÖDER S., BOCKER W., BAISH H., BURK C., ARPS H., MEINERS I., KASTENDIECK H., HEITZ P.V., KLOPPEL G.: Prognostic factors in medullary thyroid carcinomas. Survival in relation to age, sex, stage, histology, immunocytochemistry and DNA content. Cancer, 61: 806-816, 1988.

175.- SHERMAN A.B., KOSS L.G.: Morphometry of benign urothelial cells in the presence of cancer. Analyt. Quant. Cytol. Histol., 5: 221, 1983.

176.- SHEPHERD G.H., ROSENFELD L.: Carcinoma of thyroglossal duct remnants. Am J Surg., 116: 125, 1968.

177.- SILVERBERG S., De GIORGI L.S.: Osteoclastoma-like giant cell tumor of the thyroid. Cancer, 31: 621-625 1973.

178.- SIMPSON W.M.: Three cases of thyroid metastasis to bones, with a discussion as to the existence of the so-called "benign metastasizing goiter". Surg. Gynecol. Obstet., 42: 489-507, 1976.

179.- SIZEMORE G.W., HEATH H., CARNEY J.A.: Multiple endocrine neoplasia type 2. Clin. Endocrinol. Metab., 9: 299, 1980.

180.- SMEDAL H.I., SALZMAN F.A., MEISSNER W.A.: The value of 3 mV. Roentgen-ray therapy in differentiated thyroid carcinoma. Am. J. Roetgen, 99: 352-364, 1967.

181.- SMITHERS D.W.: Carcinoma associated with tyroglossal duct anomalies. En: tumours of the thyroid gland Smithers D.W, (ed), E y S. Livingstone. Edimburgo, pp. 155, 1970.

182.- SOBRINHO-SIMÕES M.A., GONCALVES V., SOUSE-LE F. CARDOSO V.: A morphometric study of nuclei, nucleoli and nuclear bodies in goitres and papillary thyroid carcinomas. Experientia, 33: 1642-1643, 1977.

183.- SODERSTROM N., BIORKLUND A.: Intranuclear cytoplasmic inclusions in some types of thyroid cancer. Act. Cytol., 17: 191-197, 1973.

184.- SPIESSL B., SCHEIBE O., WAGNER G.: TNM-Atlas. Illustrated guide to the classification of malignant tumours. G. Appl. Wemding. Berlin, pp. 37-41, 1982.

185.- SPRENGER E., LÖWHAGEN T., VOGT-SCHADEM M.: Differential diagnosis between follicular adenoma and follicular carcinoma of the thyroid by nuclear DNA determination. *Acta Cytol.*, 21: 528-530, 1977.

186.- SPRENGER E., ULRICH H., SCHONDORF H.: The diagnostic value of cell-nuclear DNA determination in aspiration cytology of benign and malignant lesions of the breast. *Analyt. Quant. Cytol.*, 1: 29-36, 1979.

187.- SUNDLER F.: Somatostatin-immunoreactive cells in medullary carcinoma of the thyroid. *Am. J Pathol.*, 88: 381, 1977.

188.- TANGEN K.O., LINDMO T., SOBRINHO-SIMÕES M., JOHANNESSEN J.V.: A flow cytometric DNA analysis of medullary thyroid carcinoma. *Am. J Clin. Pathol.*, 79: 172-177, 1983.

189.- TASCA C., STEFNEANU L.: Cytology and cytophotometry in thyroid diseases. *Acta Histochem. (JENA)*, 60: 261-272, 1977.

190.- TASHJIAN A.H., WOLFE H.J., VOELKEL E.F.: Human calcitonin: Immunologic assay, cytologic localization and studies on medullary thyroid carcinoma. *Am. J Med.*, 56: 840-849, 1974.

191.- TAVERES A.S., COSTA J., De CARVALHO A., REIS M:  
Tumor ploidy and prognosis in carcinomas of the bladder  
and prostate. Br. J Cancer, 20: 438-441, 1966.

192.- THOMPSON N.W., DUNN E.L., BATSAKIS J.G., NISHI-  
YAMA R.H.: Hürthle cell lesions of the thyroid gland.  
Surg. Gynecol. Obstet., 139: 555-560, 1974.

193.- TOLLEFSEN H.R., SHAP J.P., HUVOS A.G.: Hürthle  
cell carcinoma of the thyroid. Am. J Surg., 130: 390-  
394, 1975.

194.- TRIBUKAIT B.: Flow cytometry in surgical patho-  
logy and cytology of tumors of the genito-urinary tract.  
En: Koss L.G, Colemann D.V, (eds.): Advances in clini-  
cal cytology, vol. 2, pp. 163-189. Masson, New York,  
1984.

195.- TSCHAHARGANE C., GOERTTLER K., EHEMANN V.:Appli-  
cation of flow-through DNA measurements in thyroid di-  
seases. Pulse-Cytophotometry, 111: 527-532, 1978.

196.- VALENTA L.J., MICHEL-BECHET M., MATTSON J.C.,  
SINGER F.R.: Microfollicular thyroid carcinoma with amy-  
loid rich stroma, resembling the medullary carcinoma of  
the thyroid (MCT). Cancer, 39: 1573-1586, 1977.

197.- VALENTA L.J., MICHEL-BECHET M.: Ultrastructure and biochemistry of thyroid carcinoma. *Cancer*, 40: 284-300, 1977.

198.- VOOIJS P.G., OUD P.S., ZALMISER D.J., PAHLPLATZ M.M., HERMKENS H.G., PLAS-CATS M. VAN DER, HERMAN C.J.: Chromatin measurements in Feulgen-stained intermediate cells from normal and abnormal cervical smears. *Analyt. Quant. Cytol.*, 4: 154, 1982.

199.- WALT A.J., WOOLNER L.B., BLACK B.M.: Small-cell malignant lesions of the thyroid gland. *J Clin. Endocrinol. Metab.*, 17: 45-60, 1957.

200.- WARREN S.: Invasion of blood vessels in thyroid cancer. *Am. J Clin. Pathol.*, 26: 64-65, 1956.

201.- WIED L.G., BARTELS H.P., BIBBO M., SYCHRA J.J.: Cytomorphometric markers for uterine cancer in intermediate cells. *Analyt. Quant. Cytol.*, vol. 2, n<sup>o</sup> 4, pp. 257-263, 1980.

202.- WIED G.L., BARTELS P.H., DYTCH H.E., PISHOTTA F.T., BIBBO M.: Rapid high-resolution cytometry. *Analyt. Quant. Cytol.*, 4: 257-262, 1982.

203.- WILLIAMS E.D.: The origin and associations of medullary carcinoma of the thyroid. En: Tumours of the thyroid gland. Smithers D. (ed), E. y S. Livingstone, London, pp. 130, 1970.

204.- WILLIAMS E.D., DONIACH I., BJARNASON O., MICHIE W.: Thyroid cancer in an iodide rich area. A histopathology study. Cancer, 39: 215-222, 1977.

205.- WILLIS R.A.: Secondary tumours of the thyroid. En: The spread of tumours in the human body. Willis R.A. (ed), 3<sup>a</sup> ed., Butterworths and Co., pp. 269-272, 1973.

206.- WOLLEY R.C., SCHREIBER K., KOSS L.G., KARRAS M. SHERMAN A.: DNA distribution in human colon carcinomas and its relationship to clinical behavior. J Natl. Cancer Inst., 69: 15-22, 1982.

207.- WOOLNER L.B., BEAHRS O.H., BLACK B.M., McCONAHEY W.M., KEATING R.: Classification and prognosis of thyroid carcinoma. A study of 885 cases observed in a thirty year period. Am. J Surg., 102: 354-387, 1961.

208.- WOOLNER L.B., McCONAHEY W.M., BEAHR O.H., BLACK B.M.: Primary malignant lymphoma of the thyroid: Review of 46 cases. Am. J Surg., 111: 502-523, 1966.

209.- WOOLNER L.B.: Thyroid carcinoma: Pathologic classification with data on prognosis. Semin. Nucl. Med., 1: 481-502, 1971.

210.- ZAJICEK J.: The aspiration biopsy of the thyroid Compendium on diagnostic cytology. 4<sup>a</sup> edition. Ed. G.L. Wied L.G. Koss and S.W. Reagan. Chicago, Illinois, Tutorials of Cytology, 1976.

211.- ZETTERBERG A., ESPOSTI P.L.: Prognostic significance of nuclear DNA levels in prostatic carcinoma. Scand. J Urol. Nephrol., 55 (suppl.): 53-58, 1980.

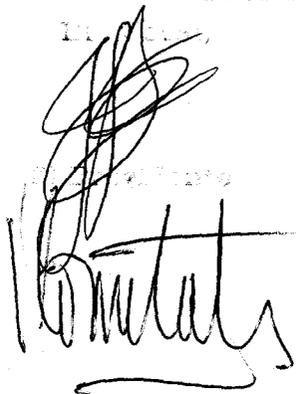
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

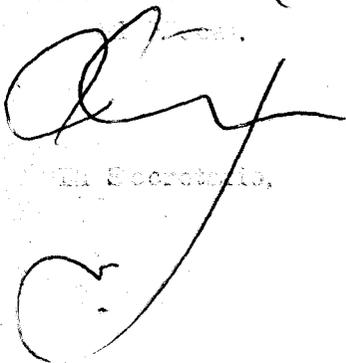
Reunido el Tribunal compuesto por los señores doctores antes  
en el día de la fecha, para examinar el Tesis doctoral de

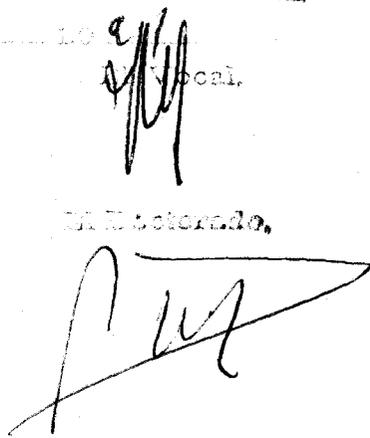
D. Balbuza Valverde Villarejo  
sobre Alteraciones submucosales en el diagnóstico  
tico del tumor folicular de tiroides

con el siguiente resultado: apto cum laude

Sevilla, 4 de Octubre

  
El Presidente

  
El Secretario,

  
El Secretario,