

DOTTORATO DI RICERCA
IN PSICOLOGIA E NEUROSCIENZE
XXVII CICLO

COORDINATORE Prof. Renato Corradetti

***Ruolo dell'ecografia
endoscopica nella
diagnostica dei tumori
della laringe***

Settore Scientifico Disciplinare SSD MED/30

Dottorando

Dott. Giampiero Parrinello

(firma)

Tutore

Prof. Oreste Gallo

(firma)

Coordinatore

Prof. Renato Corradetti

(firma)

Anni 2012/2015

INDICE

1-INTRODUZIONE

2-LA REGIONE GLOTTICA

2.1-La commissura anteriore

2.2-La corda vocale

2.3-L'articolazione cricoaritenoidea

2.4-Lo spazio paraglottico

2.5-Anatomia microscopica della glottide fonatoria

2.6-Anatomia microscopica della glottide respiratoria

3-LA FISIOLOGIA DELLA LARINGE

3.1-La funzione sfinterico/protettiva

3.2-La funzione respiratoria

3.3-La funzione fonatoria

3.3.1-Le caratteristiche della voce

4-LE LESIONI DELLE CORDE VOCALI

4.1-Le lesioni benigne

4.1.1-Prevalenza

4.1.2-Eziopatogenesi

4.2-Possibili riscontri istopatologici a seguito di biopsia

4.3-Le lesioni maligne

4.3.1-Epidemiologia

4.3.2-Eziopatogenesi

4.3.3-Istotipi

4.3.4-La clinica

4.3.5-Prognosi e fattori predittivi

5-LO STATO DEL'ARTE DELLA DIAGNOSI PER IMMAGINI

5.1-L'endoscopia

5.1.1-La stroboscopia

5.1.2-Tecniche con fluorescenza

5.1.3-Narrow Band Imaging

5.1.4-Endoscopia a Contatto

5.2-La Tomografia Assiale Computerizzata

5.3-La Risonanza Magnetica

5.4-La Tomografia a Emissione di Positroni

5.5-L'Ecografia

6-LA TERAPIA

6.1-*Le cordectomie laser*

6.2-*Le laringectomie parziali orizzontali*

6.3-*Emillaringectomia verticale*

6.4-*La laringectomia totale*

6.5-*La radioterapia*

6.6-*La chemioterapia*

7-FASE SPERIMENTALE

7.1-*Introduzione*

7.2-*Materiali e Metodi*

7.3-*Risultati*

7.4-*Discussione*

8-BIBLIOGRAFIA

1 INTRODUZIONE

La medicina moderna si avvale della sensibilità e della specificità di esami clinici utilizzati per diagnosticare la patologia legata ad un determinato sintomo. Questo principio si basa sulla nozione che non tutti i test raggiungono la stessa precisione diagnostica e che tutti i test devono essere considerati in relazione ad uno standard di riferimento. Con questi dati, i medici possono stratificare i pazienti a rischio e selezionare le modalità di esame appropriate al fine di fornire cure adeguate.

In otorinolaringoiatria, la raucedine è il sintomo più comune in corso di patologia laringea e può essere causata da una varietà di potenziali cause. In questo contesto, la visualizzazione della struttura e la funzione delle corde vocali sono diventate una componente essenziale nel protocollo di valutazione clinica della voce [1, 2].

I tentativi di esaminare la laringe umana risalgono a più di 150 anni, quando, nel 1854 Manuel Garcia, un insegnante di canto, esaminando la sua laringe utilizzando uno specchio da dentista e uno specchio a mano, pubblicando le sue osservazioni nel 1855 [3]. Da allora le tecnologie di imaging applicabili alla laringologia si sono sviluppate enormemente.

Oggi, il processo diagnostico delle patologie laringee nella pratica clinica è piuttosto complesso e si basa sulla valutazione dei disturbi del paziente, la storia, i dati strumentali e l'esame istologico. Durante gli ultimi due decenni sono state sviluppate diverse tecniche di imaging per lo studio della laringe e ottenere misurazioni oggettive della qualità della voce [4, 5]. Il termine "imaging laringeo" si riferisce in genere all'esame endoscopico delle corde vocali e tramite la videoendoscopia e la videostroboscopia è possibile ottenere informazioni sull'aspetto clinico e funzionale; inoltre, la valutazione della laringe è notevolmente migliorata con l'introduzione della tomografia computerizzata assiale (TC) e della risonanza magnetica (RM). Queste tecnologie, infatti, forniscono informazioni sulle aree endoscopicamente cieche rilevando possibili infiltrazioni profonde del tumore [6], rendendole così di primaria importanza nella stadiazione e pianificazione della procedura chirurgica più appropriata dei tumori localmente avanzati della laringe [7, 8]. Recentemente, l'ecografia è diventata utile anche in casi di lesioni laringee di grandi dimensioni e potrebbe giocare anche un ruolo importante nello screening delle affezioni unilaterali delle corde vocali. Allo stesso tempo, risulta indispensabile un'ulteriore messa a punto di tale tecnica [9, 10] che permetta una via di approccio 'alternativa' all'attuale canonica transutanea.

Nonostante tutti gli sforzi per la messa a punto di uno strumento diagnostico perfetto, al giorno d'oggi i chirurghi non possono affidarsi ad una sola tecnica di imaging per la gestione e il trattamento dei pazienti con patologia laringea. In questo contesto, le pubblicazioni più recenti hanno sottolineato la necessità di ulteriori sviluppi della tecnologia, della metodologia e della ricerca clinica sull'imaging della laringe [11-13]

Questo lavoro ha l'obiettivo di ampliare il ruolo di uno strumento di diagnosi largamente utilizzata in medicina, quale l'ecografia, fino ad oggi praticamente esclusa dalla patologia laringea del piano glottico.

2 LA REGIONE GLOTTICA

Dal punto di vista clinico risulta necessario conoscere le strutture che costituiscono il piano glottico in modo da consentire una pianificazione terapeutica che possa garantire il migliore risultato possibile dal punto di vista della sicurezza oncologica e della preservazione funzionale dell'organo. Saranno pertanto descritte in questo paragrafo le seguenti strutture: la commissura anteriore, la corda vocale, l'articolazione cricoaritenoidica e lo spazio paraglottico. Difatti il coinvolgimento di ciascuna di queste impone un approccio terapeutico dedicato.

2.1 La commissura anteriore

Rappresenta il punto di connessione delle due corde vocali con la faccia posteriore della cartilagine tiroidea. In questa zona le due sotto sedi sopraglottica e sottoglottica sono separate solamente da circa 2-4 mm, per cui una neoplasia, anche se di piccole dimensioni, che si sviluppa in questa area, può avere accesso ad una ampissima rete vascolare linfatica determinando un'invasione precoce dei linfonodi cervicali [14].

A differenza del resto della corda vocale in questa porzione non riconosciamo i classici cinque strati, ma si assiste ad un inspessimento dello strato medio della lamina propria il quale assume un aspetto ovoidale andando a costituire la macula flava anteriore, la quale a sua volta va a connettersi con il tendine di Broyles (determinando quindi il punto di unione tra legamento e tendine), il maggiore costituente della commissura anteriore. È un tendine compatto senza vasi e ghiandole lungo circa 1 cm, a direzione cranio caudale, inserito ventralmente nella lamina intermedia della cartilagine tiroidea; la sua presenza rappresenta un fondamentale ostacolo alla progressione orizzontale dei carcinomi commissurali, anche in considerazione del fatto che in questa area la cartilagine tiroidea non presenta il pericondrio interno ed è quindi più vulnerabile ad un'invasione

per via diretta [15].

Il particolare comportamento dei tumori di questa sotto sede, che tendono ad avere un accrescimento in direzione cranio-caudale invece che orizzontale come nelle restanti parti della regione glottica è da imputarsi alla vascolarizzazione esclusiva da parte dell'arteria laringea media, che dona a questa sotto sede un'autonomia anatomico funzionale, arteria che presenta un calibro progressivamente crescente in direzione caudale ;in questa area inoltre non esiste una netta distinzione tra vascolarizzazione della sede glottica e sotto glottica [16].

2.2 La corda vocale

Poiché per parlare della particolare struttura della corda vocale è necessario rivolgersi ad un'analisi di tipo microscopico e biomeccanico si rimanda la trattazione più approfondita all'anatomia microscopica affrontata più avanti in questo capitolo. Ci concentreremo invece nella descrizione del muscolo tiroaritenoidico (TA).

Il muscolo TA consta di diverse componenti funzionali e possiede, forse per tale ragione, la più fitta rete anastomotica di tutta la muscolatura intrinseca laringea. Il TA ha origine a livello della superficie interna della cartilagine tiroide, quasi sulla linea mediana e si dirige posteriormente per inserirsi sull'aritenoidico. Una prima componente è il muscolo TA superiore che dalla parte superiore dell'angolo diedro si dirige in basso ed indietro per prendere inserzione sulla faccia anteriore dell'apofisi muscolare dell'aritenoidico. Le sue fibre superiori possono estendersi fino alla plica ariepiglottica a formare il muscolo tiroepiglottico ed una variabile contingente di fibre può essere rinvenuto a livello della compagine della corda vocale falsa (muscolo ventricolare). Una seconda componente è il muscolo TA inferiore, che dalla sua inserzione anteriore si dirige posteriormente per dividersi in due strati; le fibre dello strato esterno divergono a ventaglio per terminare dal basso verso l'alto su bordo esterno dell'aritenoidico, nella plica ari-epiglottica, sul bordo laterale dell'epiglottide ed hanno una funzione sfinterica; lo strato interno costituisce il muscolo vocale e le sue fibre, decorrendo parallelamente e lateralmente al legamento vocale, si inseriscono posteriormente sul versante esterno dell'apofisi vocale e sulla fossetta emisferica della faccia anteroesterna dell'aritenoidico. La trazione esercitata dal muscolo assieme al legamento vocale in direzione posteriore, determina sulla superficie anteriore della cartilagine tiroide, nel corso del suo accrescimento, una piccola depressione, importante repere anatomico chirurgico.

Esiste una piccola separazione tra TA esterno ed Interno definita “spazio paraglottico inferiore”, il quale comunica con lo spazio paraglottico, composto da tessuto cellulare lasso e grasso ;una neoplasia che raggiunga questa regione interromperà la sua crescita a decorso orizzontale acquisendo una direzione o anteriore, verso la commissura o caudale, verso lo spazio sottoglottico, grazie alla via preferenziale fornita dal tessuto lasso e dalla presenza al suo interno di vasi a decorso cranio-caudale.

Un' interessamento di questo muscolo da parte di processi neoplastici determina gravi alterazioni della voce e la fissità della corda interessata. Un suo coinvolgimento nella chirurgia conservativa laser determinerà importanti sequele fonatorie [17].

2.3 L'articolazione cricoaritenoidica

Rappresenta la struttura più importante della glottide posteriore, l'interessamento di questa articolazione da parte di un processo neoplastico causa gravi alterazioni della motilità laringea, ed è determinante nella scelta del tipo di intervento chirurgico, in particolare per opzioni conservative ricostruttive quali la cricoioido-pesti e la crico-ioido-epiglottopessi.

La superficie articolare aritenoidica della cartilagine cricoide è ovale, convessa, ricoperta di cartilagine ialina, collocata sulla faccia supero laterale della lamina cricoide, leggermente sporgente sulla sua faccia dorsale. Presenta un'angolazione media di 20-30 ° rispetto ad un piano sagittale e di 30-60° rispetto ad un piano orizzontale. Le sue dimensioni medie vanno dai 5 ai 7 mm. Esiste una possibile variabilità nelle dimensioni rispetto alla contro laterale e comunque tra individuo ed individuo.

La faccia articolare cricoide della cartilagine aritenoidica è ovale o rettangolare, concava, ricoperta di cartilagine ialina e situata sulla faccia inferiore del corpo dell'aritenoidica, più vicina al processo muscolare che al processo vocale. Le dimensioni medie sono tra i 4 e i 6.5 mm. Il suo asse corto è parallelo all'asse lungo della faccia aritenoidica della cricoide e il suo asse lungo è perpendicolare all'asse lungo della faccetta articolare aritenoidica della cricoide.

Una capsula fibroelastica connette le superfici articolari, questa non si attacca direttamente al margine cartilagineo ma a distanza, delimitando una cavità con i recessi articolari. Questi consentono una grande motilità. La cavità è rivestita con un epitelio sinoviale pseudo stratificato, contiene tessuto connettivo endoluminale pseudo meniscale a forma di mezza luna che la riempie in maniera incompleta (fig. 1). La capsula è rinforzata dal legamento cricoaritenoidico che si sviluppa dietro l'articolazione e soprattutto

medialmente. Formato da diversi strati di fibre collagene parallele tra di loro e separate da tessuto adiposo; continua sopra il piano articolare sulla faccia posteromediale dell'aritenoidoide e del processo vocale.

Il muscolo cricoaritenoidoide posteriore è l'abducente del processo vocale. Durante una semplice trazione, la superficie articolare dell'aritenoidoide è lateralizzata e inclinata sulla parte postero inferiore della superficie aritenoidoide della cricoide, la porzione mediale del legamento agisce in maniera antagonista. Il muscolo cricoaritenoidoide laterale è invece adduttore e quando si contrae la superficie cricoide dell'aritenoidoide è medializzata ed inclinata sulla parte anterosuperiore della superficie aritenoidoide della cricoide, il legamento in questo caso svolge un compito sinergico [18].

La terminazione della porzione endolaringea del nervo ricorrente avviene in contatto con il recesso articolare laterale dopo la sua distribuzione al muscolo cricoaritenoidoide posteriore. La vicinanza di questa terminazione giustifica il potenziale coinvolgimento nervoso in caso di infiltrazione tumorale juxta capsulare (fig. 2).

Il coinvolgimento da parte di un processo infiltrativo tumorale di una, o più tra: strutture capsulari, muscoli o nervo ricorrente, determinerà una alterazione del movimento di questa articolazione comportando problemi sia dal punto di vista fonatorio, ma soprattutto sfinterico.

Il coinvolgimento della porzione endolaringea del nervo, a seguito di un'invasione dalla porzione posteroinferiore dello spazio paraglottico verso l'articolazione compromette definitivamente la motilità di quest'ultima e della glottide in generale.

È proprio l'insieme di queste strutture che si deve preservare nella chirurgia subtotale laringea permettendo al paziente di mantenere una funzionalità soprattutto sfinterica [19].

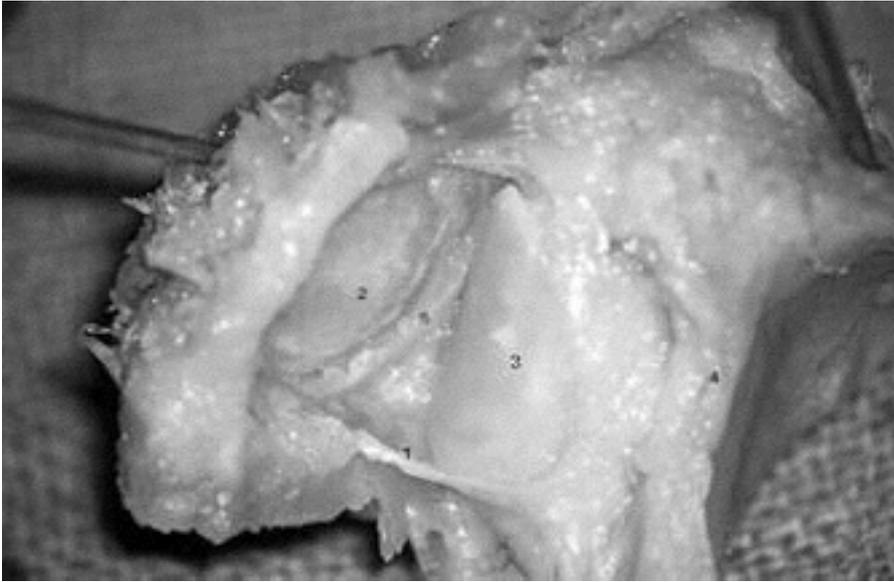


Fig. 1) ARTICOLAZIONE CRICOARITENOIDEA DESTRA: 1) capsula 2) superficie articolare aritenoidea 3) superficie articolare cricoidea 4) lamina cricoidea 5) cresta sinoviale pseudo meniscale

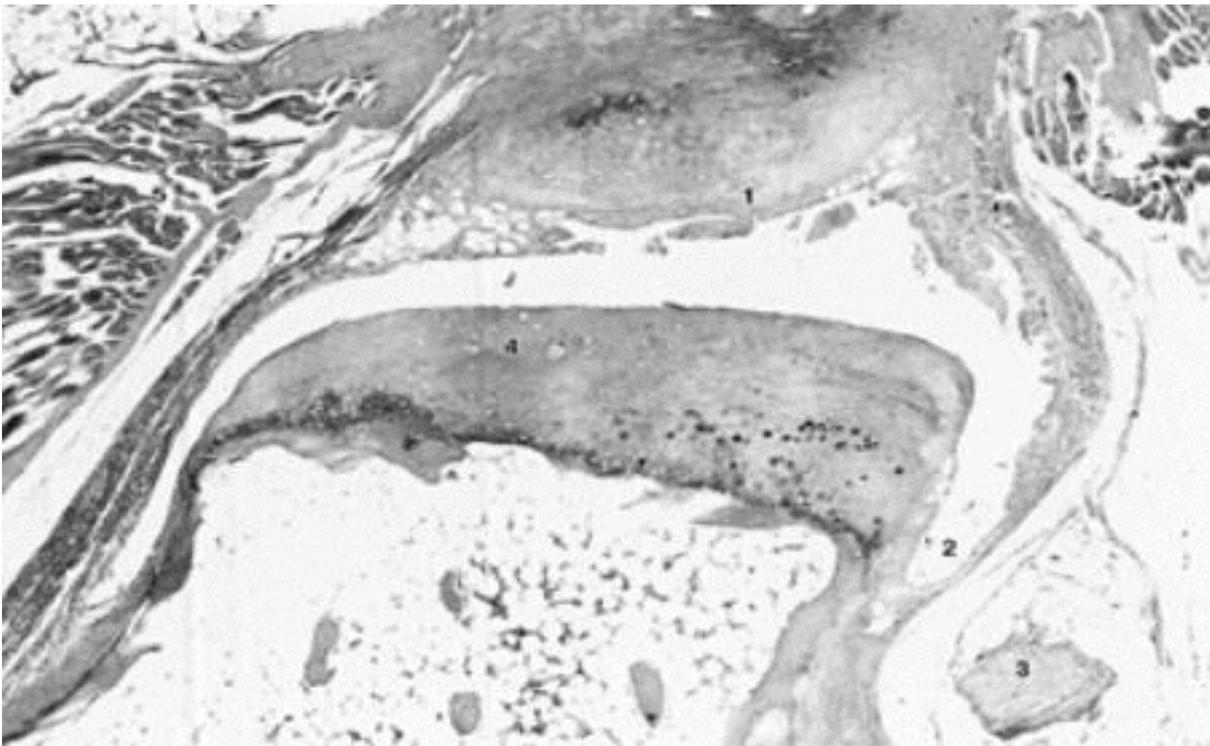


Fig. 2) SEZIONE FRONTALE DI ARTICOLAZIONE CRICOARITENOIDEA (MICROSCOPIO OTTICO): 1) superficie articolare della aritenoide 2) recesso articolare laterale 3) nervo laringeo inferiore 4) superficie articolare cartilagine cricoide 5) muscolo aritenoideo

2.4 Lo spazio paraglottico (SPG)

È uno spazio costituito da tessuto adiposo e connettivo lasso, contenente strutture vascolari a decorso cranio caudale con calibro via via crescente.

In sezione frontale: lateralmente, è delimitato dalla cartilagine tiroidea,

supero medialmente, può o meno essere collegato con lo spazio preepiglottico, esistono infatti dei setti fibrosi che impediscono la comunicazione, ma non sono presenti in tutta la popolazione. Medialmente a livello sopraglottico è delimitato dalla lamina quadrangolare che emette tralci fibrosi che si irradiano sul muscolo tiroaritenoidico superiore, ma non è presente nessun setto distinto che separa lo SPG e il muscolo; a livello glottico emette delle piccole proiezioni che si estendono tra le fibre caudali dei muscoli tiroaritenoidici interno ed esterno, continuando poi sulla faccia inferiore degli stessi, questa rappresenta una delle porzioni più strette dello spazio; infero medialmente, è delimitato dal cono elastico [20];

in sezione sagittale: antero inferiormente si trova un'area di debolezza che prolunga lo SPG oltre la laringe, questa zona è situata lateralmente al legamento cricotiroideo mediano attraverso il gap tra cricoide e tiroide, dove la membrana cricotiroidea è deficitaria, l'ulteriore sviluppo laterale viene poi contrastato dalla presenza delle fibre dei muscoli cricotiroidei i quali non permettono una comunicazione con i tessuti extra laringei ventro laterali.

In sezione orizzontale: a livello del ventricolo il PGS è uno spazio triangolare tra muscolo tiroaritenoidico medialmente, cartilagine tiroidea lateralmente e mucosa del seno piriforme dorsalmente, ventralmente questo spazio termina nel punto dove i delicati tralci fibrosi laterali del muscolo tiroaritenoidico si uniscono al pericondrio tiroideo. Appena sotto l'articolazione cricoaritenoidica lo SPG si accosta ad una raccolta adiposa appena sotto il margine inferiore dell'aritenoidice queste due aree sono separate esclusivamente da deboli setti dei muscoli cricoaritenoidici laterali e posteriori. A livello subglottico l'estensione postero inferiore è localizzata tra: anterolateralmente le fibre dorsali del muscolo cricotiroideo, anteromedialmente il muscolo cricoaritenoidico laterale, postero medialmente il muscolo cricoaritenoidico posteriore, postero inferiormente il tessuto paraglottico è adiacente alla mucosa dell'ipofaringe, caudalmente si estende dorsalmente all'articolazione cricotiroidea e continua con il sotto mucoso esofageo [21].(fig.3-4-5)

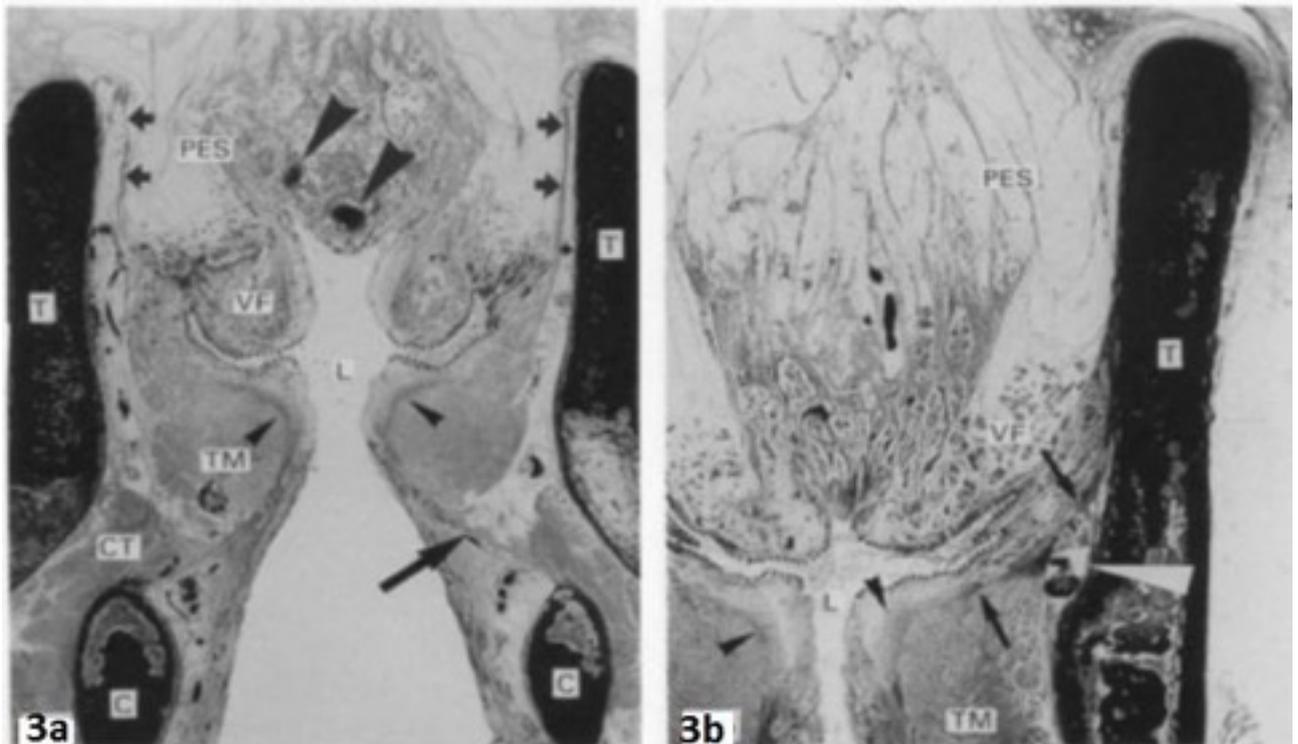


Fig. 3) sezione frontale di laringe: T-cartilagine tiroide, C- cartilagine cricoide, TM-muscolo tiroaritenoido, VF-falsa corda, L-lume, PES- spazio preepiglottico, Punta di freccia piccole-corde vocali, Linea tratteggiata- ventricolo. **3a-** lo spazio paraglottico può essere riconosciuto come uno strato di tessuto adiposo contenente vasi (zone scure), immediatamente adiacente all c.tiroide; è separato dal PES tramite sottili setti fibrosi (freccie piccole), connesse al pericondrio della rima superiore della c.tiroide. Inferomedialmente tra muscolo tiroaritenoido e cricoaritenoido ed è delimitato dal cono elastico (freccia grande); Punta di Freccia grandi-proiezioni dell'estremità anteriore dell'epiglottide. **3b-**nella parte anteriore della laringe, lo SPG (punta di freccia bianca), appare come una piccola regione di tessuto adiposo con cospicui vasi sanguigni (aree scure), tra il muscolo TA e la cartilagine tiroide. Superiormente viene delimitato da una setto di collagene (freccie) a ventaglio tra la superficie superiore del muscolo TA e la cartilagine tiroide.

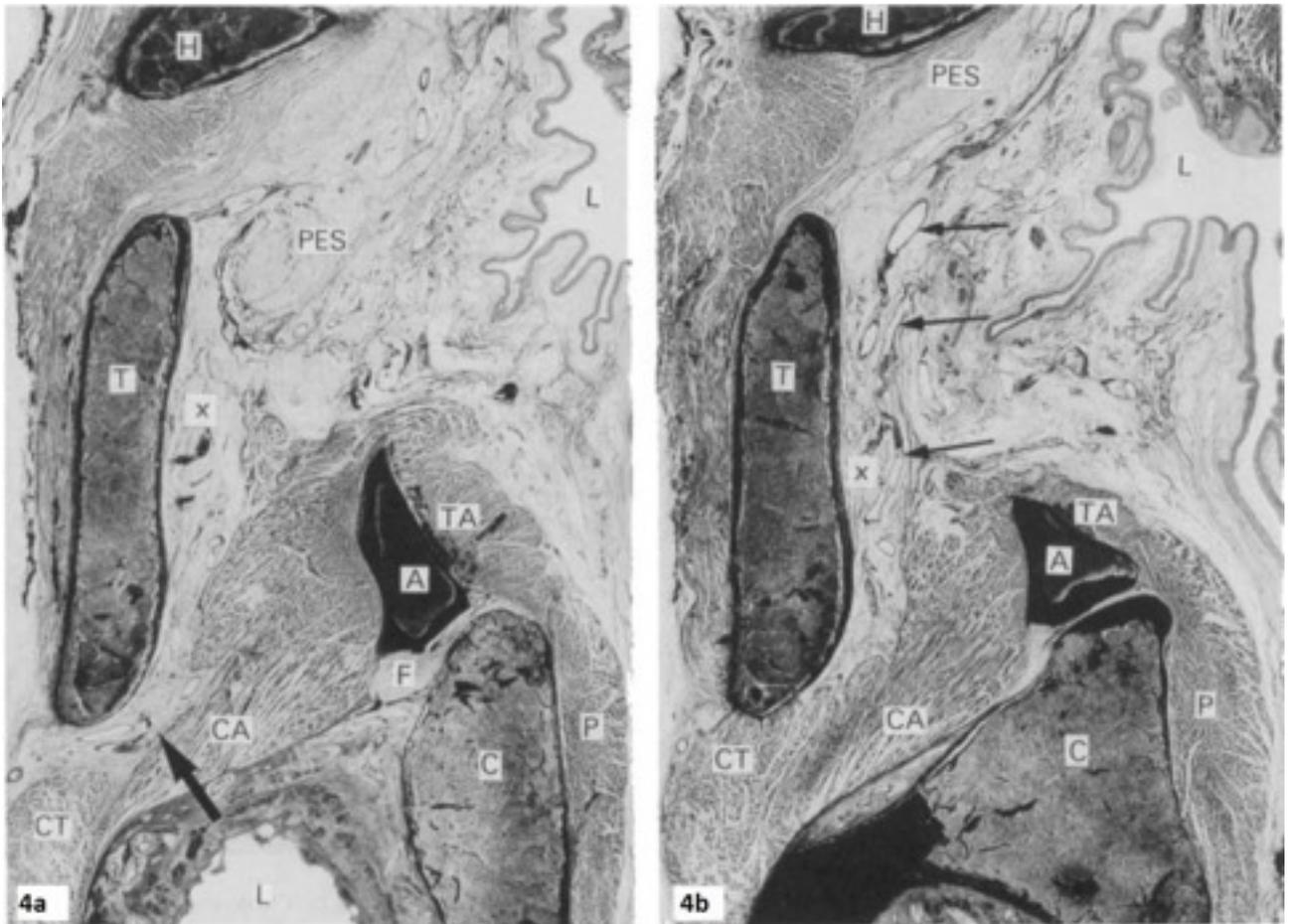


Fig. 4) Sezione sagittale. T-cartilagine tiroide, A-aritenoide, C-cricoide, H-osso ioide, CT-muscolo cricotiroideo CA-muscolo cricoaritenoido laterale TA-muscolo tiroaritenoido trasverso, P-muscolo cricoaritenoido posteriore, PES- spazio preepiglottico, X-spazio paraglottico F- raccolta adiposa alla base della aritenoide, L-lume. **3a)** lo SPG continua nella regione extralaringea anteriore (freccia) a livello della rima inferiore della cartilagine tiroidea. **3b)** Lo SPG contiene numerosi vasi sanguigni (freccie) con decorso principalmente cranio-caudale. In questa sezione, più laterale rispetto ad **a** la comunicazione anteriore è chiusa.

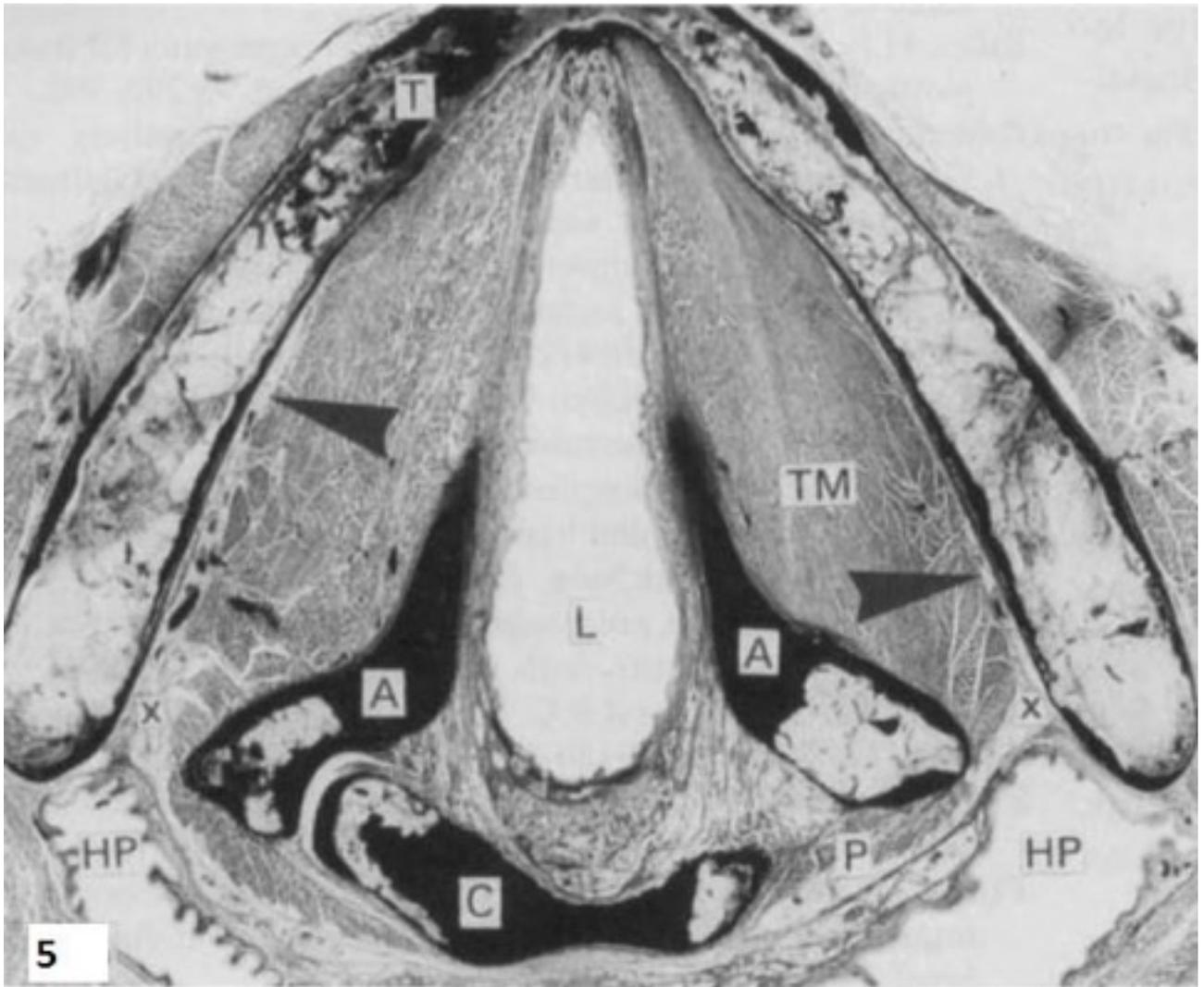


Fig. 5) sezione orizzontale a livello della glottide. T-c.tiroide, A-aritenoidi, C- C.cricoide, TM- muscolo tiroaritenoidio HP-lume ipofaringeo, X- Spazio paraglottico. A questo livello, lateralmente, lo SPG appare come una sottile lamina di tessuto (testa di freccia) immediatamente adiacente alla faccia interna della cartilagine tiroidea, posteriormente, comunica con la mucosa dell'ipofaringe

2.5 Anatomia microscopica della glottide fonatoria

Il margine vibratorio delle corde vocali è di gran lunga più complicato di un semplice epitelio che riveste un muscolo o un legamento.

Esso è costituito da cinque strati (fig. 6):

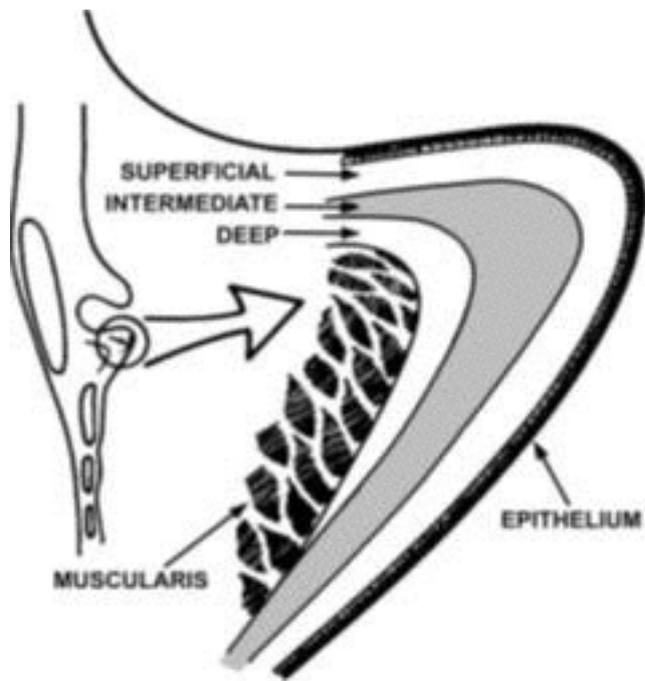


Fig. 6

1) *epitelio di rivestimento di tipo squamoso non corneificato*, nel contesto della laringe è presente solo a questo livello, poiché le cellule dell'epitelio cordale devono resistere alle intense sollecitazioni vibratorie e devono essere ottimizzate per un ambiente mucoso. Per rispondere a tali esigenze sono prive di uno strato corneo superficiale e si mantengono metabolicamente attive anche nei piani più superficiali fino alla loro desquamazione nel lume aereo. Dato che a questo livello non sono presenti ghiandole, il film mucoso che le riveste proviene da un meccanismo di trasporto vicariato dalle circostanti cellule cilindriche ciliate; per favorire la permanenza del film mucoso e di conseguenza mantenere sempre idrata e lubrificata la corda sono state evidenziate a livello della superficie delle microcreste, presenti già nelle cellule di ricambio immediatamente sottostanti a quelle in via di desquamazione, che conferiscono un aspetto a "battistrada"(fig. 7), tale conformazione facilita la deposizione e la permanenza del muco [22].

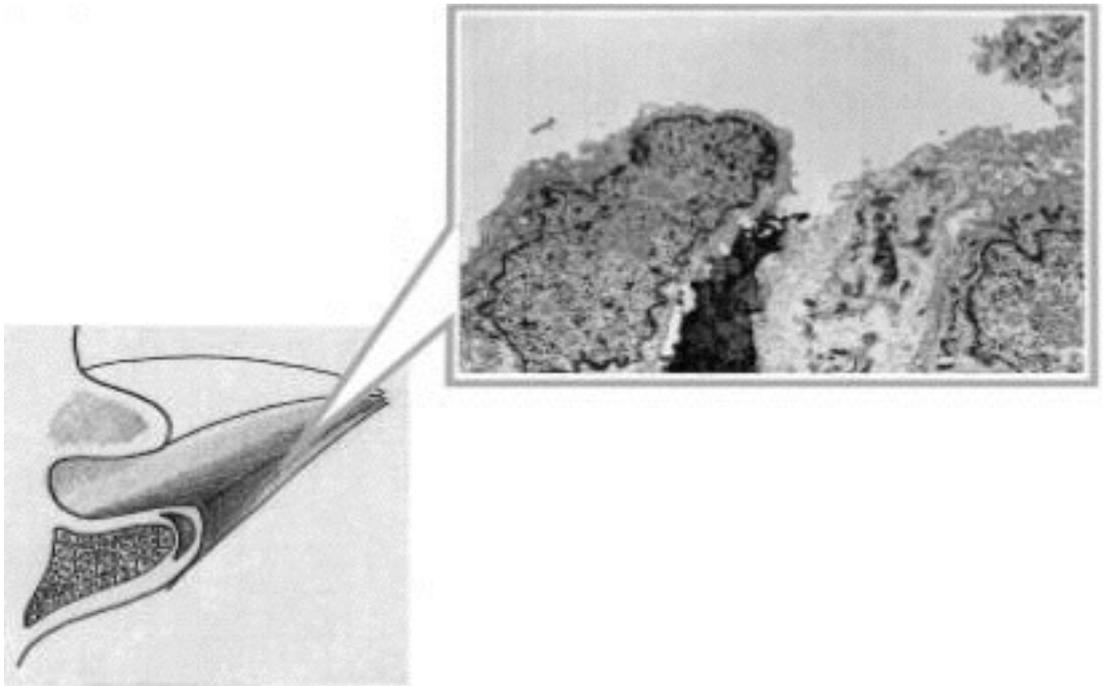


Fig. 7

Altra funzione fondamentale dell'epitelio di rivestimento è di conferire forma e consistenza alla sottostante lamina propria(LP), tessuto essenzialmente non cellulare ed amorfo, la giunzione di questi due strati, resa assai complessa dalle vibrazioni a cui è sottoposta, è demandata ad una struttura altamente specializzata: la membrana basale (MB).

La membrana basale deve fundamentalmente assolvere a due compiti: mantenere la coesione tra le cellule dello strato basale dell'epidermide e assicurare quest'ultime alla sottostanti masse proteiche extracellulari. Dal punto di vista ultrastrutturale la MB può essere distinta in tre zone: lamina lucida, lamina densa e area sotto-basale, alle quali corrispondono biochimica e ruoli funzionali diversi [23]. La vera struttura portante della MB è la lamina densa, costituita da proteine laminari, dalla quale si dipartono fibre di collagene di tipo VII che ancorano questa alla LP con veri e propri loops .L'ultrastruttura ad essa sovrapposta (lamina lucida) è specializzata nell'assicurare la coerenza dell'epitelio vibrante ed è attraversata da fibre di collagene di tipo IV che la connettono con la lamina densa; l'area sotto-basale posta inferiormente rispetto alla lamina densa deve assolvere alla necessità di garantire l'ancoraggio alla LP [22].

Qualsiasi danno a queste strutture di ancoraggio può avere serie conseguenze nella produzione della voce [24], è stato inoltre provato che la concentrazione delle fibre di ancoraggio è geneticamente determinato identificando soggetti nella popolazione con una più alta predisposizione a

sviluppare polipi [25].

2) *La lamina propria e la sua matrice extracellulare*, con le sue caratteristiche viscoelastiche, è la struttura che maggiormente influenza la capacità vibratoria della corda vocale.

Essa contiene diverse varietà di cellule quali macrofagi, fibroblasti e mio-fibroblasti localizzati in aree strategiche della LP a seconda delle necessità funzionali.

I macrofagi sono maggiormente concentrati appena sotto la MB e nella prima porzione della LP suggerendo che il loro ruolo sia quello di barriera difensiva per agenti infiammatori che oltrepassano l'epitelio.

I fibroblasti, deputati alla produzione della matrice extracellulare, sono presenti in maniera ubiquitaria in tutta la LP.

I mio-fibroblasti, che rappresentano una differenziazione dei fibroblasti con funzione riparativa [26], vengono chiamati in causa a seguito di una lesione, la loro presenza è prevalente a livello della porzione superiore, suggerendo che quest'ultima sia quella più soggetta a sollecitazioni lesive; essi conferiscono alla corda vocale una buona capacità rigenerativa, penalizzata dal fatto che la loro attivazione non è immediata e richiede del tempo (2-3 giorni), per cui se un paziente sviluppa danni minori a seguito di un eccessivo o errato utilizzo della voce, sarà necessario un periodo di riposo per consentire a queste cellule di rimediare al danno [24]. Tornando all'architettura della LP, essa si può suddividere a livello ultrastrutturale in tre strati, i quali sono in continuità l'uno con l'altro, senza nessuna struttura interposta, ma si differenziano tra di loro per il tipo e la prevalenza degli elementi della matrice extracellulare che li compone, ovvero, proteine fibrose (fibre collagene e fibre elastiche) e proteine interstiziali (glicoproteine e proteoglicani [27] (fig. 8):

Strato superficiale della LP (SPLP), viene clinicamente indicato come "*spazio di Reinke*", offre la minore resistenza alla vibrazione e dei tre, è quello che presenta la minore concentrazione di proteine fibrose, essendo costituito per la sua maggior parte da proteine interstiziali, che gli donano una consistenza gelatinosa ed un aspetto amorfo. Il proteoglicano più rappresentato è l'acido ialuronico [28], la molecola più grande, che si organizza in macro-agglomerati in particolare a livello della faccia inferiore ("infracord area"), che corrisponde alla regione dove ha inizio l'onda mucosa.

Strato medio della LP (SMLP), la maggiore componente è data dalle proteine elastiche, in particolare l'elastina, che presenta notevoli capacità di

allungamento, fino a cinque volte la sua lunghezza iniziale, ed è la responsabile del ritorno elastico della corda vocale.

Strato profondo della LP (SPLP), è il più rigido dei tre poiché costituito quasi esclusivamente da fibre collagene di tipo I, II, III [23], e svolge la funzione di stabilizzare ed uniformare su tutta la corda vocale la tensione del sottostante muscolo vocale. Insieme allo SMLP costituisce *il legamento vocale*.

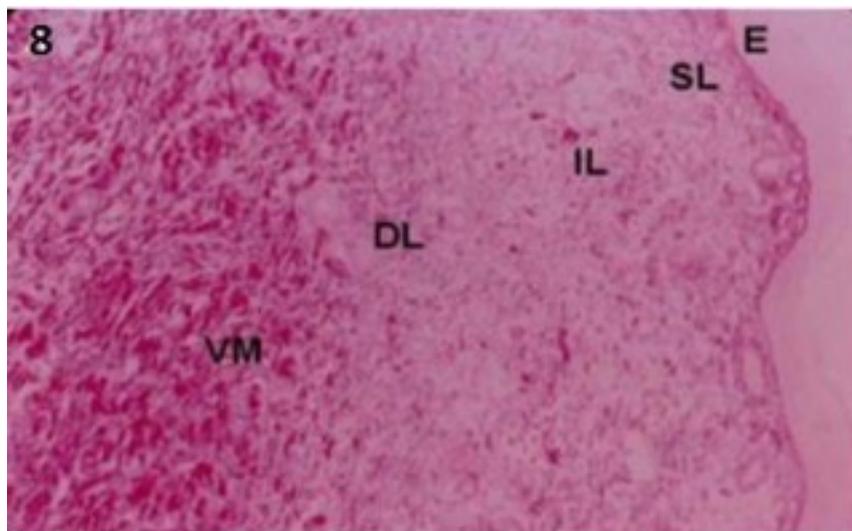


Fig. 8) (A-corda vocale dopo colorazione con sirius red: VM vocal muscle DL dee player IL intermediate layer SL superficial layer E epithelium)

Esiste un gran sinergismo tra le proteine fibrose ed elastiche che intervengono con modalità bifasica (fig.9) nello stiramento della corda, inizialmente è influenzato dalle proprietà elastiche dell'elastina e, una volta raggiunto un valore di tensione critica, la presenza delle fibre collagene e la loro marcata resistenza si oppone ad un ulteriore allungamento [29].

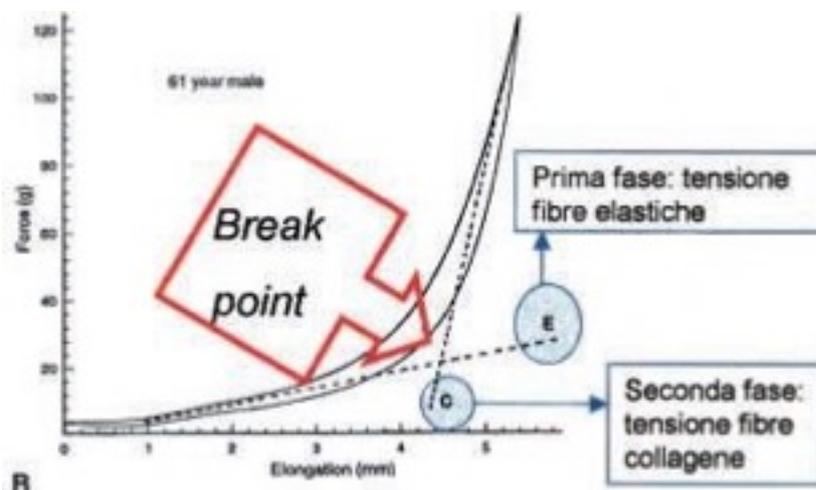


Fig. 9

3) L'ultima porzione della corda vocale è data dal muscolo tiroaritenoidico mediale o muscolo vocale, costituisce la massa maggiore nella corda [30].

2.6 Anatomia microscopica della glottide respiratoria

L'epitelio è costituito da epitelio ciliato vibratile di tipo respiratorio con cellule mucipare caliciformi e continua inferiormente con quello che riveste la trachea; questa differenza istologica rispetto alla glottide fonatoria differenzia anche il tipo di patologie delle due sotto-sedi: pachidermia a carico della sotto sede posteriore, difficilmente cancerizzabile e displasia leucoplasica per la glottide vocale con più facile trasformazione in carcinoma

Sono presenti nel contesto della tonaca mucosa numerose ghiandole sia sierose che mucose.

A questo livello la mucosa è adagiata su un chorion assai lasso che giustifica la tendenza di questa regione ad andare in contro a processi edemigeni in risposta ad insulti infiammatori.

3 LA FISIOLOGIA DELLA LARINGE

La laringe svolge un ruolo cardine su funzioni di importanza vitale e di relazione interpersonale. Considerata nel suo sviluppo filogenetico essa è un organo a primordiale funzione sfinterica con compiti protettivi sulle vie aeree inferiori cui si sono in seguito sovrapposte la funzione respiratoria e fonatoria [31]; a dimostrazione della predominanza di questa funzione, la maturazione e la differenziazione della muscolatura e delle cartilagini dorsali risulta più precoce e rapida rispetto a le strutture ventrali [15].

3.1 La funzione sfinterico-protettiva

Interamente riflessa e involontaria, nell'individuo sano, questa funzione si realizza, a seguito di stimolazione bilaterale dei nervi laringei superiori (può essere provocato anche tramite evocazione di afferenze sensitive condotte da altri tronchi nervosi, come nervi cranici e spinali) [32], a livello sopraglottico, con un movimento di abbattimento e accorciamento dell'epiglottide e delle pliche ariepiglottiche, una elevazione del complesso ioido-laringeo [33], grazie alla muscolatura laringea estrinseca e a livello glottico, con la compartecipazione di della muscolatura intrinseca laringea.

In questa fase è soprattutto il compartimento dorsale che partecipa al meccanismo sfinterico.

Vengono coinvolti i muscoli adduttori, in particolare, i muscoli cricoaritenoidi laterali che portano in avanti e lateralmente i due processi muscolari delle cartilagini aritenoidi determinando la chiusura della porzione legamentosa della glottide e le fibre trasverse dei muscoli interaritenoidi che provvedono a chiudere la porzione posteriore cartilaginea [15].

La stimolazione del nervo laringeo superiore, oltre alle suddette reazioni eccitatorie, esercita un effetto inibitorio sulla componente muscolare ad azione abduzione ed inoltre sul nervo frenico, con conseguente apnea riflessa (con significato protettivo nei confronti delle vie aeree sottostanti a scongiurare inalazioni accidentali) [32].

Qualora, nonostante l'efficiente meccanismo, si avesse il passaggio di sostanze estranee nel vestibolo laringeo, la spiccata sensibilità mucosa provoca una contrazione spastica delle corde vocali e il riflesso della tosse. Questo meccanismo ha una funzione prevalente rispetto a tutte le altre funzioni della laringe e può arrivare ad attuarsi anche con poche unità muscolari residue di una sola aritenoidi, come si osserva nella chirurgia subtotale laringea [15].

3.2 La funzione respiratoria

La corrente aerea passa attraverso la laringe ed in particolare attraverso la cosiddetta glottide respiratoria o cartilaginea, spazio delimitato dalle superfici mediali e dai processi vocali delle cartilagini aritenoidi a livello del piano glottico.

Questa porzione è ricoperta di epitelio cilindrico ciliato, vi viene convogliato il muco dalla clearance tracheale e mediante il movimento delle ciglia, viene infine condotto in ipofaringe per la deglutizione [15].

Durante la respirazione polmonare, qualche frazione di secondo prima che il diaframma si abbassi, la rima glottica si apre grazie all'invio ritmico di treni di impulsi eccitatori ai nervi laringei ricorrenti.

La muscolatura attiva durante la fase inspiratoria è costituita dal muscolo crico-aritenoidi posteriore e dal muscolo cricotiroideo; il primo provoca abduzione inspiratoria fasica delle corde vocali, sincrona con l'inspirazione (studi elettromiografici hanno dimostrato che il grado di attività abduzione è direttamente correlato alla resistenza ventilatoria).

Anche il muscolo crico-tiroideo, noto principalmente come tensore delle corde vocali mostra di contrarsi in modo fasico al momento dell'inspirazione; in tal modo, avvicinando anteriormente l'anello cricoideo alla cartilagine tiroide, fa ruotare posteriormente il castone, e quindi le aritenoidi, aumentando così le dimensioni antero-posteriori della glottide e favorendo l'ingresso d'aria.

In condizioni di eupnea i due muscoli sono sotto il controllo del centro respiratorio bulbare [32].

3.3 La funzione fonatoria

La fonazione è una funzione complessa, che coinvolge numerose strutture ed è la risultante dell'interazione di tre settori dell'apparato respiratorio: 1) il mantice polmonare, costituito dalla muscolatura respiratoria, dalla gabbia toracica e dai polmoni 2) l'organo laringeo 3) l'apparato di risonanza, composto dal vestibolo laringeo, ipofaringe, orofaringe, rinofaringe, cavità orale, cavità nasali e paranasali [32].

Il mantice polmonare agisce come generatore di energia sotto forma di forza aereodinamica; l'organo laringeo, ed in particolare le corde vocali, hanno la funzione di trasduttore di energia e convertono la forza aereodinamica della spinta sottoglottica in energia acustica che darà poi vita alla voce udibile [24]; l'apparato di risonanza modella la qualità del suono prodotto a livello glottico [34], arricchendo e caratterizzando il suono laringeo monotono, poiché costituito esclusivamente dalla frequenza fondamentale, come in una vera e propria cassa armonica, donando alla voce il timbro e caratterizzando le differenze nella voce di ogni individuo [32].

In questo paragrafo sarà approfondito il ruolo delle corde vocali come struttura cardine della produzione della voce.

Per meglio comprendere la nascita del suono laringeo è necessario descrivere il complesso sinergismo tra le macrostrutture, composte da cartilagini, legamenti e muscoli intrinseci ed estrinseci e la microstruttura delle corde vocali.

I muscoli intrinseci che maggiormente partecipano alla fonazione sono: i muscoli tiroaritenoidi, il muscolo cricoaritenoidi laterali e i muscoli cricotiroidei; il tiroaritenoidio adduce, accorcia e inspessisce la corda vocale, arrotondando il margine della piega vocale; il muscolo cricoaritenoidio laterale adduce, abbassa allunga e assottiglia, comporta un irrigidimento di tutti gli strati della corda vocale, la piega vocale acquista un bordo più angolato; il muscolo cricotiroideo (l'unico muscolo ad essere

innervato dal nervo laringeo superiore), è il più grande dei muscoli intrinseci, abbassa, stira, allunga e assottiglia le corde vocali, è quello che maggiormente influenza la tensione longitudinale e che quindi modula l'altezza del timbro vocale aumentandolo durante la sua contrazione [34].

Una volta che le corde vocali sono state addotte e poste nella corretta posizione dai muscoli sopracitati, entrano in gioco le forze aereodinamiche, generate dal mantice polmonare, che mettono in vibrazione le corde vocali andando a creare un alternarsi di apertura e chiusura della glottide legamentosa; i principi che regolano l'apertura sono tre : 1) un flusso aereo che passa da una regione ad alta pressione ad una a bassa pressione 2) la pressione di un flusso incomprimibile che decresce all'aumentare della velocità dello stesso (principio di conservazione dell'energia dei fluidi di Bernoulli) 3) la velocità del flusso di un fluido incomprimibile confinato in un condotto aumenta al ridursi del raggio del condotto stesso; la combinazione di queste leggi genera l'apertura della glottide fonatoria.

La ritmica chiusura che segue immediatamente è a sua volta determinata da: 1) l'effetto Bernoulli del flusso aereo causa una forza negativa che spinge i margini cordali medialmente 2) l'elasticità delle corde vocali provoca un ritorno elastico passivo nella posizione tenuta prima di essere deformate dalla pressione transglottica 3) la caduta della pressione a livello sottoglottico non riesce più a vincere l'opposizione data dalle corde addotte.

Andando poi ad analizzare in maniera più approfondita la microstruttura della corda vocale ci rendiamo conto che la generazione e la variazione del suono fondamentale laringeo, non viene ottenuto mettendo semplicemente in vibrazione le corde vocali come potrebbe fare l'ancia di uno strumento a fiato, ma rappresenta il risultato di complesse interazioni tra l'onda montante sottoglottica, l'epitelio cordale, la lamina propria e la capacità della muscolatura intrinseca di influenzare le proprietà biomeccaniche (massa, rigidità e viscosità) di quest'ultima [35].

Questi concetti ci vengono ben spiegati da Hirano, che accoppiò le osservazioni istologiche sulla Lamina propria (LP) [36] alla "cover-body theory", secondo la quale, nonostante le corde vocali siano istologicamente suddivisibili in cinque strati: epitelio di rivestimento, strato superficiale della LP (SSLP) o spazio di Reinke, strato medio della LP (SMLP), strato profondo della LP (SPLP) e muscolo vocale, si possono in realtà identificare tre strati biomeccanici: uno più superficiale, composto da epitelio, membrana basale e SSLP, quest'ultimo costituito da scarse fibre collagene ed elastiche, presenta

un aspetto amorfo gelatinoso, in cui si osserva un' alta concentrazione di glicosaminooglicani, dei quali il maggiormente rappresentato è l'acido ialuronico [37], in particolare in corrispondenza della faccia inferiore della corda vocale (infrafold area) [38]; questa distribuzione identifica una zona critica per la propagazione dell'onda mucosa, delimitando una via preferenziale di propagazione per le pliche mucose formate dall'onda montante sottoglottica che dalla infrafold area si dirigono verso la faccia superiore della corda, secondo la teoria muco-ondulatoria di Perello [39] sono proprio queste pliche mucose, non la vibrazione del bordo libero della corda, a generare il suono fondamentale; questo primo strato, secondo Hirano [40], rappresenta il "cover", il quale scivola con ampia libertà di movimento (grazie allo spazio di Reinke) in tutte le direzioni rispetto ad un corpo (body) tissutale profondo e rigido ,composto da parte dello SPLP e dal muscolo vocale; interposto tra cover e body troviamo l'unione di SMLP e SPLP che rappresenta il legamento vocale ,costituito da fibre collagene ed elastiche, con disposizione longitudinale, parallela alle fibre del muscolo vocale, il cui ruolo è di distribuire uniformemente, tra tutti i fasci muscolari, la tensione derivante dalla contrazione muscolare e di garantire allo stesso tempo una stabilità geometrica del muscolo vocale durante la vibrazione.

Ritroviamo questa organizzazione per quasi tutta la lunghezza della corda ad eccezione dell'estremità anteriore e posteriore, dove lo SMLP si ispessisce andando a costituire la macula flava anteriore che prende contatto con il tendine di Broyle e quindi con la cartilagine tiroidea, e quella posteriore, che invece si collega al processo vocale della cartilagine aritenoide; queste aree rappresentano quindi strutture a rigidità intermedia tra la corda e la cartilagine agendo come ammortizzatori che proteggono le estremità da danni meccanici [41].

Questa architettura rende le corde vocali uno strumento vibratile estremamente complesso e sofisticato, dove ogni componente è configurata per ottimizzare al massimo questa funzione; perfino i vasi sanguigni decorrono paralleli al margine vibratile con scarsissimi rami che penetrano la mucosa perpendicolarmente o che originano dal muscolo sottostante per evitare di interferire con la propagazione dell'onda mucosa così come, per lo stesso motivo, non troviamo in questo contesto nessuna ghiandola [34].

3.3.1 Le caratteristiche della voce

I diversi aspetti che caratterizzano e qualificano la voce rappresentano il risultato della combinazione dei meccanismi sopracitati. Definire e standardizzare queste caratteristiche ci aiuta nel monitoraggio del decorso e

nella valutazione degli outcomes vocali, a seguito di terapie a carico del piano glottico.

Intensità

La rumorosità relativa della voce prodotta può essere misurata come il livello di pressione sonora del segnale acustico rilevata appena fuori della bocca. Rappresenta un parametro molto importante per la comunicazione parlata [35]. L'intensità viene modulata a tre livelli:

A livello sottoglottico, tramite la pressione subglottica (per le basse frequenze) e il flusso aereo tracheale (per le frequenze più alte) [42].

A livello glottico, tramite la tensione delle corde vocali, che modifica la viscosità della LP aumentando o diminuendo l'energia necessaria per trasmettere l'onda mucosa, e la conformazione dell'apertura glottica il cui diametro è proporzionale alla pressione transglottica, di conseguenza minore è l'apertura glottica minore sarà la pressione transglottica e maggiore sarà invece la pressione differenziale che spinge il flusso aereo attraverso le corde vocali, migliorando l'efficienza di queste ultime come trasduttore di energia [42, 43].

A livello sopraglottico, la conformazione dell'apparato di risonanza ha importanti effetti sulla dissipazione dell'energia acustica [35].

Frequenza fondamentale

Il livello di intonazione del suono vocale in uscita è legato alla frequenza fondamentale di vibrazione delle corde vocali. La frequenza fondamentale correla con i cambiamenti della tensione delle corde e della pressione sotto glottica. La contrazione del muscolo cricotiroideo è il fattore che maggiormente influenza la tensione e, di conseguenza, che aumenta la frequenza fondamentale [44].

Modalità di fonazione

Fa riferimento alle percepibili differenti caratteristiche della fonazione che sembrano essere associate con differenti classi di pattern vibratori, denominati “registri vocali”; i più comuni sono, in ordine crescente di frequenza vibratoria: “vocal fry”, “modal voice” e “falsetto” [45, 46]. Vengono generalmente correlati con il tempo di chiusura della glottide. A questi registri vocali tradizionali se ne possono aggiungere altri quali

l'attacco vocale “soffiato” e l'attacco vocale “duro”, legati alla tensione della corda durante l'inizio della fonazione, piuttosto che alla tempistica della chiusura glottica [47].

Qualità della voce

La qualità della voce può essere anche descritta in base alle sue caratteristiche a lungo termine. Per esempio una fonazione che presenta una particolare modulazione dell'intensità a lungo termine (voce tremula, nervosa) può essere definita come persistente, variabile o controllata.

Una fonazione con involontaria instabilità della frequenza fondamentale si definisce “rauca”.

Infine la voce può essere caratterizzate per la sua efficienza e per la sua esauribilità.

4 LE LESIONI DELLE CORDE VOCALI

WHO histological classification of tumours of the hypopharynx, larynx and trachea

Malignant epithelial tumours		Rhabdomyosarcoma	8900/3
Squamous cell carcinoma	8070/3	Angiosarcoma	9120/3
Verrucous carcinoma	8051/3	Kaposi sarcoma	9140/3
Basaloid squamous cell carcinoma	8083/3	Malignant peripheral nerve sheath tumour	
Papillary squamous cell carcinoma	8052/3	Synovial sarcoma	9040/3
Spindle cell carcinoma	8074/3	Borderline tumours / LMP	
Acantholytic squamous cell carcinoma	8075/3	Inflammatory myofibroblastic tumour	8825/1
Adenosquamous carcinoma	8560/3	Benign tumours	
Lymphoepithelial carcinoma	8082/3	Schwannoma	9560/0
Giant cell carcinoma	8031/3	Neurofibroma	9540/0
Malignant salivary gland-type tumours		Lipoma	8850/0
Mucoepidermoid carcinoma	8430/3	Leiomyoma	8890/0
Adenoid cystic carcinoma	8200/3	Rhabdomyoma	8900/0
Neuroendocrine tumours		Hemangioma	9120/0
Typical carcinoid	8240/3	Lymphangioma	9170/0
Atypical carcinoid	8249/3	Granular cell tumour	9580/0
Small cell carcinoma, neuroendocrine type	8041/3	Haematolymphoid tumours	
Combined small cell carcinoma, neuroendocrine type	8045/3	Tumours of bone and cartilage	
Benign epithelial tumours		Chondrosarcoma	9220/3
Papilloma	8050/0	Osteosarcoma	9180/3
Papillomatosis	8060/0	Chondroma	9220/0
Salivary gland-type adenomas		Giant cell tumour	9250/1
Pleomorphic adenoma	8940/0	Mucosal malignant melanoma	8720/3
Oncocytic papillary cystadenoma	8290/0	Secondary tumours	
Soft tissue tumours			
Malignant tumours			
Fibrosarcoma	8810/3		
Malignant fibrous histiocytoma	8830/3		
Liposarcoma	8850/3		
Leiomyosarcoma	8890/3		

4.1 Le lesioni benigne

Questo tipo di lesione non comportano nessun rischio per la vita del paziente ma determinano uno scadimento della qualità della voce, e se di dimensioni eccessive possono causare disturbi respiratori.

4.1.1 Prevalenza

In un grande studio retrospettivo condotto da Cummings et al. nel 2011 [48], su un pool di pazienti che si era rivolto al medico o all'otorinolaringoiatra per disfonia tra il 2004 e il 2008, in circa l'11% la causa era dovuta ad una lesione benigna delle corde vocali.

4.1.2 Eziopatogenesi

Ciascuna affezione può avere una singola causa differente, ma esistono fattori comuni che contribuiscono al loro sviluppo. Generalmente queste lesioni compaiono come risposta ad un danno, anche se sono riconosciute altre cause. Il danno iniziale può essere:

Utilizzo cronico e surmenage vocale. Tipicamente in insegnanti di scuola o cantanti

Eccessivo sforzo acuto, a seguito di urla prolungate o di tosse intensa per infezione delle vie respiratorie inferiori

Trauma a seguito di infezioni

Trauma legato a reflusso laringofaringeo

Altri fattori che possano influenzare ed aggravare il danno sono:

Scolo nasale posteriore dovuto a riniti allergiche

Sinusite cronica

Esposizione ad irritanti quali il tabacco

Malattie polmonari che comportino uno scarso supporto respiratorio durante la fonazione, asma

Ipotiroidismo, che porta ad una voce a tonalità bassa e che determina uno sforzo per aumentarla

Farmaci quali antidepressivi, decongestionanti antiipertensivi, diuretici ecc. che determinino un'eccessiva secchezza o un ispessimento delle secrezioni mucose riducendo pertanto l'effetto lubrificante idratante [49].

4.2 Possibili riscontri istopatologici

La laringe può essere interessata da diversi fenomeni trasformativi a carico dell'epitelio, questi rappresentano una grande sfida per il clinico che si trova a gestirle, infatti, macroscopicamente, non è possibile distinguerli uno

dall'altro con sicurezza e la diagnosi è di carattere esclusivamente istopatologica

Terminologia cliniche

Questa ha puramente una valenza descrittiva e nessuna implicazione istologica, non sono quindi sinonimi di malignità.

Leucoplachia: lesione di aspetto biancastro sulla superficie epiteliale, di tipo aderente, essa non può essere ascritta a nessuna condizione in particolare e non può essere rimossa con semplici manovre non traumatiche.

Eritroplachia: indica una placca di colore rosso sulla superficie mucosa, nonostante anche questa non costituisca una diagnosi istologica, l'atipia cellulare è un reperto comune, e il carcinoma invasivo è presente in una sostanziale percentuale di biopsie.

Eritroleucoplachia: forma mista rispetto alle due precedentemente descritte

Pachidermia: indica un ispessimento a livello macroscopico della mucosa, tipicamente si osserva a livello della porzione posteriore della glottide.

Data la somiglianza macroscopica tra lesioni con nessun rischio di malignità e lesioni pre-invasive saranno qui di seguito riportati i possibili riscontri istopatologici a seguito di biopsia diagnostica.

Iperplasia squamocellulare: un'alterazione benigna, nella quale si assiste ad un ispessimento dell'epitelio senza nessuna atipia cellulare. L'ispessimento è causato da un incremento delle cellule dello strato spinoso (acantosi), e/o dello strato basale. Può essere ricoperto da una cospicua strato di cheratina (fig. 10). La differenziazione squamosa è ben preservata, e questo tipo di cambiamento epiteliale è reversibile. Non viene considerata come una lesione precancerosa. Può essere necessaria una biopsia per stabilire una diagnosi definitiva.

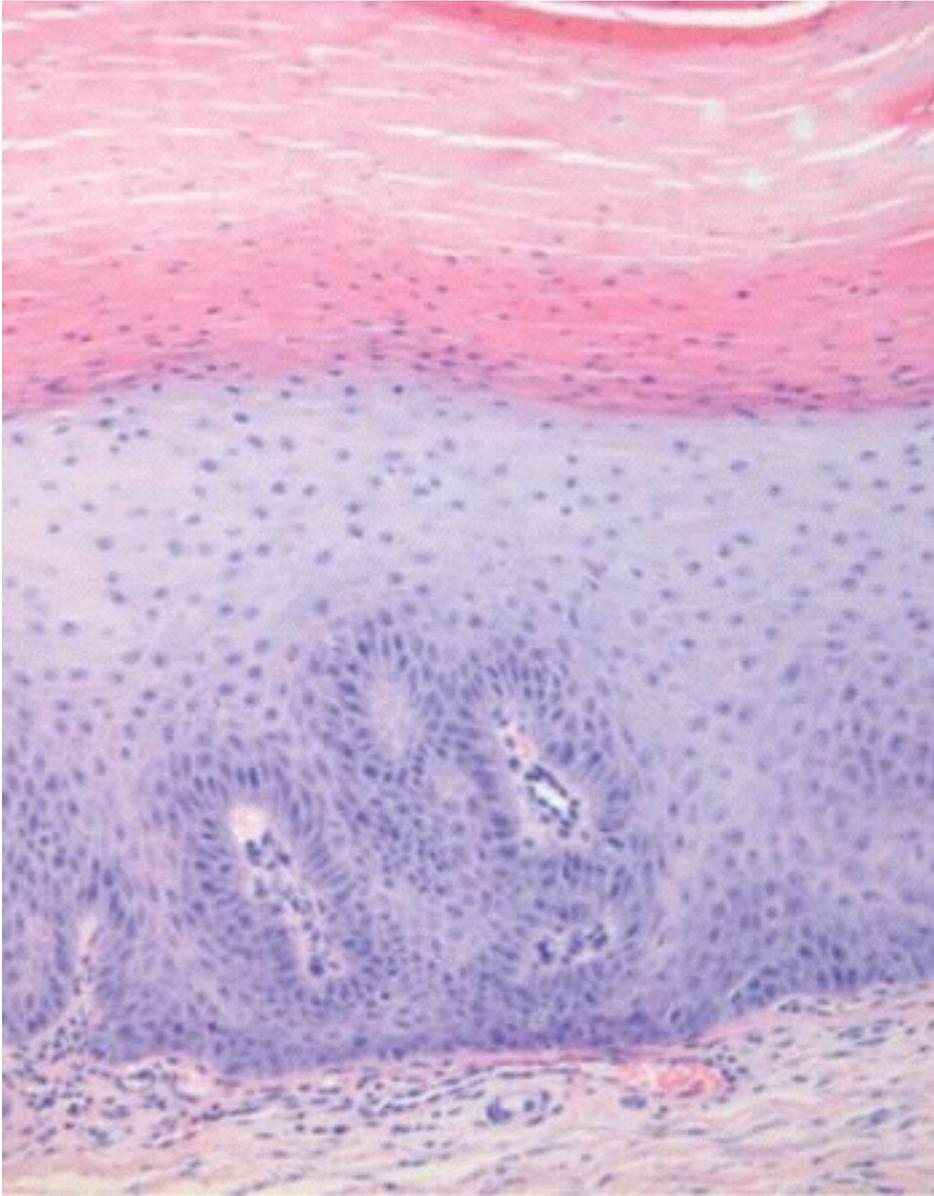


Fig. 10

Iperplasia pseudo epiteliomatosa: descrive un'esuberante crescita reattiva o riparativa, con estensione di processi papillari bulbosi nella lamina propria. L'epitelio iperplastico può simulare un carcinoma squamocellulare ben differenziato, specialmente quando appare distaccato dalla superficie come risultato di un taglio trasversale, ma l'assenza di atipia e la presenza di cellule dell'infiammazione ci aiuta nella diagnosi (fig. 11). Questa alterazione si associa di solito a particolari condizioni cliniche patologiche come alcuni stati infiammatori cronici (tubercolosi). Non esiste alcuna evidenza che dimostri un potenziale trasformativo maligno.

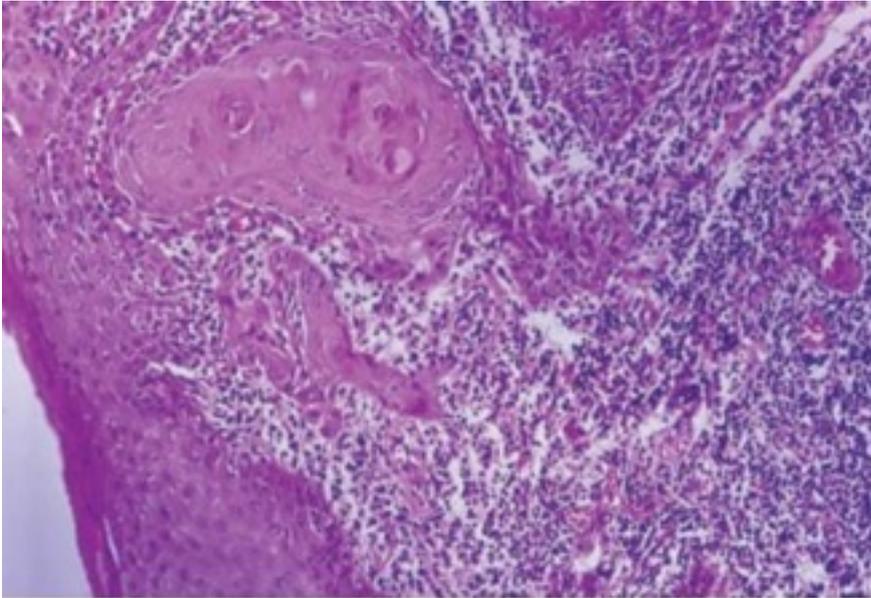


Fig. 11 Iperplasia pseudo epiteliomatosa

Cheratosi, ortocheratosi e paracheratosi: questa è un'alterazione patologica dell'epitelio, che consegue alla produzione di cheratina sulla superficie dell'epitelio. La cheratinizzazione può essere senza nuclei (ortocheratosi), quando è presente uno strato granulare prominente, o con nuclei (paracheratosi). La paracheratosi può rappresentare una maturazione difettosa o semplicemente un rapido turnover delle cellule epiteliali. L'acantosi può comparire in combinazione con la cheratinizzazione in proporzione variabile. La membrana basale rimane intatta [50]. L'atipia cellulare è assente ed è mantenuta la normale sequenza di maturazione degli strati cellulari. Per confermare la diagnosi è necessaria la biopsia. Nonostante questa non sia considerata una lesione con potenziale evoluzione maligna, va tenuto in mente che la cheratosi può essere associata a displasia (displasia cheratinizzante) o presentarsi sulla superficie di un carcinoma squamocellulare (carcinoma squamocellulare cheratinizzante) [51].

Neoplasia laringea intraepiteliale, displasia: Questi termini indicano la presenza di caratteristiche cellulari atipiche nell'epitelio squamoso laringeo. La displasia rappresenta la più precoce lesione che manifesta, sia alla microscopia ottica che a livello molecolare, i lineamenti cancerosi. Attualmente esistono tre metodi classificativi del grado di malignità secondo la World Health Organization (WHO) la classificazione "displasia", il sistema squamous intraepithelial neoplasia e la classificazione Ljubljana

CLASSIFICAZIONE DISPLASIA	SQUAMOUS INTRAEPITHELIA NEOPLASIA (SIN)	CALSSIFICAZIONE DI LJUBLIANA
Iperplasia a cellule squamose		Iperplasia squamoso cellulare (semplice)
Displasia lieve	SIN1	Iperplasia basale/para basale
Displasia moderata	SIN 2	Iperplasia semplice
Displasia grave	SIN 3	Iperplasia atipica
Carcinoma <i>in situ</i>	SIN 4	Carcinoma <i>in situ</i>

Friedman e Ferlito [50, 52] hanno usato il termine “Laringeal Intraepitelial Neoplasia” (LIN) includendo sia la displasia che il carcinoma *in situ*.

LIN I (displasia minima o lieve): la stratificazione è mantenuta e le cellule presenti nei 2/3 più superficiali dell’epitelio mostrano una differenziazione citoplasmatica (maturazione), con ponti intercellulari visibili e, in alcuni casi, cheratinizzazione superficiale. Le atipie cellulari e architetturali compaiono nel 1/3 inferiore, si osserva orientazione disordinata “affollamento nucleare”, e pleomorfismo nucleare, ipercromatismo nucleare ed un incremento nel rapporto citoplasma/nucleo. I nucleoli sono evidenti ma le mitosi sono scarse.

LIN II (displasia moderata): i cambiamenti istologici sono simili a quelli della displasia lieve, ma le anomalie si estendono ai 2/3 dello spessore dell’epitelio; sono ancora apprezzabili, a livello del 1/3 superiore, la stratificazione e la differenziazione. Le figure mitotiche sono più abbondanti ed è possibile osservare, all’interno dello stesso campo d’ingrandimento, gradi diversi di displasia (fig. 12).

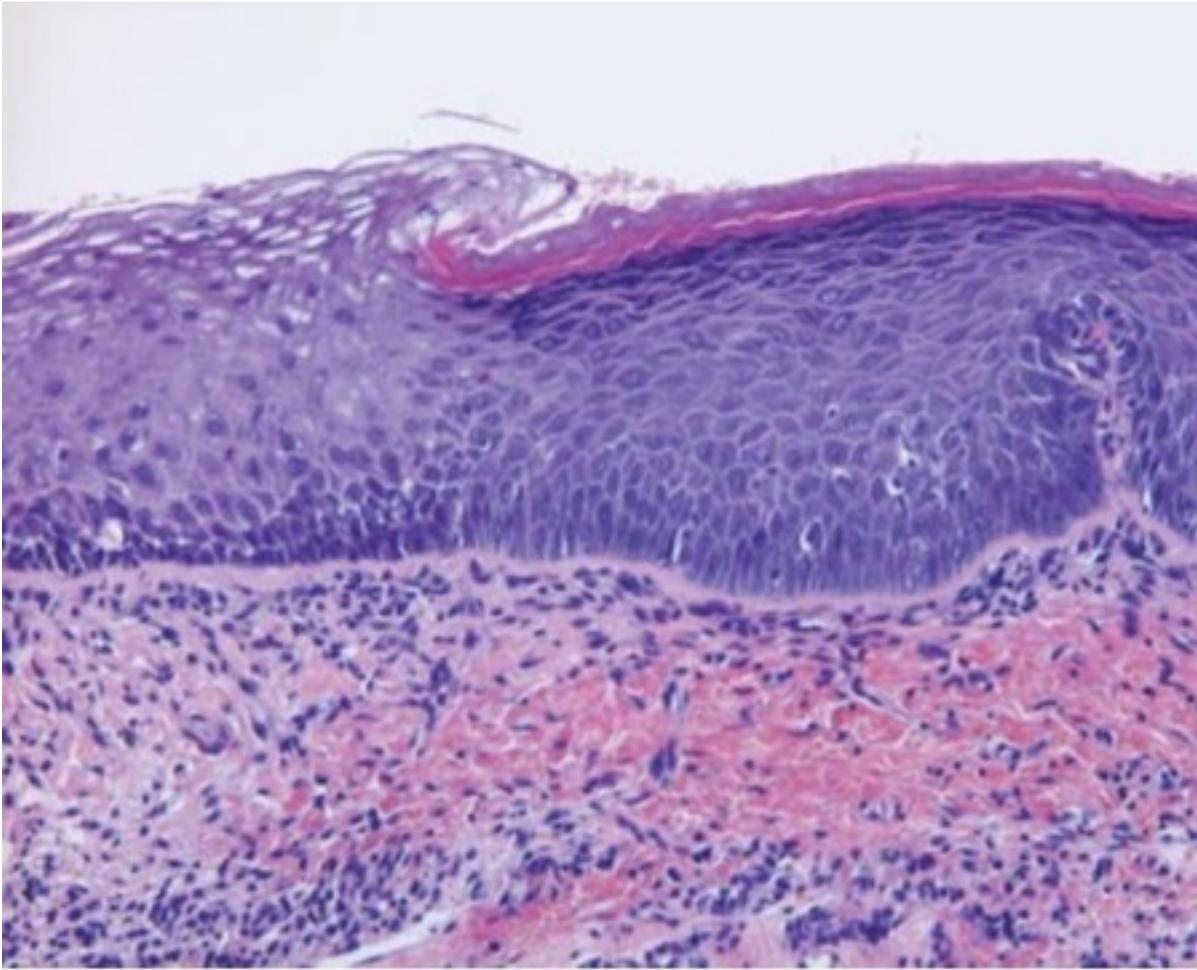


Fig. 12 Displasia moderata con soprastante cheratosi sul lato destro accanto a normale epitelio. Le cellule atipiche occupano l'intera metà inferiore.

LIN III (displasia severa e carcinoma in situ). Le cellule non stratificate e non differenziate occupano da oltre i 2/3, all'intero spessore. È presente pleomorfismo nucleare e figure mitotiche aberranti nel contesto di tutti gli strati. Non si riscontra cheratinizzazione nella maggioranza dei casi, a volte è presente solo un sottile strato superficiale con una completa mancanza di orientamento delle cellule sottostanti.

La lesione è comunque contenuta all'interno della lamina basale anche nelle porzioni più profonde. Nel carcinoma *in situ*, tutti gli strati epiteliali sono formati da cellule neoplastiche, nella displasia severa è presente una rudimentale maturazione a livello più superficiale (fig. 13)

L'incidenza nella popolazione generale si aggira attorno allo 0,4/100'000[48], ma aumenta considerevolmente in coorti di studio con fattori di rischio. Il carcinoma *in situ* si può accompagnare ad aree non diagnosticate di cancro invasivo determinando quindi una sottostadiazione della lesione. Pertanto la diagnosi di un carcinoma *in situ* a seguito di una analisi istopatologica di un piccolo campione biotico deve essere accettata

con riserva; per una valutazione affidabile è necessaria una biopsia escissionale completa con sezioni multiple dell'intero campione [53]. Il riscontro, all'osservazione di carcinomi invasivi, di aree adiacenti di carcinoma in situ non è difatti infrequente.

Bisogna pertanto considerare i LIN come l'insieme dei cambiamenti intraepiteliali, che iniziano generalmente come una neoplasia ben differenziata e terminano nel carcinoma invasivo, rappresentando quindi l'evoluzione morfologica di un unico processo neoplastico e non come delle lesioni pre-cancerose [54].

Lo sviluppo di invasività di queste lesioni è difficile da predire, nella letteratura scientifica si trova grande variabilità nel calcolare la progressione; Weller et al.[55] in una metanalisi condotta su 940 pazienti hanno dimostrato una frequenza di trasformazione maligna generale del 14 % con un tempo medio di 5,8 anni. La frequenza di trasformazione aumentava con il grado della displasia (30,4% per displasia di grado severo vs 10,6% per i gradi lieve moderato).

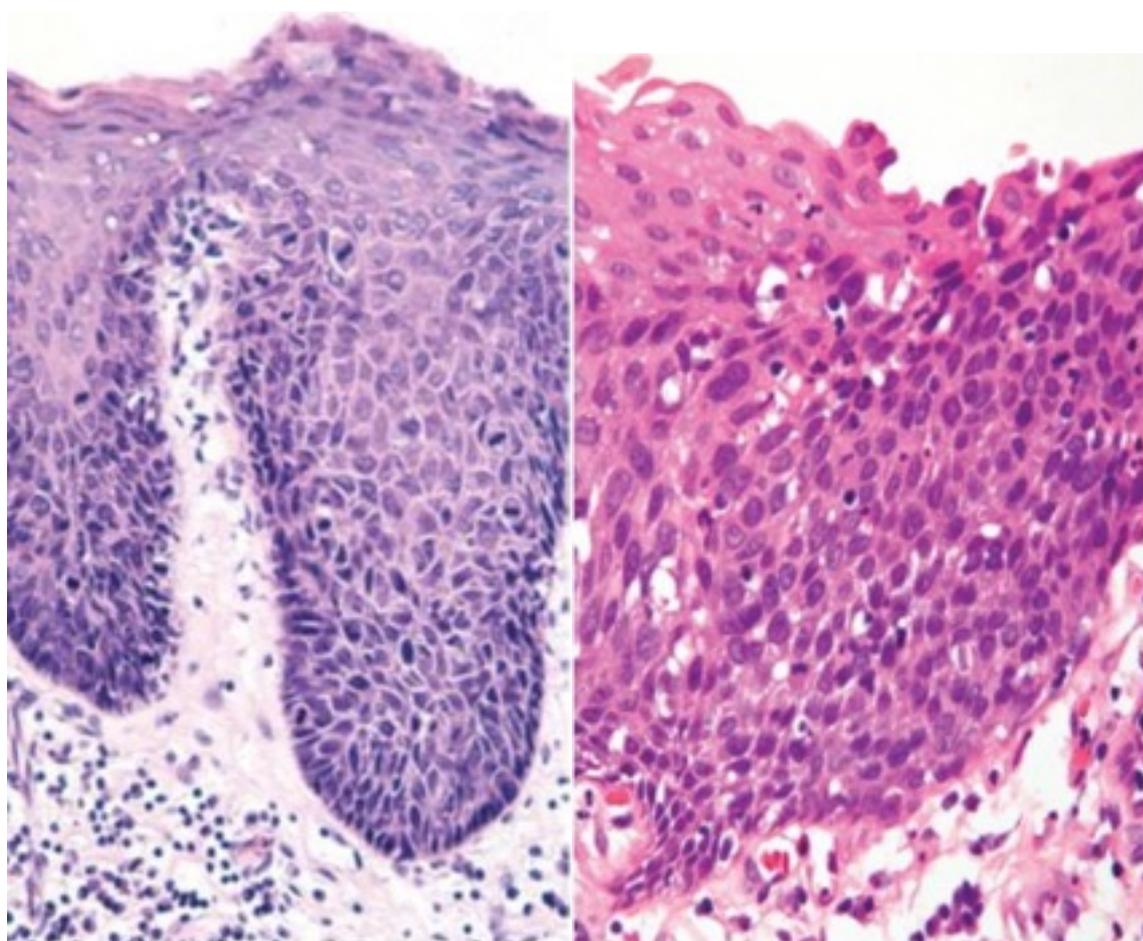


Fig. 13 A sinistra displasia grave, a destra carcinoma *in situ*

4.3 Lesioni maligne

Epidemiologia

I tumori della laringe compaiono principalmente nella sesta/settima decade di vita. Sono più comuni negli uomini, anche se la crescente abitudine al fumo nel sesso femminile nelle ultime due decadi sta riequilibrando la differenza.

4.3.1 Incidenza

Il SCC rappresenta il 95% di tutte le malignità laringee. La maggior parte origina dalla regione glottica o sovraglottica, sebbene vi siano variazioni geografiche nel rapporto tra queste due sedi. L'incidenza nei maschi è elevata (10/100'000) nel sud e centro Europa, Brasile del sud, Uruguay, Argentina e tra la popolazione nera negli Stati Uniti. La frequenza più bassa (<1/100'000) è registrata nel sud est asiatico e in Africa centrale. L'incidenza nelle donne è inferiore al'1/100'000. È leggermente più comune nelle aree urbane rispetto a quelle rurali [56].

In Francia, Spagna, Italia, Finlandia e Olanda la regione sovraglottica è quella più frequentemente interessata; mentre negli Stati Uniti, Inghilterra, Canada e Svezia prevale la sede glottica. In Giappone è approssimativamente lo stesso trend [57].

L'incidenza è in aumento in gran parte del mondo, sia negli uomini che nelle donne. Questo incremento potrebbe essere collegato al cambiamento nel consumo di alcool e tabacco.



4.3.2 Eziologia

Alcool e tabacco: La maggior parte dei tumori è legata all'abuso di tabacco e alcool. La

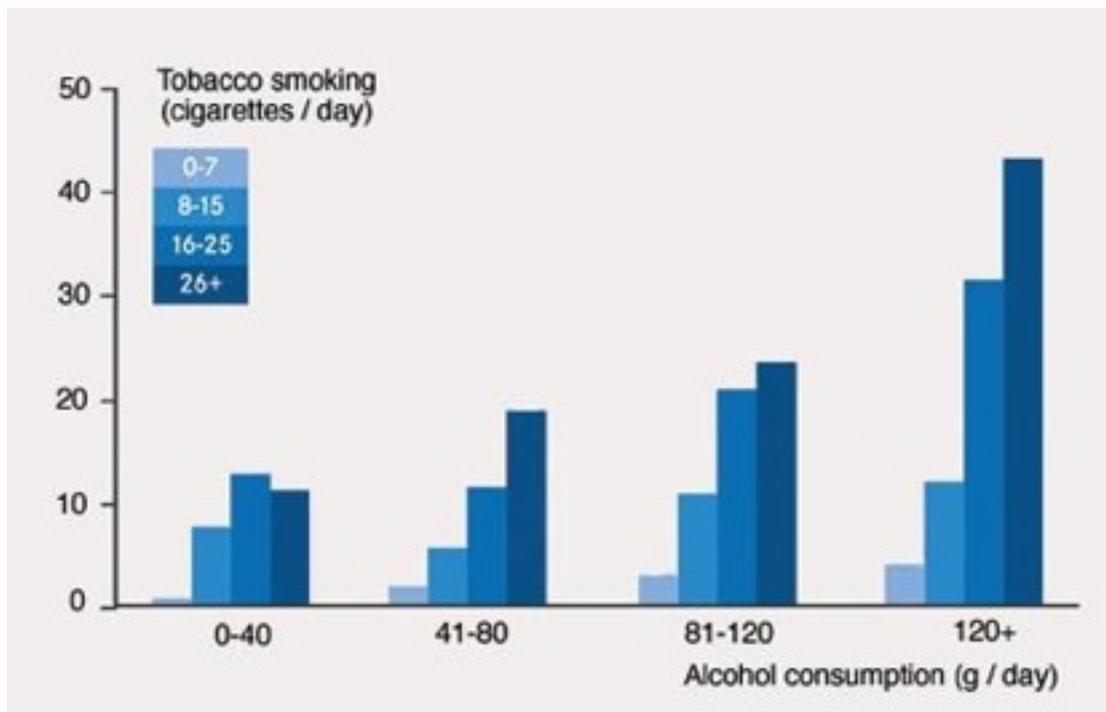
combinazione di entrambi determina un effetto di tipo moltiplicativo piuttosto che additivo. Il consumo di alcool aumenta maggiormente il rischio relativo (RR) per SCC della sovraglottide, mentre il tabacco aumenta il RR (x 10) per il cancro glottico anche nei non bevitori. Inoltre all'interno del gruppo dei tabagisti incrementano ulteriormente il RR l'aver iniziato in giovane età, aver fumato per lungo tempo, un numero elevato di sigarette e effettuare profonde inalazioni. Eliminare il fumo e l'alcool potrebbe evitare circa il 90% dei tumori di questa sede.

Asbesto e esposizione professionale: nonostante l'esposizione lavorativa all'asbesto non sia da tutti supportata, esistono evidenze a suffragio di aumento del rischio per altre esposizioni lavorative, quali quella ad idrocarburi aromatici policiclici, polvere di metallo, polvere di cemento, lacca e vernice. L'aumento del RR va da un 1.8 per la polvere di cemento ad un 2.7 per gli idrocarburi policiclici. Associazioni significative sono inoltre associate con radiazioni ionizzanti, vapori di gasolio, vapori di acido solforico e gas mostarda.

Human papilloma virus: ci sono prove discordanti sul coinvolgimento dell'HPV di tipo 16, con un suo riscontro in SCC laringei tra il 3 e 85%; inoltre il DNA di HPV è stato riscontrato nel 12-25 % di individui con laringi istologicamente sane; vi si attribuisce pertanto un ruolo minore.

Dieta e fattori nutritivi: l'elevato introito di frutta e verdura esercita probabilmente un effetto protettivo, in particolare esistono prove sui carotenoidi e vitamina C

Reflusso gastroesofageo: il reflusso è stato correlato ad un incrementato rischio soprattutto in quei pazienti nei quali mancano gli altri fattori di rischio maggiori, ma può anche avere un effetto sinergico insieme ad alcool e tabacco [56].



Incremento moltiplicativo del contemporaneo consumo di quantità crescenti di alcool e tabacco

4.3.3 Istologia

Histology	N	%
Carcinoma-in-situ	46	9.6%
Squamous cell carcinoma	383	79.9%
Verrucous carcinoma	5	1.0%
Spindle cell carcinoma	8	1.7%
Lymphoepithelial carcinoma	1	0.2%
Subtotal	443	92.5%
Neuroendocrine carcinoma	4	0.8%
Adenoid cystic carcinoma	2	0.4%
Mucoepidermoid carcinoma	3	0.6%
Chondrosarcoma	8	1.7%
Liposarcoma	3	0.6%
Lymphoma	6	1.2%
Plasmacytoma	1	0.2%
Malignant granular cell tumour	1	0.2%
Secondary papillary thyroid carcinoma	7	1.5%
Fibrosarcoma, low-grade	1	0.2%
Total	479	100.0%

*Mount Sinai Medical Center, 1994-2003

Il carcinoma a cellule squamose (carcinoma epidermoide): rappresenta il 90% di tutti i tumori glottici.

Macroscopicamente: si può presentare come una placca piana a margini rilevati e ben definiti, o mostrare un aspetto esofitico polipoide. La superficie può essere ulcerata.

Istopatologia: i prerequisiti dello SCC sono la differenziazione squamosa, spesso vista come cheratinizzazione con variabile formazione di perle cornee, e la crescita invasiva. L'invasione si manifesta con la distruzione delle membrana basale e l'estensione ai tessuti sottostanti accompagnata da una reazione stromale (reazione desmoplastica con deposizione di matrice extracellulare e proliferazione di miofibroblasti). Tradizionalmente il tumore viene classificato in Ben-Moderatamente e Scarsamente differenziato, la maggior parte dei tumori glottici sono del tipo ben differenziato e moderatamente differenziato. Il tipo di crescita invasivo può mostrare sia un pattern espansivo, che un pattern invasivo, quest'ultimo con prognosi peggiore [58].

La diffusione: può essere diretta, alle strutture contigue, per via linfatica e per via ematogena. Il carcinoma epidermoide glottico presenta, negli stadi iniziali una scarsa tendenza alla diffusione linfonodale (a differenza delle altre due regioni laringee); metastasi ematogene clinicamente rilevanti non sono frequenti, ma possono comparire negli stadi avanzati (10%), la sede più frequentemente interessata è il polmone seguito da ossa e fegato; generalmente quando sono presenti le metastasi ematogene, contemporaneamente vi sono metastasi linfatiche a distanza (linfonodi mediastinici, addominali para- aortici, linfatici di cute cervicale e sterno)

Il carcinoma verrucoso: rappresenta una variante non metastatizzante del SCC di tipo Ben-differenziato. La laringe è la seconda localizzazione più frequente (dopo il cavo orale), con una frequenza del 1-4 % di tutti tumori in questa sede [59]. La porzione anteriore delle corde è quella che maggiormente viene colpita da questo istotipo.

Macroscopicamente: si presenta come un tumore ben circoscritto, a larga base di impianto, esofitico e verrucoso, generalmente di colorito biancastro con un lento accrescimento e distruzione locale estensiva se non trattato.

Istopatologia: è composto da papille inspessite a forma di clava e invaginazioni intrastromali di epitelio squamoso ben differenziato con marcata cheratinizzazione ed un sottile core fibrovascolare. L'invasione dei tessuti sottostanti avviene più per la spinta della crescita che per un meccanismo infiltrativo. La mucosa circostante mostra una progressiva transizione da iperplasia a carcinoma. Bisogna prestare molta attenzione a questo istotipo poiché esiste la possibilità, sia che evolva in una forma più aggressiva, sia che nel suo contesto, siano presenti foci di SCC classico (carcinoma verrucoso ibrido, si verifica con un'incidenza del 10%); in entrambi i casi il tumore acquista la capacità di metastatizzare [57, 60]. La

diagnosi istologica a seguito di biopsia può essere difficoltosa poiché spesso troppo superficiale [60].

Il carcinoma a cellule fusiformi (carcinoma sarcomatoide): è un tumore bifasico, composto da SCC, sia invasivo che in situ, ed una componente di cellule fusate con un aspetto mesenchimale, ma con un'origine epiteliale. La glottide è il distretto del testa collo che viene colpito più frequentemente da questo istotipo [61]. È associato a esposizione a radiazioni ionizzanti o a pregressa radioterapia. ***Macroscopicamente:*** generalmente presenta un aspetto polipoide di dimensione variabile, con una superficie ulcerata. In rarissimi casi si può anche presentare come una lesione ulcero-infiltrante. ***Istopatologia:*** la componente fusata rappresenta la maggior parte della massa e può assumere aspetti diversi, come simil-fibrosarcoma o simil-istiocitoma fibroso maligno. Possono essere presenti foci di differenziazione osteosarcomatosa, condrosarcomatosa e rabdosarcomatosa, in particolare in pazienti che hanno subito radioterapia. Le metastasi contengono o solo la componente squamocellulare o entrambe, mai solo cellule fusate [62].

La diffusione: metastatizza ai linfonodi regionali nel 25% dei casi; la disseminazione a distanza è più rara (5- 15%) [63].

Carcinoma papillare a cellule squamose: è una variante distinta dello SCC, caratterizzato da una crescita papillare, esofitica e una prognosi favorevole; è leggermente più frequente nella regione sovraglottica che nella regione glottica [57].

Macroscopicamente: si presenta come un tumore soffice e friabile, con aspetto esofitico, polipoide papillare[60]. Si sviluppa di solito da un sottile peduncolo, ma sono state descritte lesioni con una base ampia.

Istopatologia: il tumore è caratterizzato da un pattern di crescita di tipo prevalentemente papillare. Queste papille sono dotate di un sottile core fibrovascolare ricoperto da epitelio basaloide immaturo neoplastico o da più cellule pleomorfe. Comunemente è presente una minima cheratosi; sono presenti frequentemente foci necrotici e aree emorragiche. L'invasione stromale è rappresentata da nidi, singoli o multipli, di cellule circondate da un'intensa reazione infiammatoria a livello dell'interfaccia stroma/tumore. Nel caso non venga rilevato nessun coinvolgimento dello stroma la lesione viene definita "iperplasia papillare atipica".

La diffusione: è possibile un coinvolgimento dei linfonodi regionali, ma le metastasi a distanza sono rare; sono riportati casi di interessamento polmonare in un limitato numero di pazienti.

Definizione del T, dell’N e Staging del tumore glottico (Tabella 1)

Tabella 1

<p>Tis: Carcinoma <i>in situ</i></p> <p>T1: Tumore limitato alla(e) corda(e) vocale(i) (può coinvolgere la commissura anteriore o quella posteriore) con normale motilità</p> <p>T1a: Lesione di una sola corda vocale</p> <p>T1b: Lesione di entrambe le corde vocali</p> <p>T2: Tumore che si estende alla sovraglottide e/o alla sottoglottide, e/o con compromissione della mobilità delle corde vocali</p> <p>T3: Tumore limitato alla laringe con fissazione della corda vocale e/o che invade lo spazio paraglottico e/o che presenta minima erosione cartilaginea</p> <p>T4a: Tumore che invade la cartilagine tiroidea e/o si estende nei tessuti extra-laringei (trachea, tessuti molli del collo inclusi i muscoli profondi/ estrinseci della lingua [genioglosso, ioglosso, palatoglosso e stiloglosso], i muscoli pre-tiroidei, la tiroide o l’esofago)</p> <p>T4b: Tumore che invade lo spazio prevertebrale, ingloba la carotide o invade le strutture mediastiniche</p>	<p>N0 assenza di metastasi linfonodali regionali;</p> <p>N1 metastasi in un solo linfonodo omolaterale di dimensione massima inferiore o uguale a 3 cm;</p> <p>N2a metastasi in un solo linfonodo omolaterale di dimensione massima fra 3 e 6 cm;</p> <p>N2b metastasi in più linfonodi omolaterali, nessuno dei quali di dimensione massima > 6 cm;</p> <p>N2c metastasi in linfonodi bilaterali o controlaterali, nessuno dei quali di dimensione massima > 6 cm;</p> <p>N3 metastasi in qualsiasi linfonodo di dimensione massima > 6 cm.</p>
<p>Stadiazione</p>	
<p>0: Tis,N0,M0</p> <p>I: T1,N0,M0</p> <p>II: T2,N0,M0</p> <p>III: T3,N0,M0 T1-2,N1,M0</p> <p>IVA: T4a,N0-1,M0 T1-4a,N2,M0</p> <p>IVB: T4b, ogni N,M0 ogni T,N3,M0</p> <p>IVC: ogni T,ogni N, M1</p>	

Modalità di estensione

A livello laringeo esistono punti di debolezza e punti di resistenza che ci aiutano nella valutazione di un eventuale estensione loco-regionale [64].

Punti di resistenza ad un’estensione extralaringea

- Cartilagine tiroide e cricoide
- Membrana ioepiglottica
- Membrana tiroioidea

Punti di resistenza ad un’estensione intralaringea

- Cono elastico

Punti di debolezza ad un’estensione extralaringea

- Commissura anteriore (la mucosa è molto vicina alla cartilagine)
- Parte posteriore ventricolo, vicino al margine della laringe

- Membrana cricotiroidea

Punti di debolezza ad un'estensione intralaringea

- Spazio paraglottico
- Spazio iotiroepiglottico

4.3.4 La clinica

Il sintomo più comune e precoce di una neoplasia glottica è la disfonia, che si presenta inizialmente come intermittente e successivamente persistente e più severa [65]; i pazienti che si rivolgono al medico lamentano raucedine e cambiamenti della voce.

In uno studio retrospettivo condotto da Hansen et al. [66] su un totale di 544 pazienti affetti da cancro glottico (stadio I-III) i sintomi iniziali e le percentuali erano:

SINTOMO RIFERITO	PERCENTUALE %
Raucedine	90,7
Angina faringea, sensazione di corpo estraneo	2,9
Tosse	1,7
Otalgia	1,3
Dispnea	1,1
Disfagia	0,6
Calo ponderale	0,4
Riconoscimento del tumore	0,4
Altri	0,7
Nessun sintomo	0,2

La disfonia si manifesta già in stadi precoci di malattia, ma a causa delle frequentissima abitudine al fumo di questi pazienti, il tumore si sviluppa in un substrato di laringite cronica, condizione che di per se, già determina una compromissione rilevante della voce (voce ragliante, di intensità ridotta e facilmente stancabile), pertanto un ulteriore aggravamento può essere erroneamente ascritto dal paziente, ad un banale processo infettivo, determinando un ritardo diagnostico [60].

Una volta che il clinico si trova ad ispezionare un paziente con sospetta o provata malignità glottica, esso dovrà prestare attenzione (avvalendosi di

fibroscopia e videostroboscopia) alla progressione dell'onda mucosa, alla motilità cordale e dell'articolazione cricoaritenoidea.

Non appena il cancro invasivo oltrepassa la lamina basale, andando a compromettere lo strato superficiale della lamina propria, è possibile osservare alla stroboscopia segmenti cordali non vibranti, non visibili ad occhio nudo [67]; nel caso di un'invasione a direzione orizzontale, che vada ad interessare, il legamento vocale prima e, successivamente, il muscolo, si avrà una compromissione della motilità cordale, l'ulteriore coinvolgimento del sottostante cono elastico, porterà ad una fissità della corda vocale *in toto*. L'interessamento dell'articolazione cricoaritenoidea deve essere sempre valutato attentamente, questa infatti rappresenta il perno per i muscoli cricoaritenoidei, ed una sua compromissione porterà a gravi problemi sia sfinterici che fonatori, influenzando irreparabilmente il tipo di intervento terapeutico.

Ad uno stadio avanzato, nel caso in cui la neoplasia si addentri ulteriormente nello spazio paragottico andando ad interessare sia la muscolatura intrinseca che la porzione intralaringea del nervo ricorrente si assisterà ad una fissità di tutta l'emilaringe [11]; l'invasione sottoglottica potrà dare dispnea e lo sviluppo di disfagia e di otalgia riflessa indicherà 'interessamento dell'area sottoglottica e della faringe [60].

4.3.5 Prognosi e fattori predittivi

Fattore predittivi clinici: il TNM rappresenta il fattore predittivo di sopravvivenza più accurato. Questi i dati pubblicati nella 7th edizione di AJCC [68]:

STADIO	SOPRAVVIVENZA A CINQUE ANNI
I	95%
II	79%
III	60%
IV	44%

Altri fattori sono l'età, le comorbidità, e il performance status [56].

Fattori predittivi istopatologici:

istotipo del tumore: il carcinoma verrucoso, data l'assenza di potere metastatico e la crescita lenta, ha una prognosi eccellente, la sopravvivenza riportata è del 90-95% [69]. il carcinoma papillare sembra avere una prognosi migliore rispetto allo SCC [57], probabilmente dovuta alla limitata invasività

locale. Per il carcinoma sarcomatoide fattori prognostici positivi sono determinati dalla crescita polipoide piuttosto che endofitica, dalla infiltrazione relativamente superficiale dei processi sarcomatoidi e da una anamnesi negativa del paziente per pregressi cicli radioterapiche [70]. Per il SCC è legato al grado di differenziazione valutabile dalla produzione e dal tipo citocheratine), al pattern d'invasività [71] e agli indici di proliferazione, la frazione di proliferazione viene determinata immunohistochimicamente mediante anticorpi diretti contro Ki67 e l'antigene nucleare di proliferazione cellulare (PCNA), questi sono correlati fortemente con il aggressività [71] e la presenza di metastasi linfonodali [72], non rappresenta però un fattore indipendente [73].

Margini di resezione: per selezionati tumori glottici possono esser pochi millimetri, per stadi più avanzati si ritiene ottimale una distanza uguale o maggiore di 5 millimetri.

Invasione vascolare e peri-neurale: la penetrazione di cellule neoplastiche all'interno di vasi linfatici e/o sanguigni è associato con un aumentata propensione a dare metastasi linfonodali ed ematogene a distanza; compare generalmente in SCC aggressivi ed è associato con recidive e scarsa sopravvivenza [74].

Diffusione extra capsulare in metastasi linfonodali: le metastasi linfonodali sono il principale singolo fattore prognostico e la diffusione extra capsulare è fortemente associata con recidive locoregionali e metastasi a distanza.

5 LO STATO DELL'ARTE DELL'IMAGING DELLA GLOTTIDE

Nei pazienti con disfonia, l'accuratezza diagnostica dalla storia clinica e dell'esame fisico, escluso laringoscopia, è solo del 5% a fronte di un'accuratezza del 68,3% a seguito di una valutazione iniziale della laringe endoscopica [75]. A causa della vasta gamma di potenziali cause di disfonia, determinare l'esatta eziologia della disfunzione laringea è necessaria per pianificare il trattamento. Il tasso di trasformazione maligna delle lesioni precancerose varia dal 6% al 22%, così che la diagnosi precoce risulta di fondamentale importanza.

I tassi di sopravvivenza sono significativamente più alti per i carcinomi in fase iniziale, quindi, è indispensabile concentrare la diagnosi sui primi passi nello sviluppo del tumore per attuare una tempestiva terapia adeguata [76]. La diagnosi precoce e la valutazione pre-operatoria sono importanti sia per una terapia curativa ma anche per la conservazione delle importanti funzioni d'organo.

Infatti il trattamento dei tumori cancro della laringe e suoi precursori ha un grande impatto su importanti funzioni di base di tutti i giorni come la respirazione, la comunicazione verbale e la deglutizione.

Da queste osservazioni, è ovvio che ottenere immagini di alta qualità e risoluzione, rivelando la morfologia dettagliata delle strutture glottide, è uno dei principali compiti dell'imaging laringeo.

Oggi, vi è un'ampia scelta dei diversi strumenti diagnostici, ma ciascuno di essi presenta proprietà e limiti specifici che influenzano l'uso nella pratica corrente.

5.1 Endoscopia

L'endoscopia è ormai uno strumento di uso comune nella pratica clinica, rappresentando spesso il primo approccio strumentale al paziente.

Il fibroscopio trans nasale e i telescopi rigidi a luce bianca: essi permettono di ottenere immagini nitide e brillanti dandoci una definizione del colore, dell'aspetto, dei limiti superficiali della lesione, inoltre accoppiati con la nuova tecnologia degli schermi HD si è potuto ulteriormente magnificare la qualità dell'immagine. Data però la caratteristica, delle lesioni delle corde vocali (iperplasia, displasia, neoplasia) di manifestarsi macroscopicamente con aspetto molto simili, non permettono di dare una diagnosi solo sulla base delle immagini ottenute. Inoltre, anche nel caso vi sia una diagnosi certa, essi non sono in grado di fornire una completa e precisa stadiazione; in uno studio [77] condotto sulla capacità dell'endoscopia di fornire una valutazione pre terapeutica su neoformazioni delle corde vocali, la valutazione esclusiva endoscopica ha sottostadiato tutti i tumori, l'accuratezza clinica dimostrata era del 55%; in particolare con la endoscopia non è stato possibile identificare l'invasione dello spazio paraglottico, dello spazio pre epiglottico e il coinvolgimento di tessuti extra laringei; nei casi in cui la neoformazione abbia una crescita esofitica di tipo "bulky", risulta per di più difficoltoso ispezionare sia la commissura anteriore che la porzione sottoglottica [78].

Al fine di implementare la capacità diagnostica dell'endoscopio sono stati creati nel corso degli anni numerosi strumenti.

5.1.1 La laringostroboscopia

Questo apparecchio sfrutta l'effetto stroboscopico appunto, che ci permette di osservare i movimenti vibratorii cordali (la cui compromissione rappresenta uno dei primissimi segni di atteggiamento invasivo di una

lesione). Illuminando con lampi di luce bianca allo xenon ad una frequenza leggermente inferiore rispetto al ciclo vibratorio delle corde si ha la percezione che questo venga rallentato, ciò è dovuto al fatto che per ogni lampo di luce viene illuminata, non la medesima posizione della corda ma quella immediatamente adiacente secondo il ciclo vibratorio. In altre parole la stroboscopia ci fornisce un'immagine illusoria che si compone di piccoli frammenti del ciclo vibratorio reale. I moderni apparecchi sono dotati di regolazione automatica della frequenza che permette di sincronizzarla su quella della frequenza fondamentale del paziente. Di norma si utilizzano endoscopi rigidi con angolo di visuale a 90° o 70°.

Lo studio della progressione dell'onda mucosa dalla faccia inferiore a quella superiore della corda è uno dei momenti fondamentali per l'individuazione di zone di rigidità della mucosa causata da lesioni con potenziale canceroso. [79]. Questo strumento viene quindi utilizzato quando il grado udito di disфония non corrisponde all'evidenza diretta osservata con i normali apparecchi endoscopici [80].

Tuttavia l'effetto strobo può essere utilizzato esclusivamente se le corde vocali vengono messe in moto, pertanto la stroboscopia non è in grado di rilevare i patterns vibratorii cordali una volta che la disфония abbia superato un grado moderato [67]. Non è stato inoltre provato una stretta correlazione tra un determinato pattern di vibrazione ed una particolare lesione [81].

5.1.2 Tecniche con la fluorescenza

Esistono due tipi di tecniche che sfruttano la differenza nella fluorescenza tra i tessuti sani e tessuti neoplastici, l'endoscopia ad auto fluorescenza (AFE) e l'endoscopia a fluorescenza indotta (IFE).

L'AFE si basa sul principio di interazione tra una luce con una lunghezza d'onda specifica e i fluorofori tissutali. Quando i tessuti vengono esposti ad una luce a corta lunghezza d'onda (generalmente di colore blu), i fluorofori endogeni (collagene, elastina, protoporfirine, cheratina ed enzimi della catena respiratoria) vengono eccitati, iniziando ad emettere una luce con una lunghezza d'onda maggiore (autofluorescenza di colore verde). Per via di un alterato metabolismo nelle cellule neoplastiche, le cellule maligne mostrano una ridotta quantità di fluorofori. Inoltre l'ispessimento epiteliale impedisce alla luce blu di penetrare nel connettivo sotto mucoso, particolarmente ricco di fluorofori. Entrambi questi meccanismi partecipano alla perdita di autofluorescenza, con un viraggio del colore dal verde al rosso-violetto [82]; inoltre un epitelio atrofico cancerizzato (come l'eritroplachia) può

determinare una riduzione dell'autofluorescenza, legata alla presenza di vasi submucosi patologici e ad atipie vascolari.

La tecnica IFE si basa sull'acquisizione di fluorescenza da parte delle cellule neoplastiche a seguito di applicazione sulla superficie mucosa di acido aminolevulinico (ALA), un precursore della protoporfirina IX (PPIX), fotosensibilizzante naturale. Nei tessuti normali al PPIX, sotto l'azione delle ferrochelatasi, viene incorporato del ferro per andare a formare eme non fluorescente. Per via dell'alta permeabilità cellulare e di una bassa attività delle ferrochelatasi, le cellule neoplastiche tendono ad accumulare PPIX [83]. Come risultato si genera un contrasto di colore (rosso vs blu o rosso vs verde) tra le cellule maligne e i tessuti sani, quando illuminate con una particolare luce filtrata blu [84].



Carcinoma invasivo; A) endoscopia a luce bianca. B) AFE che dimostra una sostanziale perdita di fluorescenza C) IFE mostra una forte fluorescenza



Carcinoma microinvasivo; A) leucoplachia irregolare della corda di destra. B) AFE C) IFE



Displasia severa A) ispessimento bilaterale cheratosico B) AFE C) IFE

Una meta-analisi condotta su 16 pubblicazioni ha dimostrato che nell'identificare le lesioni precancerose e cancerose della laringe, la sensibilità (91% vs 73%), specificità (84% vs 79%) e accuratezza (88% vs 77%) di AFE erano superiori alla endoscopia a luce bianca da sola, mentre IFE ha mostrato una sensibilità ancora maggiore (95% contro 73%) a scapito di specificità (62% contro 79%). Inoltre AFE ha ottenuto anche una più elevata specificità (84% vs 62%) e accuratezza (88% vs 76%) rispetto IFE nel rilevare questo tipo di lesioni. Tuttavia, la sensibilità (91% vs 95%) non ha mostrato differenze significative fra i due metodi [82].

5.1.3 Narrow banding imaging (NBI)

La NBI ovvero visione a banda ristretta è un innovativo sistema di tecnologia ottica che utilizza un doppio filtro che seleziona esclusivamente due lunghezze d'onda pari a 415 e 540 nm, corrispondenti alla luce blu e alla luce verde. La luce che viene filtrata dall'NBI corrisponde al picco di assorbimento dell'emoglobina (assorbe il colore blu e verde mentre riflette il colore rosso), che viene quindi messa in particolare risalto all'interno dei vasi sanguigni che appaiono blu scuro, se localizzati a livello molto superficiale, o verdi, se localizzati a livello sottomucoso. Infatti la lunghezza d'onda corrispondente alla luce blu (compresa tra i 400 e 430 nm) è in grado di penetrare la mucosa solo in superficie, evidenziandone la vascolarizzazione contenuta negli strati superficiali; la lunghezza d'onda corrispondente alla luce verde (compresa tra 525 e 555), invece, penetra più in profondità, evidenziando i vasi sanguigni della sottomucosa. La tecnologia NBI è stata ulteriormente ottimizzata, in termini di qualità delle immagini, accoppiando al sistema l'High Definition Television (HDTV) [85].

Il vantaggio della tecnologia NBI-HDTV è quello di enfatizzare l'architettura vascolare della superficie mucosale, garantendo la detenzione di lesioni epiteliali precancerose grazie alla loro caratteristica

ipervascolarizzazione neoangiogenetica [86].

Secondo gli studi presenti [87] devono essere considerate come sospette ogni area brunastra ben demarcata rispetto alla mucosa circostante, caratterizzata da spot vascolari puntiformi e/o vasi serpiginosi ed irregolari. Inoltre, si osserva la presenza di un vaso ipertrofico afferente la lesione sospetta che si divide nel contesto della stessa a dare il tipico aspetto punteggiato dei loops vascolari tronchi in superficie.



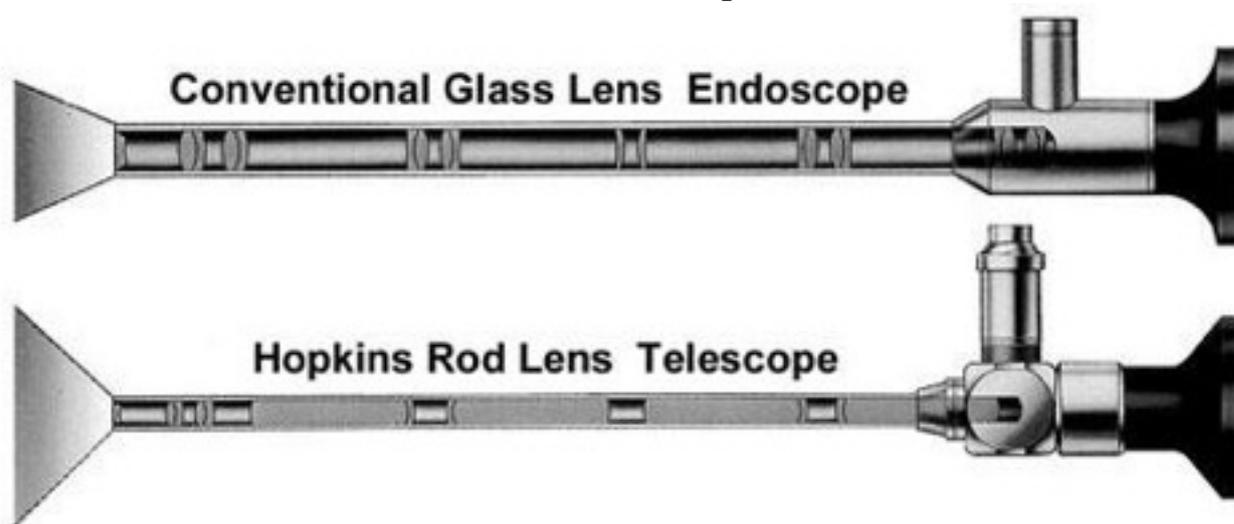
Nell'immagine si apprezza un area brunastra ben demarcata al 1/3 vaso afferente ipertrofico che si dirama in piccole anse vascolari nel Anteriore della CV di sinistra, con spessi punti marroni e vasi serpiginosi contesto della lesione.

Piazza c. et al [88] hanno condotto uno studio prospettico valutando la capacità della tecnologia NBI da solo e NBI-HDTV rispetto alla normale endoscopia con luce bianca di valutare lesioni sospette, utilizzando poi il referto istopatologico come Gold Standard, su un gruppo di 96 pazienti con sospetta lesione: dei 96 pazienti, 20 al NBI mostravano reperti aggiuntivi di sospetto rispetto al semplice esame endoscopico, al NBI-HDTV erano 41 i pazienti con caratteristiche sospette non evidenziate al precedente esame con luce bianca; i risultati del confronto con l'istopatologia:

LESIONI CON SEGNI "SOSPETTI" AGGIUNTIVI	ISTOLOGIA POSITIVA	ISTOLOGIA NEGATIVA
NBI 20	16 (80%)	4 (20%)
NBI-HDTV-41	35 (85.4%)	6 (14,6%)

5.1.4 Contact endoscopy (CE)

E' una delle tecniche più nuove ed innovative. Essa consente una esame *in vivo* ed *in situ* dell'architettura cellulare degli strati superficiali dell'epitelio. Le immagini magnificate sono ottenute utilizzando un endoscopio Hopkins rod's lens (fig.sotto), questo particolare endoscopio presenta una diversa conformazione rispetto al classico, il quale è costituito da una serie di lenti con interposta dell'aria; in questo modello invece gli spazi vuoti all'interno dell'endoscopio rigido sono sostituiti da bacchette di vetro con in bordi finemente lucidati separati da piccole "lenti d'aria". Questo sistema riesce a trasmettere più luce, fornire una migliore magnificazione e determinare una maggiore profondità ed ampiezza del



L'endoscopio viene dunque posizionato a contatto con la mucosa, consentendo di osservare i vasi sottomucosi, successivamente, si applica un colorante, blu di metilene all'1%, ed possibile apprezzare *in vivo* la struttura istologica del campione. Sono disponibili endoscopi rigidi con inclinazione a 0° e 30°, in grado di fornire un ingrandimento di 60 e 150 volte. Una volta a contatto, le immagini citologiche documentate vengono trasmesse e registrate. Il grande vantaggio di questo metodo è rappresentato dalla possibilità di ispezionare numerose aree della superficie epiteliale risparmiando una serie di biopsie alla cieca.

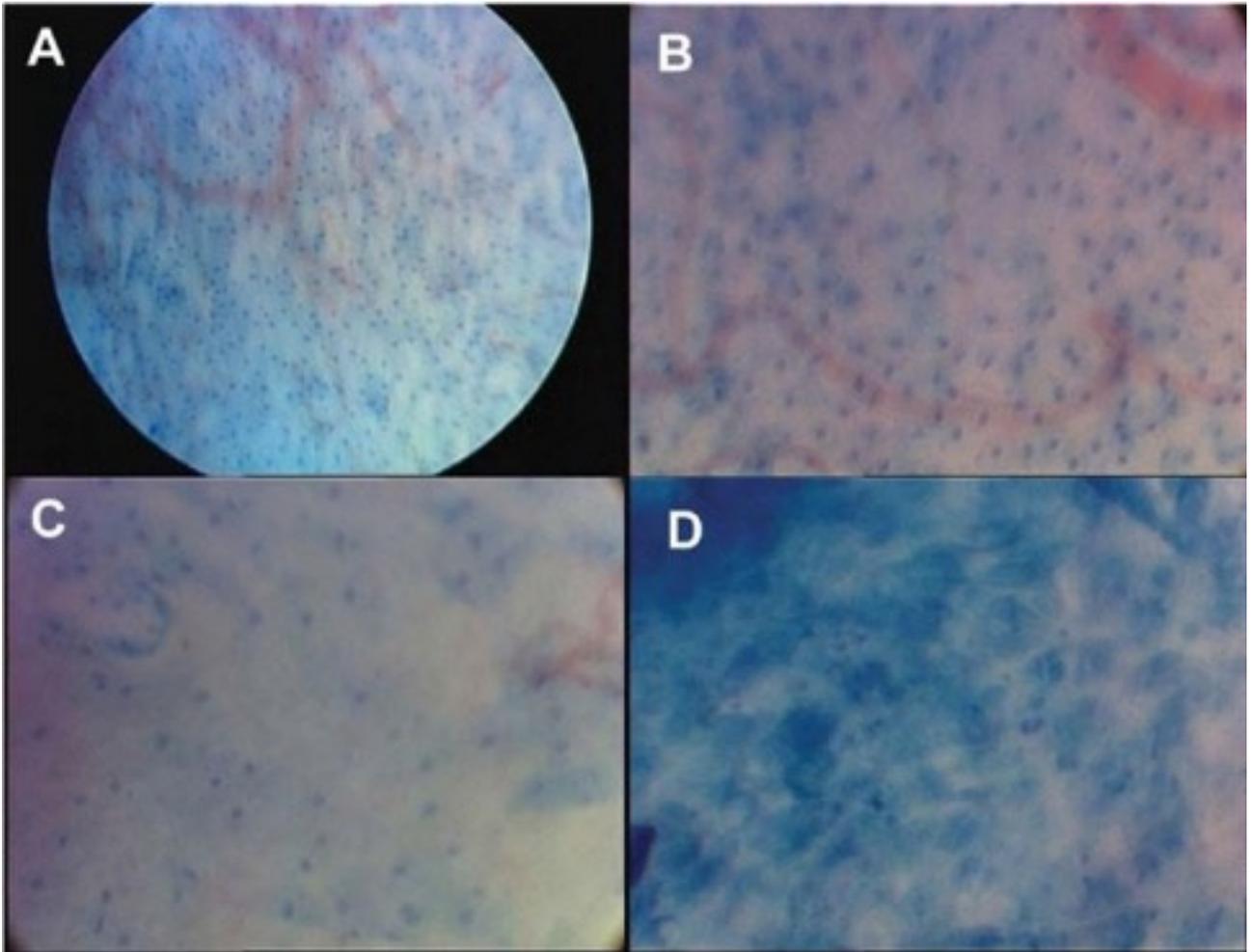
Warneke et al. [89] hanno condotto uno studio applicando questa metodica su 42 campioni (32 lesioni benigne e 10 maligne) facendo poi valutare le immagini da citologi e da un operatore esperto in CE; i citologi sono stati in grado di identificare 29 su 32 lesioni benigne, ma solo 7 su 10 delle malignità; viceversa l'operatore esperto in CE ha fornito una diagnosi corretta su 30 delle 32 benignità e su 9 delle 10 malignità, raggiungendo quindi una sensibilità del 90% ed una specificità del 93.75% dimostrando

quanto l'esperienza possa essere determinante in questa tecnica.

Nello studio di Cikojevic et al. [90] sono invece state messe a confronto la valutazione intraoperatoria con CE e quella mediante Frozen Section rispetto all'analisi definitiva su campione in formalina usato come Gold Standard; la Frozen Section ha mostrato una sensibilità dell'89%, una specificità del 98,9 % ed una accuratezza del 95,7 %; viceversa la CE ha fornito una sensibilità del 79,59 %, ma una specificità del 100% con una accuratezza del 92,95%, dimostrandosi una valida alternativa in ragione di costi, tempi operatori e invasività per il paziente.



Vasi sottomucosi con epitelio non colorato



A) architettura cellulare uniforme, con nuclei rotondeggianti e di forma uniforme e regolare ed un rapporto nucleo/citoplasma normale- ingrandimento x60 B) nuclei allungati e alterazione del rapporto nucleo/citoplasma in una mucosa infiammata-ingrandimento x 150
 c) quadro cellulare meno uniforme con forme irregolari, ma con una omogeneità cellulare ancora riconoscibile, indicativo di displasia- ingrandimento x150 D) completa assenza di omogeneità cellulare, non è possibile osservare i margini delle cellule rapporto nucleo/citoplasma alterato, incremento del numero di mitosi indicativo di carcinoma

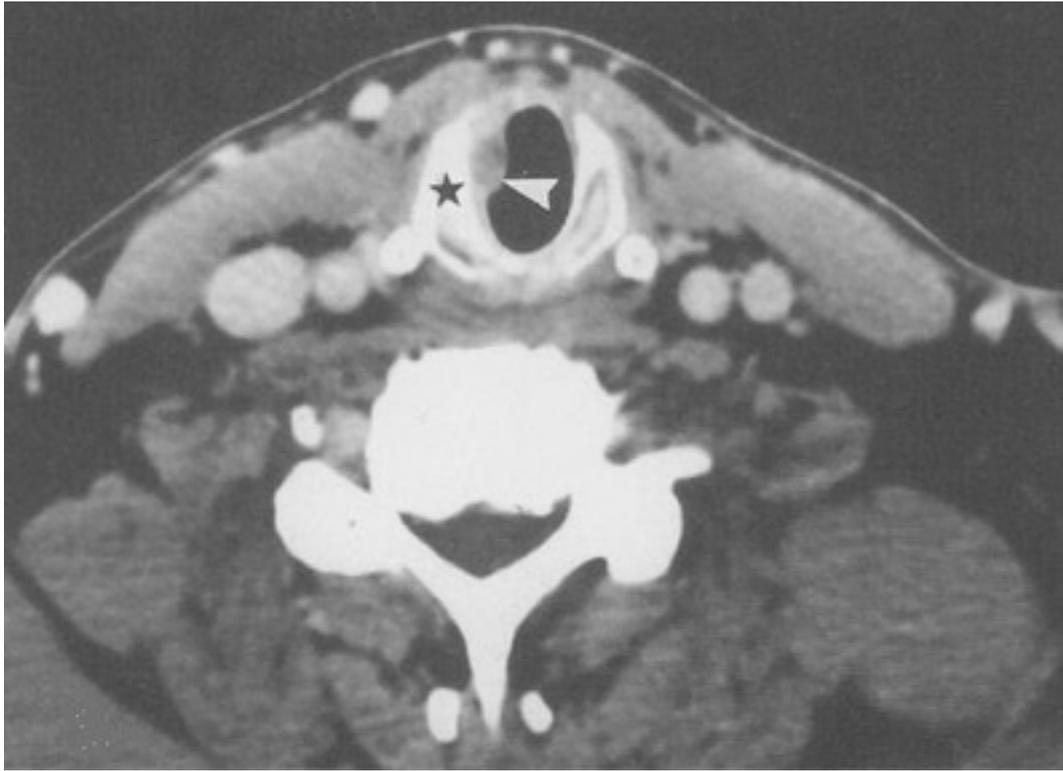
5.2 Tomografia Assiale computerizzata

Nella valutazione diagnostica delle problematiche neoplastiche della laringe la Tomografia Assiale Computerizzata gioca, rispetto all'esame clinico, un ruolo complementare in fase stadiativa e di follow-up: essa permette di determinare l'estensione sottomucosa del tumore, compresa l'eventuale invasione delle strutture adiacenti, la presenza di metastasi linfonodali o sistemiche, tumori sincroni o persistenza/recidiva di malattia [91]. La TC è la principale metodica di imaging utilizzata per la stadiazione delle neoplasie laringee: il dato è giustificato dalla maggiore disponibilità operativa dell'apparecchiatura TC, dall'esperienza talora limitata degli operatori in campo RM e dalla breve durata dell'esame. Si ottengono scansioni assiali, estese dall'arcata dentaria superiore fino allo stretto toracico superiore, in fase pre- e post- contrastografica, con spessore di strato di 1 mm; Il volume

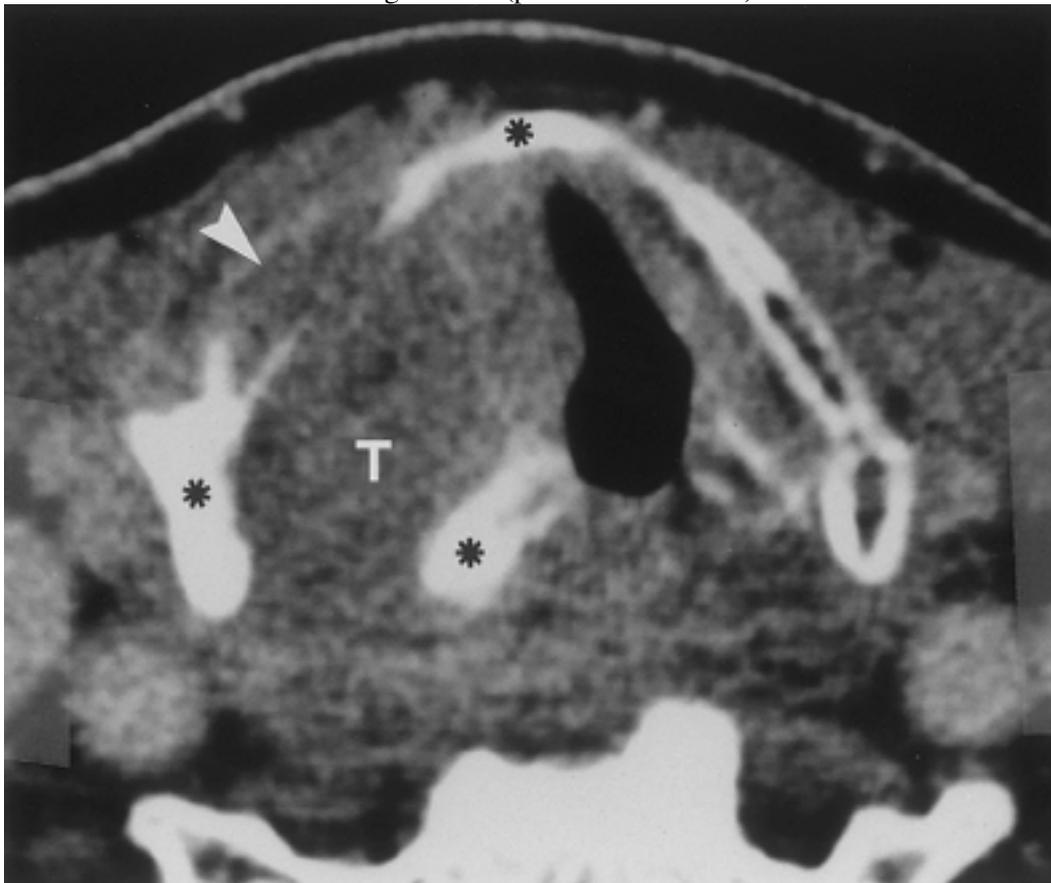
acquisito viene poi riformattato in postprocessing nei piani assiale obliquo, con orientamento parallelo alle corde vocali vere, coronale (per una miglior valutazione degli spazi paraglottici e del ventricolo laringeo) e sagittali (per meglio indagare lo spazio preepiglottico e la base linguale). Nelle Neoplasie glottiche però, nella maggior parte dei Pazienti, a causa del precoce esordio della sintomatologia, la diagnosi è effettuata in una fase iniziale, l'imaging radiologico in questo stadio gioca dunque un ruolo meno determinante perché i tumori cordali hanno frequentemente una cinetica di accrescimento superficiale e possono non essere riconoscibili in TC e RM. Inoltre, va sottolineato che le metastasi linfonodali sono rare finché il tumore è confinato all'endolaringe, e soltanto dopo il superamento della membrana crico-tiroidea la loro frequenza aumenta in modo significativo [92].

La TC in fase stadiativa svolge un ruolo chiave nella quantificazione e nella topografia della diffusione tumorale sottomucosa e della infiltrazione cartilaginea[89]. Consente un'ottima visualizzazione delle componenti ossificate delle cartilagini (elevata attenuazione dell'osso corticale, attenuazione minore nell'osso trabecolare della midollare); la componente ialina ha invece una densità simile a quella dei tessuti molli e quindi non può essere facilmente discriminata da essi, rendendo la TC meno efficiente nel individuare iniziali infiltrazioni cartilaginee e più consistente solo per tumori in stadio avanzato, che hanno ormai già compromesso la barriera condrale [93].

Particolarmente critica è l'invasione dello spazio adiposo paraglottico inferiore, che determina il passaggio allo stadio T3 controindicando la resezione laser o la cordectomia: TC a tale livello è in grado di riconoscere in maniera ottimale il tessuto adiposo, ma non lo è altrettanto nel differenziare in maniera efficace gli altri tessuti confinanti con questo spazio; si utilizza quindi una valutazione di carattere spaziale, Il cono ipoglottico, difatti nelle sezioni assiali è un ovale perfetto: un ispessimento delle parti molli a livello del margine inferiore cricoideo, ed una deformazione della silhouette dell'ovale va interpretato come estensione neoplastica fino a prova contraria(Figura sotto)



Tumore con invasione subglottica (punta di freccia) e sclerosi della cricoide (stella)



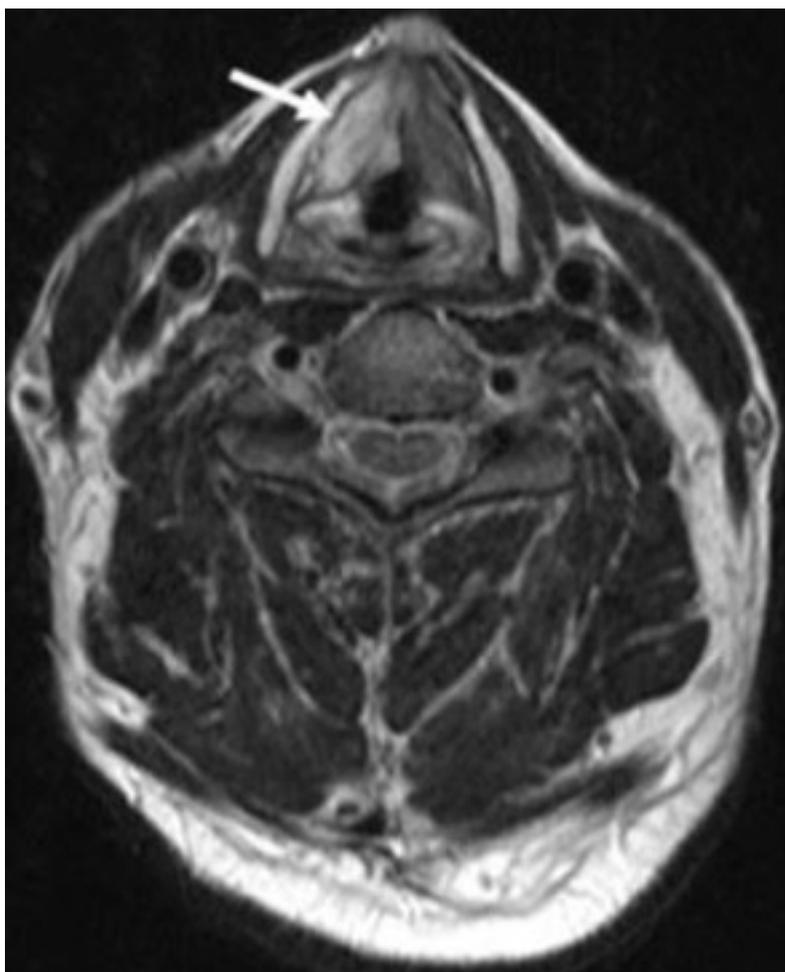
TC con mezzo di contrasto rivela una grande massa tumorale (T) che invade la cartilagine con estensione extralaringea (punta di freccia); gli asterischi indicano fenomeni di sclerosi a carico della cartilagine tiroide e aritenoide

5.3 Risonanza Magnetica

il principale limite della TC è costituito proprio dalla scarsa capacità di differenziare diversi tessuti sulla base della loro densità (attenuazione dei raggi x correlata al numero atomico degli atomi costituenti il tessuto in esame). Gli unici tessuti che possono essere caratterizzati con certezza sono rappresentati dal tessuto osseo, presente nella componente ossificata delle cartilagini, e quello adiposo degli spazi para-glottico e pre-epiglottico. L'impiego del mezzo di contrasto permette solo un'ulteriore distinzione: quella tra tessuto vascolarizzato e non-vascolarizzato [94].

La RM ha la capacità di discriminare diversi tessuti in modo molto più preciso della TC mediante l'impiego di sequenze T2 e T1 pesate; questa attitudine è potenziata dall'impiego di mezzi di contrasto paramagnetici: si direbbe pertanto che costituisca, quanto meno, la tecnica complementare alla TC. I maggiori limiti all'impiego della RM nello studio della laringe sono di natura tecnica: la risoluzione spaziale e i lunghi tempi di acquisizione. A questi ultimi consegue un'incidenza di artefatti da movimento (respiro e deglutizione) ben superiore a quella della TC, spesso con rilevante degrado della qualità delle immagini. Negli ultimi anni, grazie allo sviluppo di nuove sequenze, nuove bobine e protocolli di studio dedicati, lo studio RM della laringe è divenuto più rapido. Questo ha permesso di migliorare la risoluzione spaziale delle immagini e minimizzare la presenza di artefatti da movimento.

La RM distingue meglio della TC il segnale del grasso (iperintenso in T2 e T1) dello spazio para-glottico rispetto a quello della muscolatura intrinseca (ipointensa in T2, con densità intermedia in T1) e a quello del tessuto tumorale (generalmente iperintenso rispetto al muscolo in T2 ma costantemente ipointenso rispetto al tessuto adiposo[91]. Negli studi di Becker e Zbaren [91, 94] la sensibilità della RM nell'individuare l'infiltrazione dello spazio para-glottico è del 97% (93% quella della TC), mentre la specificità di entrambe le metodiche è piuttosto bassa: questo dato è interpretato come una sovrastima dell'estensione tumorale a causa della presenza di edema peri-lesionale e può quindi portare a falsi positivi. Stessa cosa si verifica nella definizione di un'iniziale infiltrazione cartilaginea, in cui la risonanza si è dimostrata superiore alla TC, ma gravata da falsi positivi legati alla presenza di infiammazione ed edema perilesionale [95].



5.4 Tomografia ad Emissioni Positroni (PET)

La PET-TC con 18-FDG viene utilizzata principalmente nel follow-up delle neoplasie laringee. Gli studi presenti in letteratura mostrano un'elevata sensibilità e un elevato valore predittivo negativo (92% e 89% rispettivamente). Questi dati hanno spinto gli autori a giudicare inutile l'esecuzione di biopsie profonde in pazienti con sospetto clinico di recidiva/persistenza e PET-TC negativa. I falsi negativi sono dovuti alla scarsa risoluzione spaziale della metodica.

La specificità e il valore predittivo positivo della PET-TC sono piuttosto bassi (attorno al 60%), poiché l'elevato numero di cellule immunitarie attivate, con un metabolismo glucidico incrementato, può simulare la presenza di tessuto neoplastico. In particolare la PET-TC sembra non essere in grado di differenziare la recidiva dalla radionecrosi [96].

La PET-TC è capace individuare, oltre che la persistenza o la recidiva del tumore primitivo, anche la presenza di metastasi linfonodali o di metastasi a distanza, cambiando le decisioni terapeutiche [97].

Per quanto riguarda invece il ruolo della PET nell'iter diagnostico iniziale del tumore glottico, uno studio condotto da Jeong et al. [98] ha dimostrato

che le informazioni aggiuntive fornite dalla PET, rispetto al normale iter diagnostico costituito da laringoscopia e TC, non fornivano nessuno beneficio particolare. Inoltre, l'impatto dei reperti PET sulla formulazione di una decisione clinica per il trattamento era minimi rispetto agli stessi, senza i dati PET. Alcune delle variazioni che sarebbe state prese in base alla PET avrebbero comportato un overtreatment del paziente.

5.5 Ecografia

Negli ultimi 15 anni, grandi sforzi sono stati compiuti da parte dei chirurghi testa-collo per portare nuove tecnologie ottiche dai laboratori di ricerca alla sala operatoria, il tutto per migliorare la loro capacità di identificare il margine tumorale in vivo e poter così eseguire una escissione chirurgica più precisa [99].

L'ecografia è la prima metodica di imaging solitamente usata per l'identificazione di metastasi latero-cervicali da tumori del distretto testa-collo [100, 101], ma è stato raramente utilizzato come una tecnica di imaging per l'indagine della laringe. Precedenti studi hanno riportato risultati promettenti nella diagnosi dei tumori della laringe con l'uso dell'ecografia ad alta frequenza [102-104]. Tuttavia, l'uso della stessa risulta essere ancora limitata in questo ambito.

Dal 1970, la rappresentazione B-mode è stata utilizzata con un certo successo a livello laringeo per identificare neoformazioni benigne e lesioni cistiche delle corde vocali [10, 105, 106]; è stata inoltre utilizzata anche per valutare le neoformazioni maligne, e alcuni di questi hanno dimostrato che l'ecografia potrebbe aiutare nella stadiazione del tumore laringeo avanzato [102, 107, 108].

È stato dimostrato che l'ecografia ha un ruolo simile alla TC nella visualizzazione del tumore ipofaringeo [107], quindi vale la pena indagare se ha capacità simile nella valutazione del cancro della laringe. Cartilagine tiroidea, spazio pre-epiglottico, spazio paraglottico, tiroide e tessuti molli del collo, che si trovano anteriormente o superficialmente alla laringe, sono facilmente esplorabili con una sonda ad alta frequenza. Comunemente, queste strutture danno un segnale isoecogena o iperecogena, e forniscono un contrasto ad un tumore ipoecogena infiltrante strutture extralaringee [107]. Quindi, una elevata sensibilità e specificità sono state riportate in letteratura, per l'ecografia, nella valutazione del coinvolgimento di queste strutture [108-110].

Ancor più esigui sono i lavori presenti in letteratura che utilizzano questa tecnologia per via transorale endolaringea. Kraft et al. [111] hanno stabilito i marker anatomici ecografici endolaringei (Tabella 8) al fine di consentire una corretta interpretazione e comprensione di immagini ecografiche delle sue strutture e delle sue regioni critiche come ad esempio lo spazio pre-epiglottico e paraglottico endoscopicamente.

Tabella 2: descrizione anatomica endolaringea normale eseguite su campioni sottoposti a scansione orizzontale.

Anatomical structure	Endosonographic appearance
Trachea	Horseshoe shape; inner and outer perichondrium hyperechoic; elastic cartilage hypoechoic; membranous portion and tracheal mucosa normoechoic with homogeneous echopattern
Cricoid	Closed ring, interrupted anteriorly by cricothyroid membrane in its upper part; inner and outer perichondrium hyperechoic; elastic cartilage hypoechoic; ossified cartilage normoechoic to hyperechoic; cricoidal mucosa normoechoic with homogeneous echopattern
Thyroid	Triangular shape, interrupted anteriorly by thyroid notch in its upper part; inner and outer perichondrium hyperechoic; elastic cartilage hypoechoic; ossified cartilage normoechoic to hyperechoic
Vocal fold	Paraglottic space and vocal muscle hypoechoic (directly adjacent to thyroid); vocal ligament and overlying mucosa hyperechoic (situated more medially to vocal muscle)
Ventricular fold	Connective tissue of ventricular fold and preepiglottic space hyperechoic with rough echopattern; paraglottic space and laryngeal ventricular hypoechoic; arytenoid hyperechoic
Epiglottis	Inner and outer perichondrium hyperechoic; elastic cartilage hypoechoic; epiglottic mucosa normoechoic with homogeneous echopattern

Pertanto, l'ecografia endolaringea sembra essere in grado di prevedere l'esatta estensione di un tumore della laringe, prima di effettuare un intervento chirurgico, e aiutare a trovare la migliore soluzione terapeutica per il paziente [112].

Inoltre, data la sua natura non invasiva e il minimo disturbo alla normale produzione della voce, gli ultrasuoni potrebbero essere uno strumento ideale per lo studio delle vibrazioni delle corde vocali. Tuttavia, solo pochi studi hanno usato l'imaging dinamico per indagare l'onda mucosa delle corde vocali [113, 114]. Il movimento della corda vocale, che è governato da processo meccanico descritto da Hirano [115, 116], presenta una frequenza di vibrazione (f) > 70 Hz, che è superiore al frame rate (fs) della rappresentazione B-mode dinamico (<50 Hz). In queste condizioni, non possono essere ottenute immagini in movimento dinamico in tempo reale delle vibrazioni delle corde vocali in B-mode.

In conclusione, l'endosonografia della laringe produce immagini orizzontali fatta comparabili con la tomografia assiale computerizzata (TC) o la risonanza magnetica (RM), ma con una risoluzione più alta [117]. Durante il processo di imaging, è essenziale posizionare la sonda più centralmente possibile ed evitando il contatto con la parete della laringe, permette di misurare direttamente il diametro antero-posteriore e medio-laterale della

neoplasia in esame. Il tubo orotracheale, insieme a strutture laringee quali cartilagine cricoidea e tiroidea, sono punti di riferimento anatomici utili.

Principi fisici dell'ecografia

Gli ultrasuoni sono onde meccaniche con frequenza superiore alla soglia di udibilità (20.000 Hz), che necessitano di un mezzo per propagarsi. Tali onde sono emesse da una sorgente vibrante che determina un movimento periodico delle strutture molecolari della materia, ossia una oscillazione delle particelle attorno al proprio punto di equilibrio.

Ogni vibrazione è composta da cicli di rarefazione e compressione delle particelle, rappresentabili graficamente come onde sinusoidali. Come tali esse quindi sono dotate di ampiezza, frequenza, lunghezza d'onda ed intensità.

L'**ampiezza** è la pressione massima raggiunta dal suono nel mezzo durante la fase di compressione, ossia la forza necessaria a spostare le particelle dalla loro posizione di equilibrio.

La **frequenza** di un'onda meccanica può essere definita come il numero di cicli di compressione e rarefazione che si ripetono nell'unità di tempo ossia il secondo. Essa dipende dalla frequenza con cui vibra la sorgente e si misura in Hertz o cicli/secondo. Gli ultrasuoni usati in ambito diagnostico hanno una frequenza che è compresa tra 2,5 e 20 MHz. Le frequenze e le energie impiegate nella diagnostica ecografica non comportano in pratica nessun rischio né per il paziente né per l'operatore.

La **lunghezza d'onda** è invece la distanza tra punti corrispondenti di due onde meccaniche consecutive. Lunghezza d'onda e frequenza sono due grandezze inversamente proporzionali: maggiore è la frequenza, minore sarà la lunghezza d'onda e viceversa. La frequenza della sonda utilizzata condiziona la risoluzione spaziale, ossia la capacità dell'ecografo di percepire come entità separate due o più strutture ravvicinate e quindi la qualità dell'immagine ecografica. Sonde ad elevata frequenza producono onde con una bassa lunghezza d'onda che non riescono a raggiungere gli strati più profondi e quindi sono più utili per studiare strutture anatomiche superficiali, mentre le sonde a frequenza più bassa svolgono meglio questa funzione.

La **velocità** con cui queste onde si propagano dipende dalle caratteristiche chimico-fisiche del mezzo attraversato e dal suo specifico grado di impedenza acustica, ossia l'entità della forza che si oppone alla trasmissione

degli US. Nella gran parte dei tessuti biologici la velocità di propagazione oscilla di poco intorno ad un valore medio, ma varia sensibilmente nel tessuto adiposo e nell'osso.

L'**intensità** del fascio di US può essere definito come energia per unità di superficie espressa in mW/cm^2 . Quando il fascio di ultrasuoni incide su una superficie definita interfaccia, ossia una zona intermedia, posta tra due tessuti con differente impedenza acustica, una parte dell'energia che lo costituisce viene riflessa, generando un'onda di ritorno con caratteristiche differenti a seconda dell'entità della differenza di impedenza stessa tra i tessuti.

La **sonda ecografica** è costituita da un trasduttore piezoelettrico, un materiale in grado sia di generare un impulso elettrico se sottoposto ad una sollecitazione meccanica, sia di generare un'onda meccanica quando sollecitato da una differenza di potenziale. Il trasduttore funziona pertanto sia da generatore che da rilevatore di US. Le onde ultrasonore generate dalla sonda sono soggette a fenomeni di rifrazione diffusione e riflessione. La quota del fascio US che viene riflessa dalle particelle torna alla sonda con una velocità differente rispetto a quella del fascio incidente, in base alle caratteristiche chimico-fisiche e all'entità dell'impedenza acustica del mezzo attraversato, inducendo la vibrazione dei cristalli piezoelettrici. Tale vibrazione a sua volta produce una serie di impulsi elettrici, che vengono tradotti nell'immagine che possiamo visualizzare sul monitor in scala di grigi. Nella sonda quindi si alternano continuamente una fase di generazione di US e di rilevazione di echi di ritorno dai vari tessuti. La scansione ultrasonora avviene attraverso un'emissione sequenziale di un insieme di linee affiancate, ciò permette di produrre un'immagine bidimensionale. Questo fenomeno avviene rapidamente, formando da 5 a 40 immagini complete al secondo che vengono percepite dall'occhio umano come un'unica immagine in tempo reale [118-121].

6 LA TERAPIA

La terapia delle neoplasie delle corde vocali si può avvalere di diverse metodiche, sono difatti a disposizione dell'otorinolaringoiatra, interventi laser endoscopici, chirurgia classica, radioterapia e chemioterapia. Ognuna di queste si pone come obiettivo, innanzi tutto, la radicalità oncologica, e successivamente la preservazione, per quanto possa essere possibile, delle funzioni sfinterica, respiratoria e fonatoria.

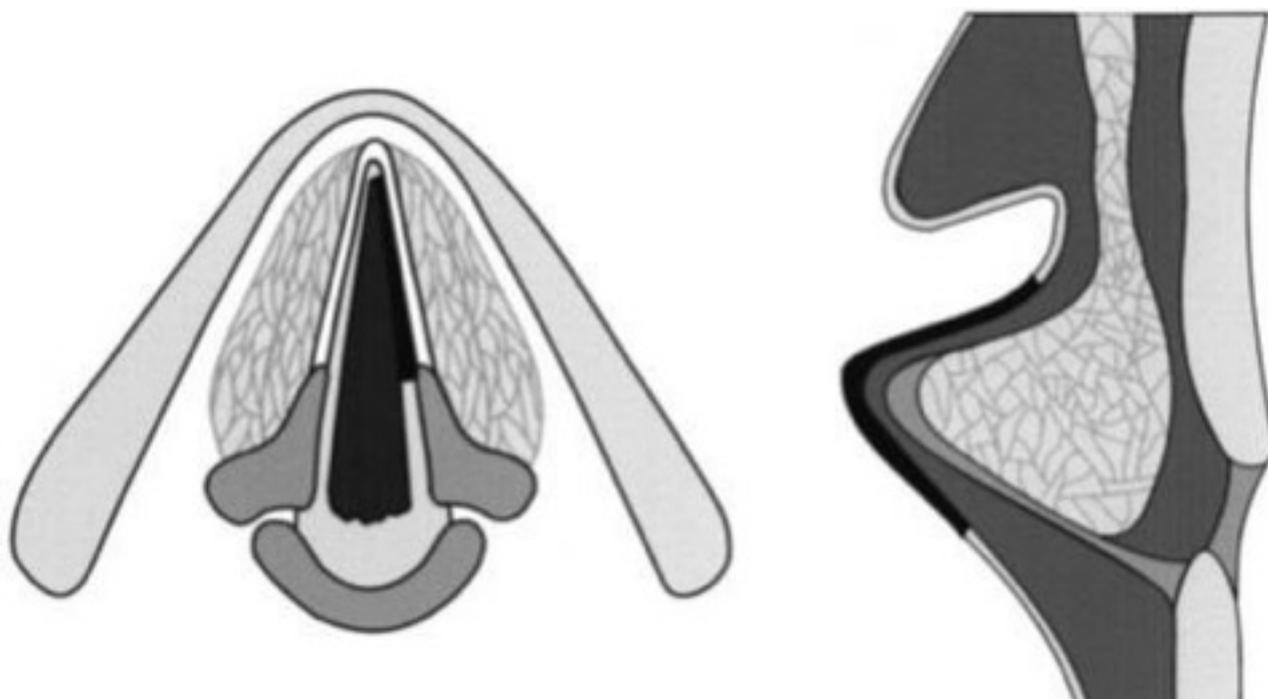
6.1 Chirurgia laser endoscopica trans orale: le cordectomie

Questa tecnica rivoluzionaria iniziò a svilupparsi e prendere piede tra gli anni '80 e '90 scalzando la chirurgia tradizionale come prima metodica per tumori in stadio precoce. Essa viene eseguita durante microlaringoscopia in sospensione, la capacità del laringoscopio di esporre correttamente la le corde vocali determina la dimensione del tumore che può essere gestita con una resezione in blocco; esiste poi la possibilità di rivolgersi ad una resezione di tipo frammentato, nel caso in cui si debba rimuovere tumori più grandi, mantenendo comunque la sicurezza oncologica, e in seconda battuta rivalutare i margini di resezione, soprattutto quelli profondi, consentendo quindi di ampliarli nel caso la neoplasia sia più profonda [122].

Tipi di cordectomie secondo l'ELS [123]

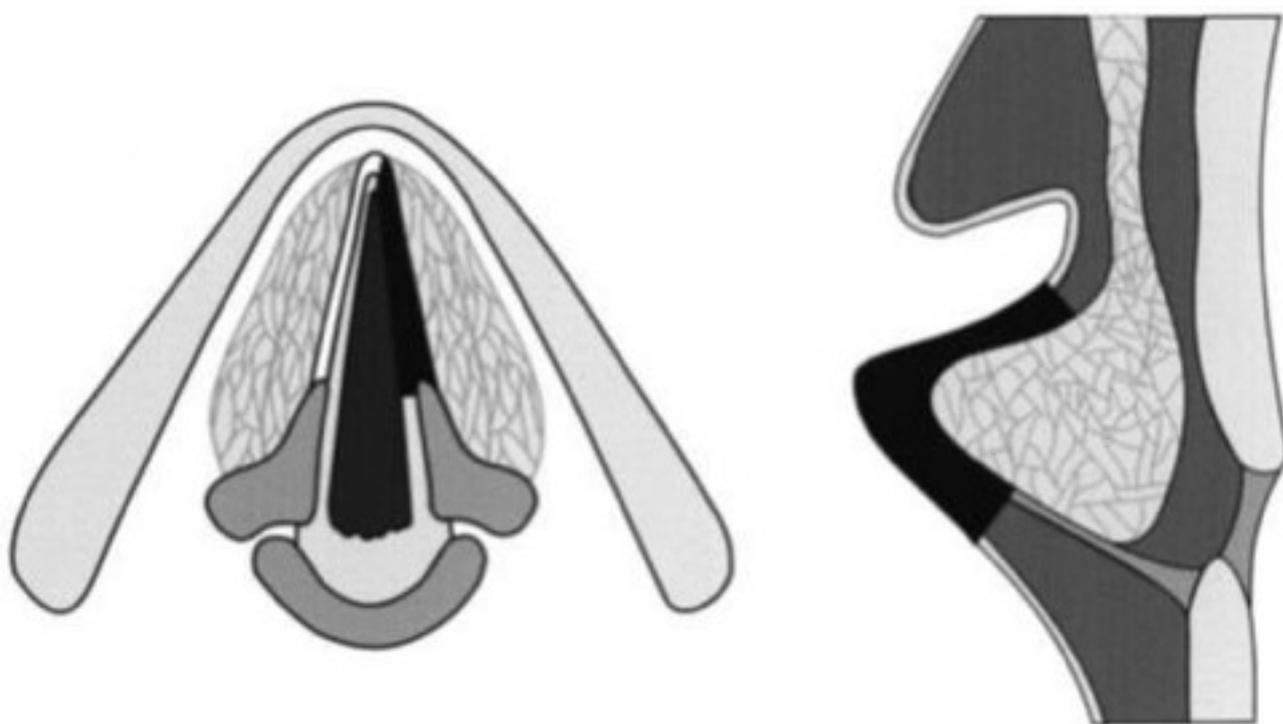
Cordectomia di tipo I (sub epiteliale)

E' la resezione dell'epitelio cordale passando attraverso la porzione superficiale della lamina propria. Questa procedura risparmia il legamento vocale. Viene eseguita in caso di lesioni sospette. Poiché l'intero epitelio è generalmente affetto da lesioni con vario grado di severità risulta necessario rimuoverlo tutto al fine di evitare di lasciare in sede porzioni displastiche o addirittura carcinomatose. Dato che questa cordectomia consente una valutazione istopatologica completa di tutto l'epitelio, viene generalmente utilizzata a scopo diagnostico; si può considerare terapeutica solo nell'eventualità che il referto bioptico confermi una iperplasia, una displasia o un carcinoma *in situ* senza segni di micro invasione.



Corpectomia tipo 2 (subligamentosa)

Viene rimosso l'epitelio, lo spazio di Reinke ed il legamento vocale, praticando una sezione tra legamento e muscolo vocale cercando di preservarlo il più possibile. La resezione si può estendere dal processo vocale alla commissura anteriore. A livello diagnostico questa procedura è indicata per casi di leucoplachia severa quando la lesione mostra segni clinici di trasformazione neoplastica e l'indagine stroboscopica evidenzia delle aree di "silenzio vibratorio" e di infiltrazione profonda; quando palpate queste lesioni risultano inspessiti e difficilmente o per nulla clivabili dai piani sottostanti. Si considera terapeutica nei casi di carcinoma microinvasivo (infiltrazione <3mm) e nei casi di carcinoma *in situ* severo con possibile micro invasione.



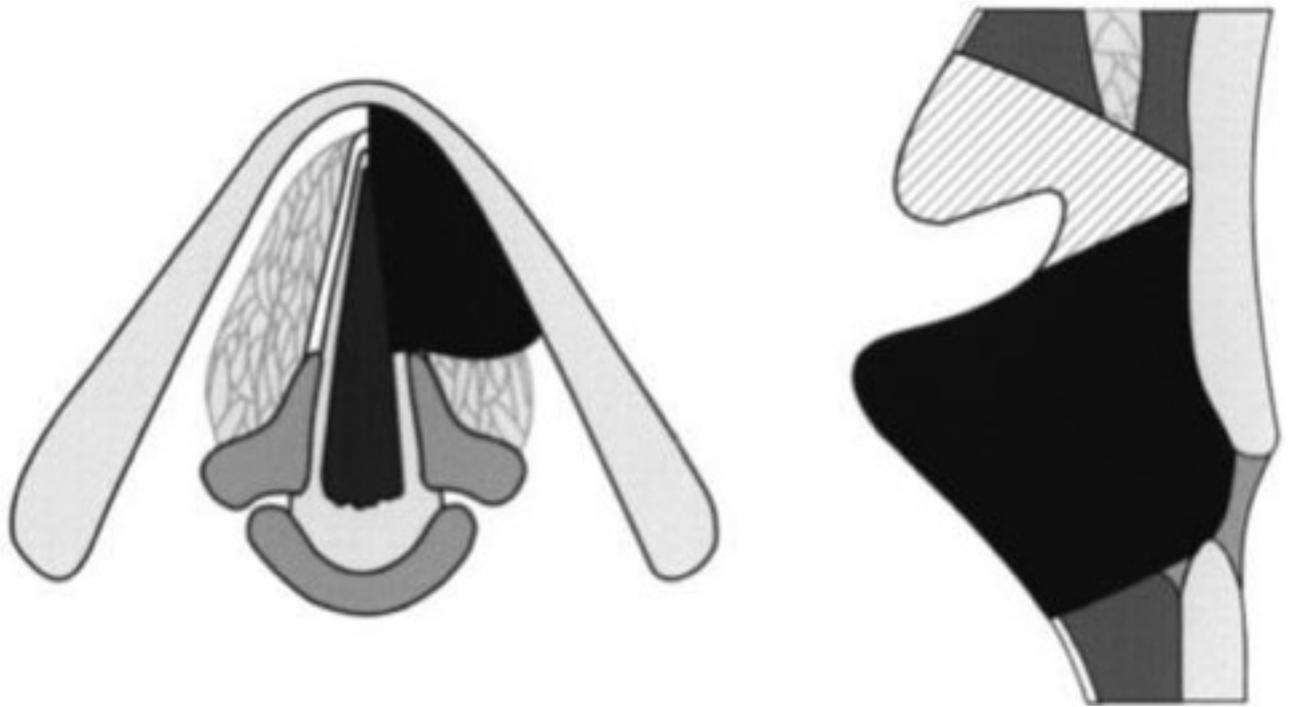
Corpectomia di tipo 3 (trans muscolare)

Si esegue un taglio attraverso il muscolo vocale. La resezione comprende epitelio, lamina propria e parte del muscolo, potendosi estendere dal processo vocale a la commissura anteriore. Allo scopo di esporre meglio la corda interessata può essere necessario rimuovere la falsa corda. A livello terapeutico, la corpectomia di tipo 3 è indicata per piccoli tumori superficiali della corda vocale mobile, o quando la neoformazione raggiunga il muscolo senza infiltrarlo profondamente.



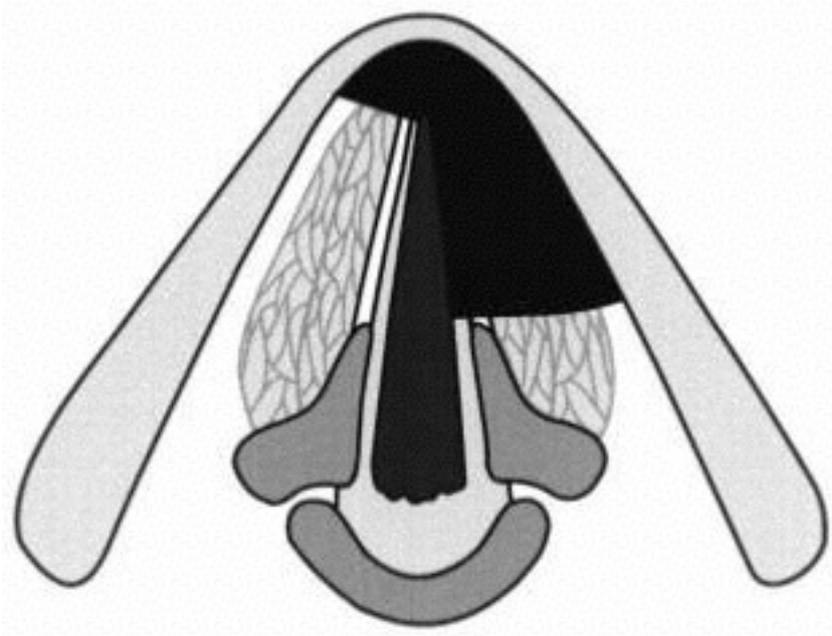
Corpectomia di tipo 4 o totale (completa)

Si estende dal processo vocale alla commissura anteriore, la profondità dell'exeresi raggiunge il pericondrio interno dell'ala tiroidea; a volte viene incluso nei margini anche il pericondrio. Anteriormente l'incisione deve essere eseguita a livello della commissura anteriore. È importante che la connessione del legamento vocale alla cartilagine tiroide venga sezionato. La corpectomia totale è indicata nei casi di carcinoma T1a dove il cancro infiltra la corda profondamente ed è diagnosticato prima della chirurgia. Questa procedura non è concepita come diagnostica, ma esclusivamente curativa.



Cordectomie estesa di tipo Va comprendente parte della corda controlaterale

La resezione include la commissura anteriore e la corda controlaterale a seconda dell'estensione della neoformazione, finanche a rimuoverle entrambe. La resezione deve continuare lungo la cartilagine all'altezza della commissura anteriore, rimuovendo per tanto anche il legamento di Broyle, per fare ciò è necessario iniziare l'incisione sopra il piano glottico, alla base dell'inserzione dell'epiglottide, a volte si rende necessario rimuovere il petiolo per garantire una visualizzazione sufficiente. Secondo alcuni autori [124], un tumore T1b che coinvolga la commissura può essere aggredibile con questa procedura. In questo caso la resezione dovrà includere la mucosa sottoglottica e la membrana cricotiroidea, data la tendenza dei carcinomi di questa regione a diffondere attraverso i vasi linfatici della regione sotto glottica.



Corpectomia estesa tipo Vb comprendente l'aritenoid

Questa procedura è indicata per neoplasie che si siano diffuse posteriormente aggredendo il processo vocale, ma risparmiando l'aritenoid, quest'ultima deve essere mobile. La cartilagine viene interamente o parzialmente rimossa, preservando la mucosa posteriore dell'aritenoid. Secondo alcuni autori la corda vocale deve essere completamente mobile [125]; altri ritengono che la mobilità della corda vocale possa essere compromessa fin tanto che l'aritenoid si mantenga mobile e la fissità sia legata solo alla compromissione del muscolo vocale.



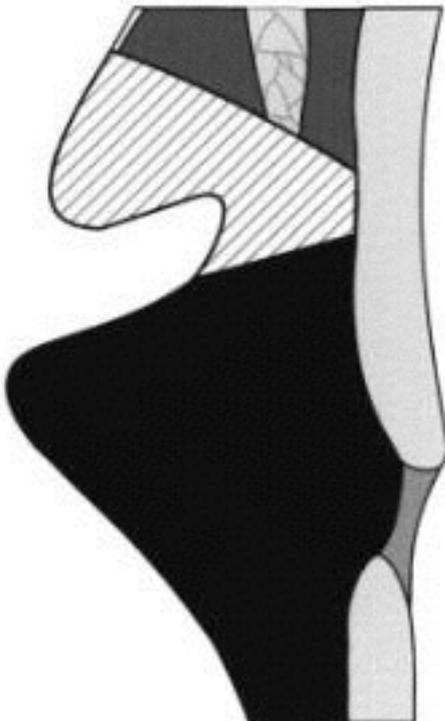
Corpectomia estesa tipo Vc comprendente la falsa corda

Questa procedura è indicata per tumori a carico del ventricolo di Morgagni o per tumori transglottici a partenza dalle corde vocali



Cordectomia estesa tipo Vd comprendente la sottoglottide

Quando necessario la resezione può essere continuata inferiormente fino ad 1 cm sotto la glottide in modo da esporre la cartilagine cricoidea.

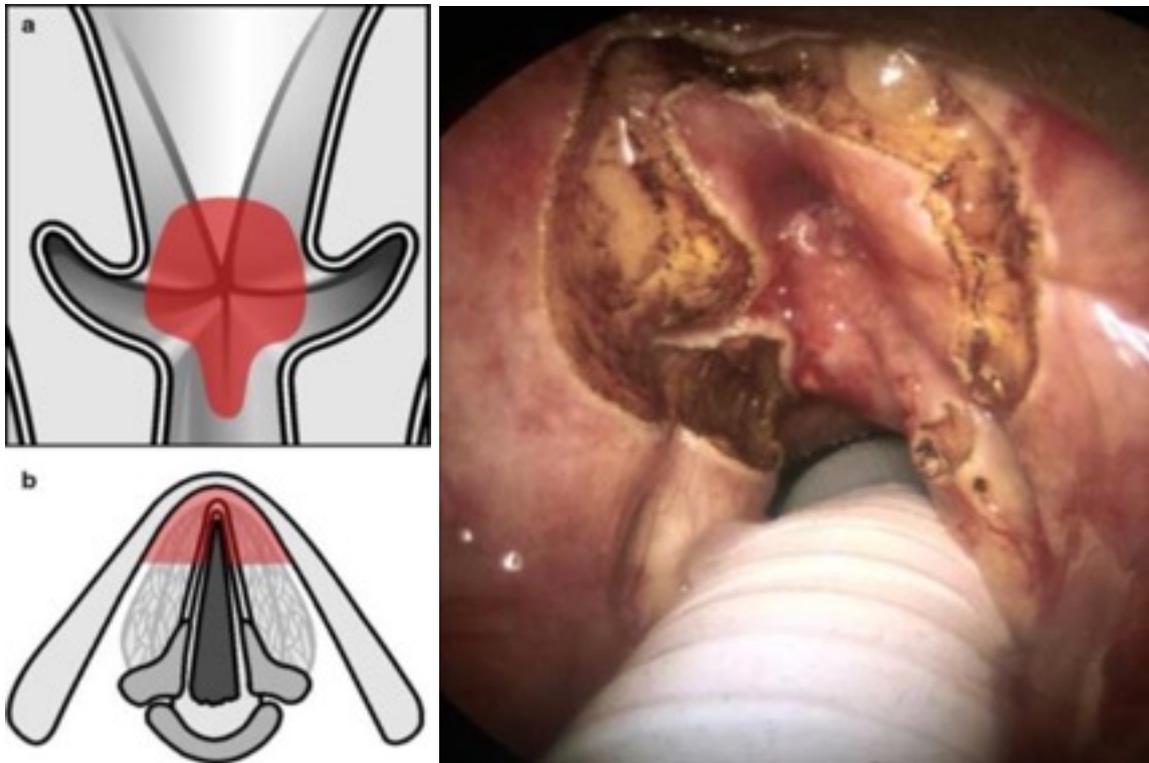


In casi selezionati le cordectomie estese possono essere utilizzate per selezionati T2 glottici.

Corpectomia tipo VI

A seguito della redazione della classificazione delle corpectomie laser endoscopiche da parte della ELS nel 2000 ci si rese conto che questa non forniva nessuna precisa indicazione chirurgica per tumori ad origine dalla commissura anteriore [14]. Questa particolare sotto sede glottica era quella che creava maggiori perplessità per quanto concerneva la difficoltà tecnica per via di una difficile esposizione alla microlaringoscopia in sospensione, ed era inoltre stata riconosciuta come l'area che più delle altre era a rischio di sviluppare recidive locali [126]. Al fine di aiutare gli operatori meno esperti, fornendo loro una tecnica standardizzata e per favorire una uniformità nelle pubblicazioni e consentire di confrontare i risultati ottenuti nel post operatorio, nel 2007 venne introdotta questa nuova tecnica di resezione.

La procedura è una commissuroectomia con corpectomia bilaterale anteriore. Se il tumore è in stretto contatto con la cartilagine, l'exeresi può comprendere l'angolo anteriore della cartilagine cricoide. I margini della resezione devono permettere di rimuovere il legamento di Broyle, anche sacrificando il petiolo dell'epiglottide se necessario, caudalmente possiamo includere la mucosa sottoglottica e la membrana cricotiroidea.



6.2 Le laringectomie orrizzontali

Il sistema delle laringectomie orrizzontali si propone come strumento chirurgico flessibile, sulla base della stadiazione del T e dell'N, con l'intento di raggiungere la completa radicalità oncologica e salvaguardare il maggior numero possibile di strutture laringee indenni da neoplasia.

Come concetto generale la condizione funzionale limite è rappresentata dalla preservazione di un'unità cricoaritenoidica (aritenoidica, emicastaone cricoideo corrispondente, nervo ricorrente). È inoltre necessario manternere il nervo laringeo superiore (almeno nella sua componente laterale) responsabile della sensibilità dell'epiglottide sopraioidea e della mucosa del seno piriforme.

I punti di forza, in termini funzionali di questo tipo di interventi sono rappresentati da:

Salvaguardia di una o due unità cricoaritenoidiche funzionanti

Preservazione della mucosa ipofaringea

Ricostruzione di un ampio imbocco del/dei seno/i piriforme/i [127]

6.3 Emi laringectomia verticale

Indicazioni: possono fruire di questo intervento giovani pazienti con coinvolgimento della commissura anteriore o con una parziale compromissione della motilità, e coloro i quali hanno fallito la terapia radiante con intento curativo per piccole lesioni glottiche. A seconda che sia necessario o meno rimuovere anche la commissura anteriore possiamo riferirci a questo intervento come laringectomia parziale fronto laterale. Questo intervento non è praticabile per tumori che coinvolgano la porzione sopraglottica e lo spazio paraglottico [128].

6.4 Laringectomia totale

Con l'avvento della chirurgia ricostruttiva e della radioterapia questo intervento demolitivo, con considerevole impatto sulla vita del paziente, si è fortemente ridotto, rappresentando ora il 20% di tutti gli interventi.

Indicazioni [129]:

Lesioni laringee avanzate con estensiva distruzione cartilaginea e invasione dei tessuti extralaringei

Coinvolgimento della commissura posteriore con compromissione di entrambe le aritenoidi

Malattia submucosa diffusa circonferenziale associata con o meno a paralisi vocale bilaterale

Estensione sottoglottica della massa tumorale a coinvolgere la cartilagine cricoidea

Terapia di salvataggio dopo fallimento di laringectomia parziale o radioterapia.

Tumore ipofaringeo originatosi o che invade la l'area post cricoidea

Radionecrosi non responsiva a antibiotici e terapia iperbarica

Metastasi linfonodali massive, in questo caso bisogna accoppiare lo svuotamento radicale del collo

6.5 Radioterapia:

Gli stadi iniziali (T1-2) possono essere trattati indifferentemente con la chirurgia o con la Radioterapia, ottenendo buoni risultati oncologici e conservando la funzione. In particolare nelle forme avanzate, ove la chirurgia prevede nella maggior parte dei casi una rimozione completa della laringe, la radioterapia può pertanto rappresentare una valida alternativa. Frequente è infine l'indicazione alla RT post-operatoria dopo chirurgia demolitiva.

Note di tecnica radioterapica: [130]

Il livello di complessità richiesto per l'irradiazione dei tumori laringei è molto variabile, così le lesioni iniziali della glottide vengono trattate con due semplici campi contrapposti od obliqui, pianificati con metodica semplificata 2D o 3D. Nei tumori avanzati, con volume bersaglio molto ampio, la tecnica ottimale richiede una pianificazione più complessa ed una erogazione della dose con tecnica conformazionale o ad intensità modulata (IMRT). Quest'ultima tecnica in realtà non trova un'indicazione prioritaria nei tumori laringei, per l'assenza di organi critici strettamente contigui ai volumi bersaglio, e nella maggior parte dei casi approcci conformazionali più tradizionali (tecnica a 3 campi con elettroni, tecnica a 5 campi) consentono di ottenere distribuzioni di dose adeguate, purché siano basate su una pianificazione 3D ottimale. Le dosi prescritte sono 50-54 Gy per l'irradiazione dei volumi linfonodali a rischio, 60-66 Gy sulle aree a maggior rischio dopo chirurgia, 66-70 Gy sulla malattia macroscopica laringea e linfonodale.

6.6 Chemioterapia

Nelle ultime due decadi la chemioterapia ha assunto un ruolo importante nel trattamento dei carcinomi del distretto cervico-facciale, dapprima con modalità concomitante al trattamento RT nelle forme localmente avanzate e nei trattamenti con finalità curativa, successivamente con modalità palliativa

nelle forme metastatiche. Il suo ruolo come terapia di induzione nello schema a tre farmaci deve essere ancora definito.

7 FASE SPERIMENTALE

7.1 Introduzione

È ampiamente riconosciuto che l'integrità dell'ultrastruttura cordale sia fondamentale per una corretta trasmissione dell'onda montante sottomucosa e di conseguenza per una fonazione efficace ed efficiente. Infatti, qualsiasi meccanismo patologico (sia benigno che maligno) che vada a compromettere questa delicata micro architettura andrà a determinare una disfonia [131].

Tomografia assiale Computerizzata (TAC), Risonanza Magnetica (RMN), ed endoscopia, rappresentano gli strumenti di cui maggiormente si avvale l'otorinolaringoiatra per lo staging clinico delle patologie laringee, tutta via nessuno di questi presidi di imaging è in grado di riportare la patologia di superficie alle alterazioni microstrutturali degli strati sottostanti, anche in ragione del fatto che la maggior parte delle lesioni maligne o sospette tali, del piano glottico, vengono riscontrate in uno stadio precoce, quando lo sviluppo sub mucoso è ad un grado ben oltre le capacità di definizione sia di TC che di risonanza [132].

Perfino tecnologie più avanzate, come il Narrow Banding imaging (NBI) e la Contact endoscopy (CE), che si sono dimostrati preziosi implementi al normale esame endoscopico con luce bianca, non riescono ad andare ad indagare la corda vocale in toto con le sue componenti sub epiteliali [88, 89]. Risulta quindi evidente come la possibilità di usufruire di strumenti che permettano di valutare le condizioni e l'integrità dei vari strati che compongono la corda vocale possa costituire un grande vantaggio nella pratica clinica, in termini di pianificazione terapeutica, monitoraggio e assistenza tecnica.

Nel corso di questi ultimi anni, lo sviluppo di sonde miniaturizzate ad alta frequenza ha permesso di avere immagini ad altissima risoluzione. Questi sistemi, tipicamente operano a frequenza superiori ai 30MHZ e hanno la capacità di visualizzare tessuti *in vivo* e il flusso sanguigno con una risoluzione quasi microscopica[133].

Il prezzo da pagare per l'aumentata risoluzione è stato una perdita nella profondità della penetrazione dell'onda ultrasonografica, assegnando a queste sonde l'ispezione di aree superficiali, con impiego nel campo della dermatologia, oftalmologia e dell'imaging intravascolare.

In precedenti studi sull'utilizzo dell'ecografia e le sue possibili applicazioni in ambito clinico diagnostico, si è dimostrato che tessuti abbondanti in

collagene, appaiono iperecogeni, mentre tessuti con prevalenza di elastina, danno un segnale ipoecogeno, suggerendo che questa capacità potrebbe essere utilizzata nello studio degli strati della corda vocale, caratterizzati appunto da una proporzione variabile di questi due componenti a seconda della porzione (superficiale, media o profonda) che si va ad analizzare [134, 135].

La poca letteratura presente in questo ambito ha utilizzato sonde con una frequenza massima non superiore ai 30 MHz, altri hanno invece adoperato sonde radiali che non consentivano di ottenere immagini in sezione trasversale della corda vocale [112, 136].

Nel nostro studio abbiamo utilizzato sonde ad altissima frequenza (tra i 60 e i 90 MHz) di tipo lineare in B mode (Brightness mode, l'immagine viene costruita convertendo le onde riflesse in segnali la cui luminosità è proporzionale all'intensità dell'eco e viene convertita in scale di grigio).

L'utilizzo della metodica endoscopica, con questa particolare sonda, nell'ambito della specialità otorinolaringoiatrica, rappresenta una vera novità; andando a vedere le indicazioni all'ecografia pubblicate dalla AIUM (American institute of ultrasound in medicine) [137], per il distretto testa collo, esse sono limitate alla sola ecografia transcutanea classica, inoltre non è presente nessuna indicazione per la valutazione ecografica delle corde vocali. La laringe è infatti, sempre stata considerata un organo mal esplorabile con le normali indagini ultrasonografiche, a causa della presenza di calcificazioni a livello cartilagineo, che determinano un cono d'ombra acustico posteriore, e a causa della dispersione dell'onda sonora data dalla presenza di aria intraluminale [138]. Grazie alla sonda endoscopica è possibile superare queste difficoltà e ottenere immagini tomografiche con una definizione superiore a TC e RM [136].

L'obiettivo del nostro lavoro è stato di indagare le effettive capacità descrittive anatomiche della sonda ecografica Aloka UST 533 (Hitachi Aloka Medical America, Inc. Wallingford, CT 06492) tramite l'utilizzo di un ecografo dedicato (proSound Alpha 6, Hitachi Aloka Medical America, Inc. Wallingford, CT 06492), con il fine di individuare una costanza dei segnali ecografici delle varie componenti cordali e laringee che ci potesse consentire di definire i punti di riferimento anatomici cruciali dell'organo. Questo è il primo step di un progetto di individuazione di una nuova metodica di stadiazione intraoperatoria che possa in un futuro prossimo guidare nella corretta scelta di approcci terapeutici della patologia cordale, per un sempre più specifico trattamento delle lesioni precancerose e degli stadi iniziali dei tumori cordali.

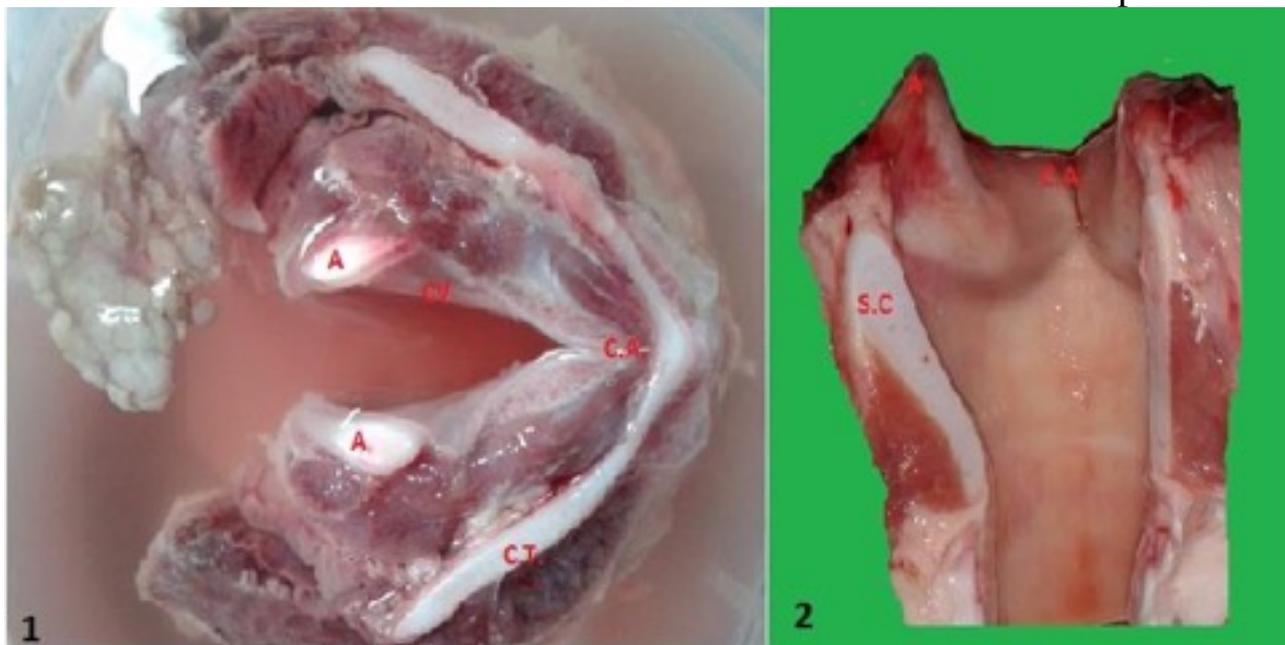
7.2 *Materiali e metodi*

Lo studio è stato condotto su campione animale *ex vivo* utilizzando una laringe di vitello sezionata a livello interaritenoidico, con taglio verticale, e appena sopra la commissura anteriore, con un taglio orizzontale, mantenendo le strutture di connessione anteriori; tre emilaringi di maiale in sezione sagittale; e una laringe umana escissa per tumore avanzato (T4a) coinvolgente la cartilagine tiroidea a tutto spessore.

Abbiamo utilizzato una minisonda di tipo lineare (fig. 6-7) con angolo di scan/ampiezza di 10 mm e con una frequenza tra i 60 e i 90Mhz di tipo Aloka UST 533 (Hitachi Aloka Medical America, Inc.Wallingford, CT 06492)

Fase preparatoria

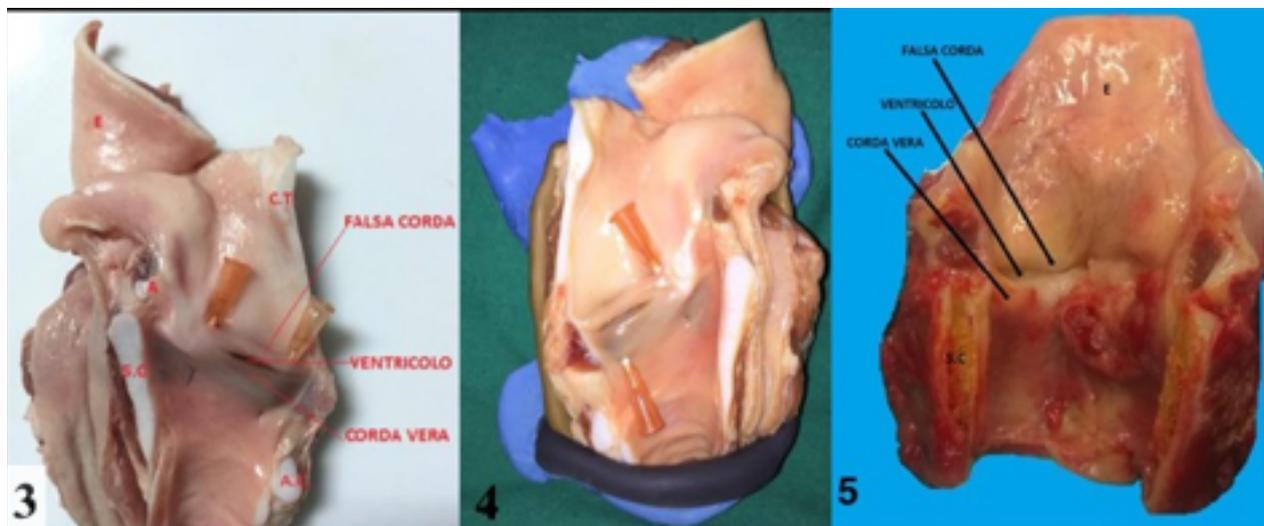
Per ogni campione abbiamo individuato le strutture macroscopiche principali, in particolare corda vocale vera, cartilagine aritenoidica, cricoide e tiroidea(fig.1-2-3-4-5); una volta appurato che l'anatomia macroscopica animale era sovrapponibile a quella umana abbiamo proceduto all'immersione e stabilizzazione del campione.



1) laringe di vitello in immersione vista dall'alto: A-cartilagini aritenoidi; CA-commissura anteriore C.T.-cartilagine tiroidea; CV corda vocale. 2) laringe di vitello vista posteriore: A-cartilagini aritenoidi; CA-commissura anteriore; S.C.- scudo cricoideo

Per la laringe di vitello, data la sua stabilità strutturale non è stato necessario integrare nessun meccanismo di fissità; le emilaringi di maiale sono state invece assicurate ad una impalcatura di materiale plastico modellabile, che ne garantisce la stabilità durante il corso dell'esperimento(fig. 3-4), sono stati

inoltre inseriti due aghi, a livello dell'estremità anteriore e posteriore della corda sia come punti di repere, sia per evitare un'eccessiva distensione della corda, dovuta ad un appiattimento della naturale curvatura della laringe, data dalla cartilagine cricoide, inevitabile quando si va a compromettere con un taglio questa struttura portante.



3) Emilaringe di maiale in sezione sagittale: E-epiglottide; A) aritenoidi; CT) cartilagine tiroidea; S.C) scudo cricoideo; A.C.) anello cricoideo. 4) emilaringe con sostegno plastico che le consente di rimanere in posizione eretta. 5) laringe umana escissa per T4a della corda vocale destra.

Tutti i campioni sono stati completamente immersi in soluzione salina (fig.8) al fine di garantire la massima risoluzione ultrasonografica data dall'acqua, la quale elimina ogni dispersione del segnale ecografico.

Fase di studio anatomico

Lo studio anatomico veniva compiuto da due operatori, il primo, che manovrava la sonda ecografica, il secondo, alla gestione del monitor, si apprestava a raccogliere e immagazzinare le immagini ottenute.

La sorgente sonografica della sonda veniva orientata perpendicolarmente ad un piano orizzontale passante per la glottide, in modo da ottenere immagini tomografiche trasversali della corda; la presenza della soluzione salina, che impediva al fascio sonoro di disperdersi, ha reso possibile l'acquisizione delle immagini con tecnica in sospensione, consentendo un'ampia libertà di movimento all'operatore nella fase di ricerca delle varie costituenti della corda vocale.

Nella prima fase dello studio si è valutato la capacità della sonda di riconoscere le singole componenti ultrastrutturali della corda, andando a

interpretare i segnali eco che caratterizzavano epitelio, spazio di Reinke, lamina propria, legamento, muscolo vocale e cartilagine. Una volta acquisita una certa dimestichezza nel riconoscimento di tali strutture, ci si apprestava a identificare le varie componenti nel complesso, ottenendo immagini di 1/3 medio corda vocale, porzione posteriore con cartilagine aritenoide e processo vocale ed infine una sezione più ampia che consentisse di osservare l'intera emi-glottide dalla superficie epiteliale alla cartilagine tiroidea.

Fase di studio anatomico contrastografico

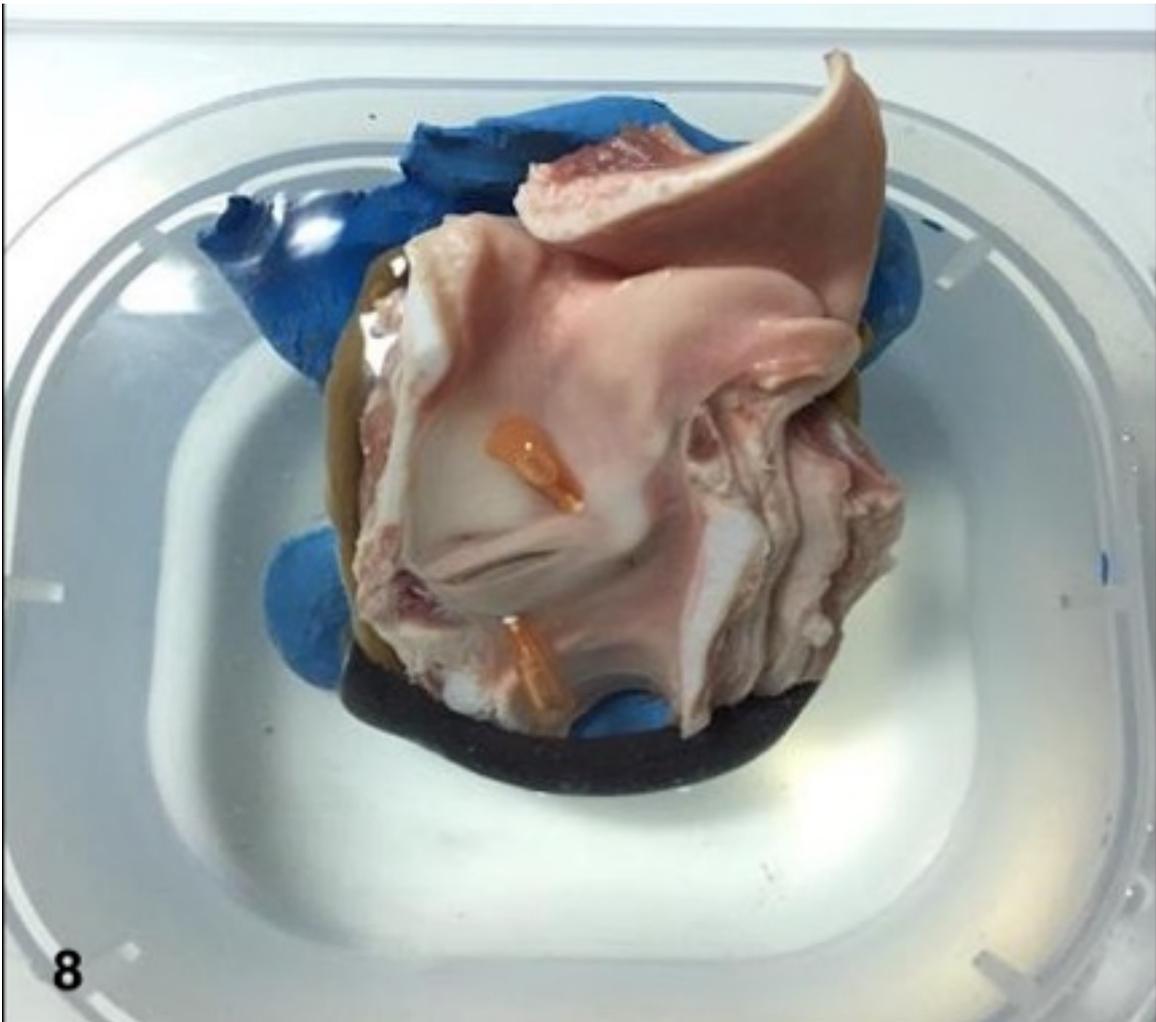
Nel corso dell'esperimento, successivamente alla fase descrittiva anatomica, veniva praticata un'iniezione sub epiteliale di soluzione salina con siringa da insulina; si sfrutta in questo modo il segnale anaecogeno dell'acqua (pertanto di colore nero), come mezzo di contrasto che si interfaccia tra l'epitelio e la lamina propria, riproducendo una tecnica, praticata in alcune strutture, di idrodissezione in corso di microlaringoscopia, al fine di valutare il grado di adesione di lesioni mucose alla sottostante lamina propria. L'operatore, sempre con tecnica in sospensione, faceva in modo che comparisse nel monitor una sezione che comprendesse sia la faccia superiore che inferiore della corda, poneva dunque l'ago con direzione parallela al fascio sonoro, in modo da visualizzarne i contorni ed eseguire un'iniezione eco-guidata.



Catetere sonda utilizzato nello studio



Particolare della testa della sonda



Campione di maiale immerso in soluzione salina

7.3 Riultati

Studio anatomico dei campioni

Sia la laringe di vitello che quella di maiale, presentavano una macrostruttura del tutto simile a quella umana, in entrambe le specie erano facilmente riconoscibili le principali strutture da noi ricercate (fig.1-2-3-4-5), necessarie ai fini di una futura comparazione interspecie.

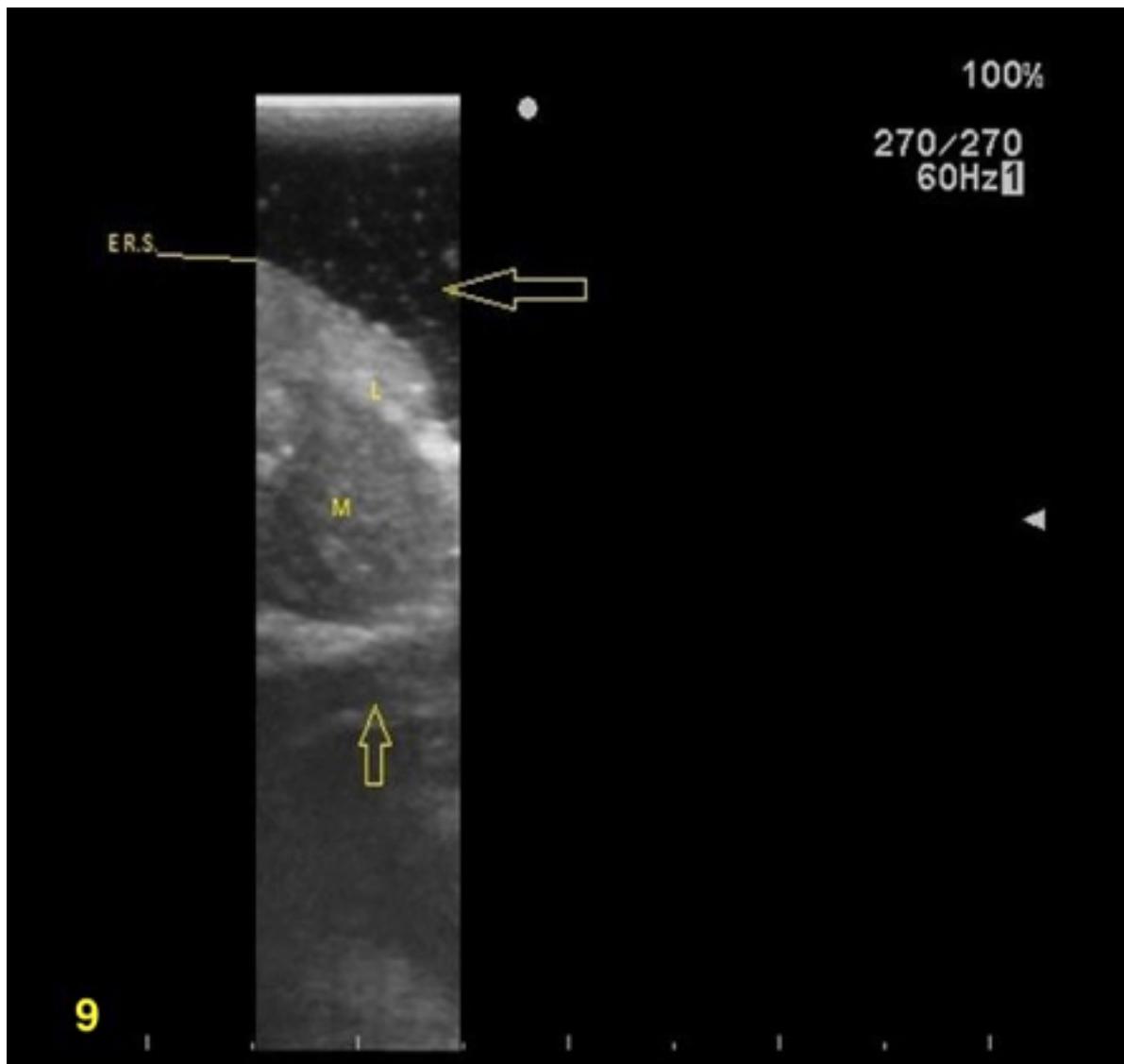
Studio anatomico ecografico dei campioni

In tutti i campioni è stato possibile riconoscere i tre strati principali della corda vocale.

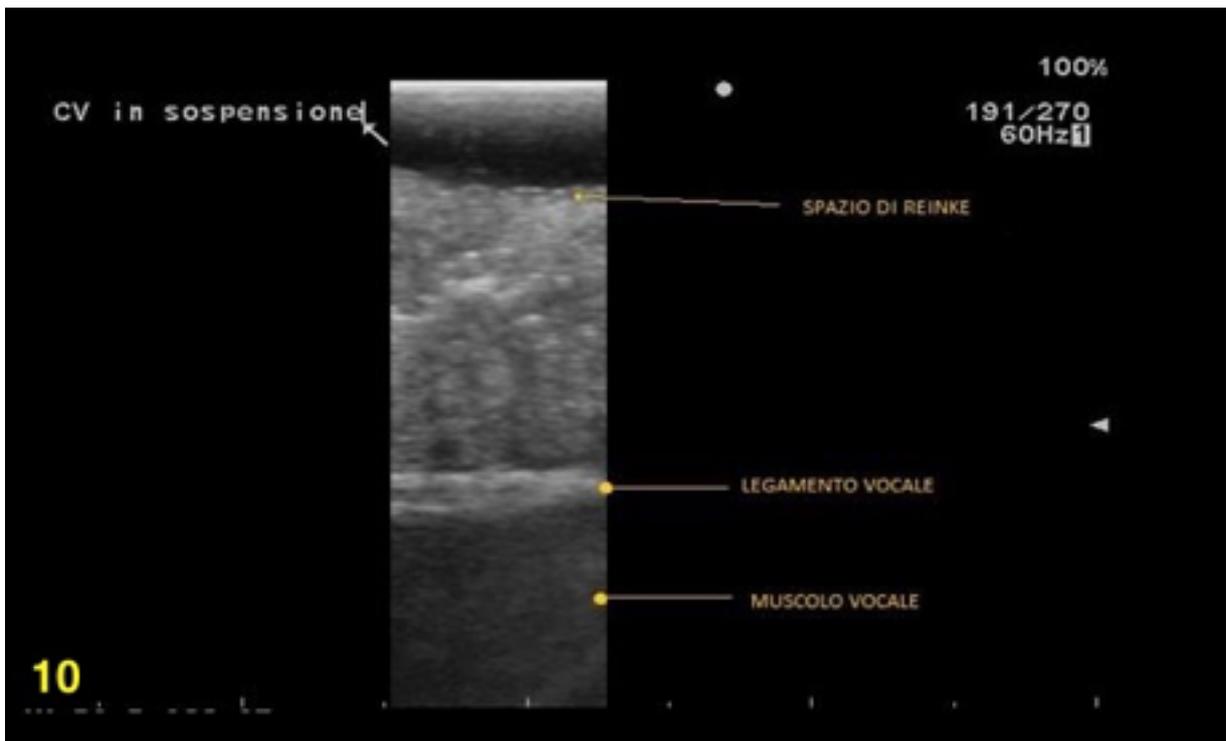
L'epitelio appare come un sottile strato iperecogeno, non sempre agevolmente distinguibile dalla sottostante lamina propria, ma in varie sezioni è possibile apprezzare una sottile linea ipo/anaecogena rappresentata dallo spazio virtuale di Reinke.

La porzione superficiale e media della lamina propria, per via della sua ricca componente in elastina presenta un aspetto diffusamente ipoecogeno, che

viene bruscamente interrotto dallo strato più profondo del legamento vocale a maggiore componente collagenica e per tanto iperecogeno, appena al di sotto è possibile apprezzare il muscolo vocale che si presenta come un'area tondeggiante meno iperecogena rispetto al legamento, caratterizzata da echi più grossolani(fig.9-10).



Visione delle corda di vitello in sospensione le frecce indicano la faccia superiore ed inferiore. (E R.S.) epitelio e spazio di Reinke, (L) legamento vocale, (M) muscolo vocale. si nota tra la sottile banda iperecogena costituita dall'epitelio una area ana/ipoecogena rappresentata dallo spazio di Reinke.



Corda di vitello in sospensione in sezione che evidenzia i tre strati

Scorrendo lungo la lunghezza della corda è stato inoltre possibile riconoscere le cartilagini aritenoidi ed il processo vocale, queste si presentavano come aree iperecogene composte da fin echi uniformi separate da una sottile banda con un segnale fortemente iperecogeno, che rappresenta il pericondrio (fig. 11-12).

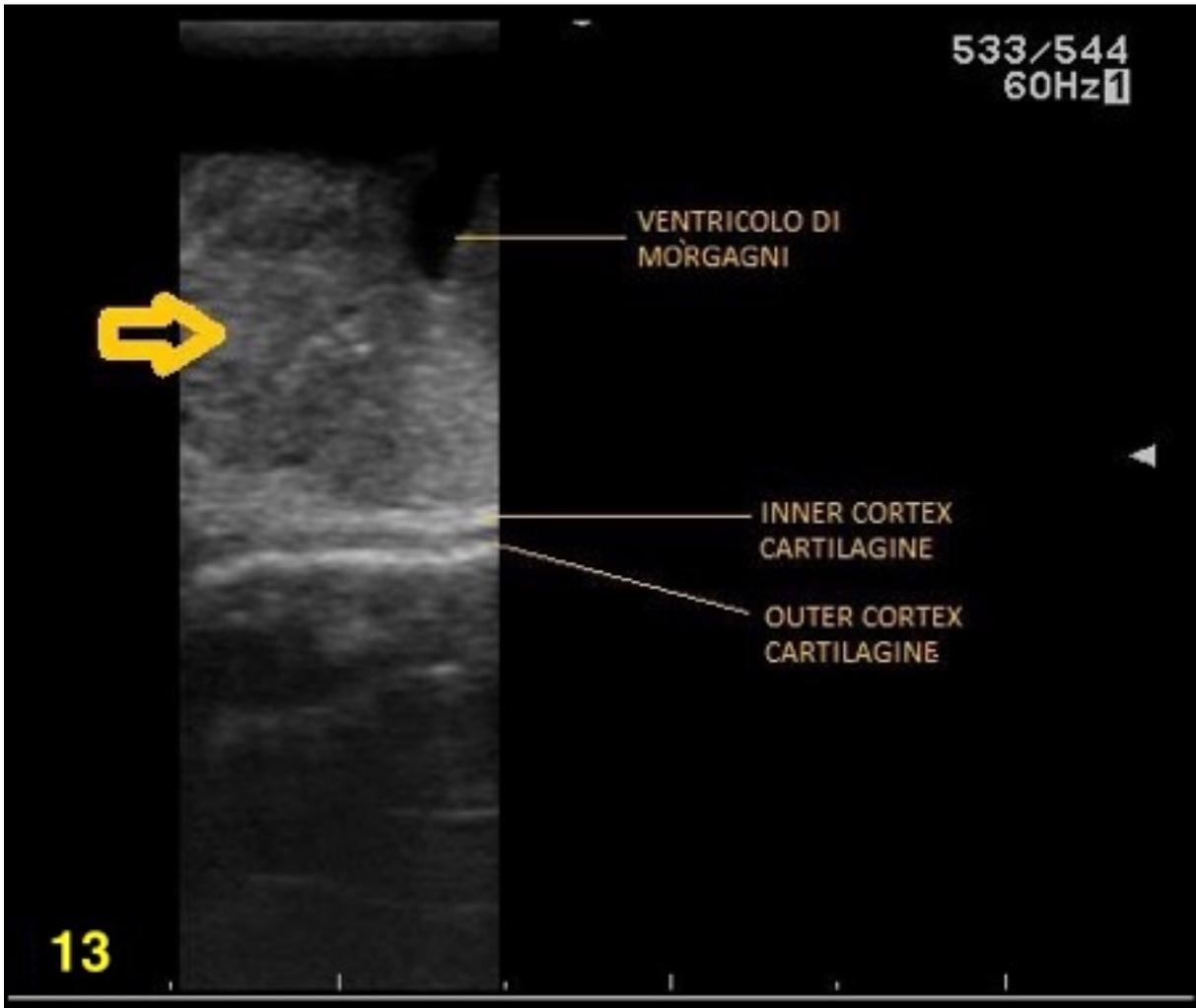


Cartilagine aritenoide di laringe di maiale



Dettaglio del processo vocale della cartilagine aritenoide

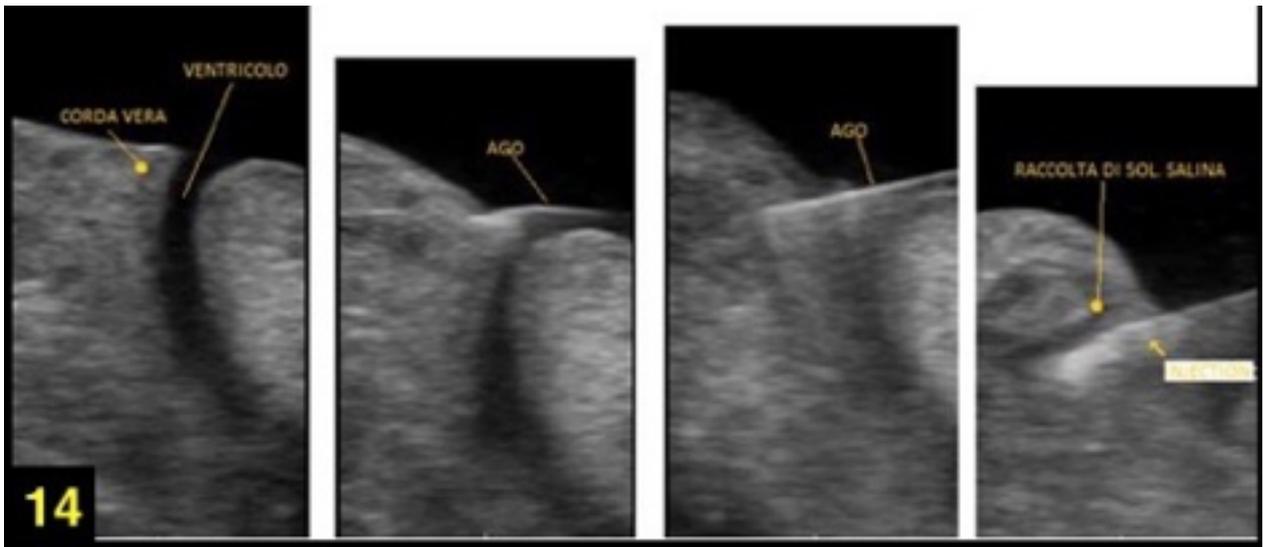
Variando il punto di fuoco della sonda si arrivava ad apprezzare la cartilagine tiroidea in cui si distinguono la cortex interna ed esterna come due linee che decorrono in parallelo con segnale iperecogeno interposte da una zona anaecogena (fig.13).



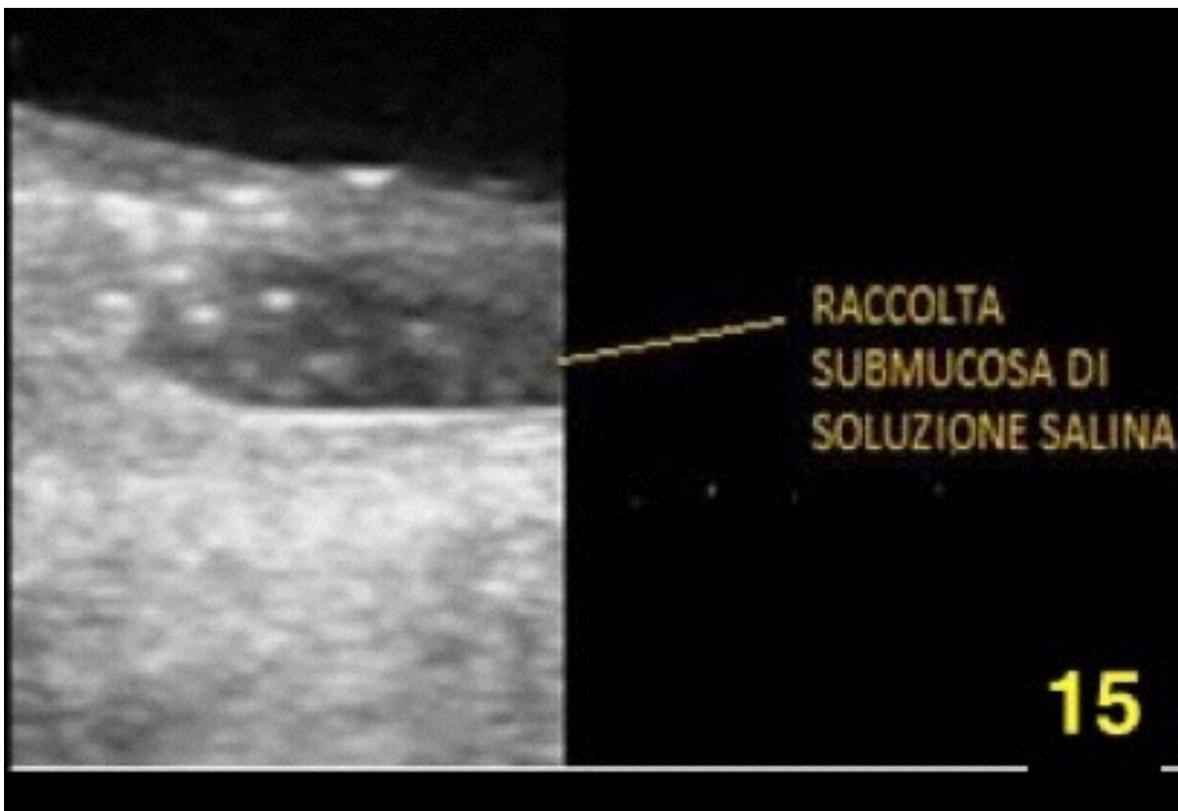
Ampia sezione di corda di maiale: la freccia indica il muscolo vocale, apprezzabile come un'area iperecogena rotondeggiante a echi grossolani

Studio anatomico contrastografico

Durante l'iniezione era possibile vedere sia l'ago che la superficie epiteliale permettendo di eseguire un'iniezione precisa, grazie poi al segnale anaecogeno dell'acqua si riusciva a creare un buon contrasto tra il soprastante epitelio e l'area di accumulo della soluzione salina (Fig.14-15).



In questa sequenza si può apprezzare il momento dell'iniezione di soluzione salina.(laringe di maiale)



Particolare di immagine post-injection (laringe di maiale)

7.4 Discussione

I nostri risultati dimostrano che la sonda ecografica ad alta frequenza è in grado di identificare elementi chiave della corda vocale. L'epitelio appare come un sottile lamina iperecogena con interposto lo spazio di Reinke dal segnale ipo/anaecogeno; la sottostante lamina propria per via della componente mista a prevalenza di elastina e collagene appare iperecogena,

con un rinforzo in prossimità del muscolo dato dall'aumento di connettivo; il muscolo si presenta come una massa rotondeggiante, lievemente meno iperecogena e composto da echi più grossolani dati dalla presenza di strutture tissutali più larghe costituite dai fasci muscolari.

Non abbiamo individuato una netta distinzione anatomico-funzionale dei tre strati della lamina propria, suddivisa in superficiale, media e profonda; questo potrebbe essere attribuito ad una riflettanza omogenea da parte dello strato misto di elastina e collagene.

La risoluzione ad alta frequenza che abbiamo ottenuto con questa sonda rappresenta un ulteriore miglioramento nel sistema di acquisizione di immagini della anatomia laringea e delle sue possibili alterazioni patologiche. E' noto infatti come i comuni sistemi diagnostici e di stadiazione della patologia laringea si affidino a strumenti quali la Tomografia Assiale Computerizzata (TAC) e la Risonanza Magnetica (RMN) i cui limiti però sono condizionati sia dalla loro forte suscettibilità ad artefatti da protesi metalliche (in particolare la TAC) che ad artefatti da movimento legati ai tempi lunghi di acquisizione delle scansioni nel caso della RMN. Inoltre, queste tecniche di imaging presentano un ulteriore limite di specificità pari ed inferiore ai 5 mm che rende difficile l'interpretazione di segnale ai fini diagnostici di lesioni di piccole dimensioni [132].

Ai fini della creazione di un sistema di acquisizione delle immagini mini-invasivo con maggiore sensibilità e alta specificità per alterazioni di segnale indicativi per un sospetto di patologia neoplastica, Arens e coll. [138] hanno dimostrato come la tecnica di ecografia intra-laringea ad alta frequenza sia capace di identificare lesioni epiteliali infiltranti tramite l'utilizzo di sonde con frequenza tra 10 e 20 MHz. In questo caso hanno constatato che la qualità del segnale non è sufficiente per individuare in modo chiaro e tridimensionale la relazione tra l'epitelio di rivestimento e le strutture sottostanti, ma era già evidente che l'ottimizzazione della risoluzione della qualità dell'immagine fosse indispensabile al fine di identificare un chiaro rapporto delle microstrutture cordali e la lesione epiteliale, a scopo non solo diagnostico ma anche potenzialmente terapeutico per i tumori del piano glottico. Allo stato attuale, tessuto sano in eccedenza viene spesso rimosso insieme ai margini di resezione chirurgici nel trattamento dei tumori glottici di stadio iniziale (T1, T2) in quanto la profondità della lesione rimane sempre ignota, se millimetrica, date le limitazioni diagnostiche per immagini precedentemente discussi. Infatti, nonostante l'utilizzo anche di altre tecniche ancillari di studio delle lesioni cordali, quali la Narrow Band Imaging (NBI), la cui utilità trova sempre più consenso nell'aiutare a discernere lesioni precancerose da lesioni fortemente sospette per malignità,

rimane comunque ignota l'estensione tridimensionale della lesione epiteliale nell'ambito delle microstrutture del piano glottico. Nello specifico, la NBI è una tecnica endoscopia che attraverso specifiche onde di luce identifica il pattern vascolare associato alla lesione epiteliale in esame ed è in grado di aiutare non solo nella identificazione di una lesione fortemente sospetta per patologia maligna, ma anche nella distinzione dei suoi potenziali margini di resezione [88].

Un futuro sistema di valutazione endoscopico che possa eventualmente combinare la tecnica ecografica con test quali l'NBI potrebbe avere una capacità di valutare in vivo e in situ, aree multiple delle corde vocali e di tutta la mucosa laringea, e permettere una valutazione preoperatoria e intraoperatoria del paziente senza dover richiedere l'esecuzione di multiple biopsie a fini diagnostici o escissioni chirurgiche ad ampi margini di resezione. Questo avrebbe una ricaduta non solo nel migliorare la sensibilità diagnostica e dunque la stadiazione preoperatoria della malattia, ma porterebbe ad una maggiore precisione della prestazione chirurgica grazie ad una più accurata definizione dei limiti di resezione della malattia. Ciò permetterebbe un sensibile miglioramento del risultato funzionale garantendo sempre il raggiungimento dello scopo oncologico, ossia assicurando la radicalità dell'atto chirurgico.

Ad oggi, la riduzione dell'onda mucosa prodotta in fonazione e riscontrata all'esame stroboscopico è un indizio importante di sospetta infiltrazione delle microstrutture anatomiche subepiteliali quali la lamina propria e il legamento vocale, ma nella pratica chirurgica ciò non si traduce in elemento dirimente nella scelta del tipo di corpectomia da eseguire. Questo comporta che la scelta del chirurgo sia dettata da un insieme di elementi forniti dai dati ricavati dalla valutazione endoscopica e dinamica preoperatoria e dalla esplorazione laringea endoscopica intraoperatoria, a loro volta arricchite dalle informazioni date da presidi ausiliari quali NBI e tecniche ancillari come l'utilizzo della iniezione sub-epiteliale di soluzione salina, ai fini di valutare una completa idrodissezione epiteliale intraoperatoria, segno indiretto suggestivo di assenza di infiltrazione di tale microstruttura. Il tutto però è carente di una vera e propria valida valutazione tridimensionale della lesione epiteliale cordale.

Non esistono sistemi che siano capaci di valutare, in regime preoperatorio e/ o intraoperatorio, l'infiltrazione degli strati tissutali costituenti il piano glottico, né tantomeno capaci di distinguere carcinomi in situ da lesioni maligne microinvasive o infiltranti, che comunque rientrino nella categoria delle lesioni iniziali cordali (T1). Con queste prospettive, data la frequente

tendenza delle lesioni epiteliali di manifestarsi a diversi gradi di displasia in aree adiacenti [50], potremmo andare a ispezionare con l'ecografia endoscopica solo le zone che dimostrano una maggiore infiltrazione submucosa; ciò permetterebbe di definire indicazioni più precise sul tipo di cordectomia da eseguire, riducendo pertanto la percentuale di overtreatment, dovuto alla non consapevolezza della profondità della lesione [139], e di conseguenza, verrebbe limitata l'ampiezza dell'exeresi. In questa ottica, è ben noto che il risultato funzionale vocale dei pazienti operati è fortemente influenzato dal tipo di cordectomia. Pazienti che hanno subito una cordectomia di tipo II o che hanno subito solo una piccola asportazione del muscolo vocale presentano un grado di compromissione vocale, a seguito di guarigione, minimo, mentre un ulteriore allargamento comporta un discreto deterioramento vocale a causa dell'incompetenza glottica e della inevitabile perdita di sostanza [140, 141]. L'uso di tale tecnica, una volta ben codificata, ridurrebbe inoltre il numero delle richieste di valutazioni istopatologiche intraoperatoria mediante frozen section, esame comunque non scevro da errore, con percentuali che si aggirano tra il 2 e il 4% [142] per quanto riguarda la diagnosi del tipo di lesione epiteliale; così come sono evidenti i limiti della frozen section anche nella caratterizzazione di margini positivi o margini stretti (<5 mm) a seguito di exeresi, questa è risultata avere un'accuratezza generale del 71% (con una sensibilità del 34% e una specificità del 100%) [143]; data invece la rapida disponibilità e ripetibilità dell'esame ecografico, potremmo consentire al chirurgo, sia di eseguire una prima valutazione in loco dell'estensione della lesione, sia di valutare in più riprese l'eventuale radicalità dell'intervento, questo si tradurrebbe in un risparmio di tempo e costi operatori (il costo medio di una frozen section si aggira attorno ai 3000 euro di media per paziente [143]).

La scelta della modalità di scansione lineare rispetto alla metodica radiale risulta in una maggiore definizione, fatto legato alla necessità della sonda radiale di effettuare un'interpolazione (metodica che individua nuovi punti, in dato intervallo, su un piano cartesiano a partire da un insieme di punti nello stesso intervallo) delle linee di immagine radiale, il che determina inevitabilmente una perdita della risoluzione, come è possibile osservare in studi endo-ecografici utilizzando questo modello di sonda [112].

In letteratura, esistono solo poche pubblicazioni sulla ecografia endolaringea. La maggior parte di essi sono studi puramente sperimentali su campioni di cadavere [136, 144, 145]. Nel 1999, Arens et al. [112] hanno pubblicato le

prime esperienze cliniche su 38 pazienti di cui 23 tumori della laringe e 15 lesioni benigne. Due anni più tardi, Tamura et al. [146] hanno eseguito uno studio retrospettivo su 16 pazienti di cui 2 lesioni maligne e 14 benigne delle corde vocali. Entrambi gli autori usavano minisonde flessibili radiali a 360° per la scansione con una frequenza di 10 a 30 MHz.

L'interpretazione dei segnali ecografici sono fortemente influenzati quando l'istopatologia definitiva è già nota e il valore predittivo di una metodica può essere considerato rappresentativo solo se un'indagine è eseguita in modo prospettico e cieco.

A nostra conoscenza, lo studio di Kraft et al. [147] è l'unico studio clinico prospettico per valutare il valore della ecografia endolaringea rispetto a TC e RM per la stadiazione del cancro della laringe.

I due limiti principali per l'ecografia laringea sono l'ossificazione della cartilagine tiroidea e l'aria contenuta nella laringe [109]. Ma l'ecografia moderna ad alta frequenza in tempo reale ha notevolmente migliorato la risoluzione delle immagini [148].

Nonostante questi limiti, è stato dimostrato che l'ecografia raggiunge una sensibilità nella rilevazione dell'invasione cartilaginea pari al 100% [149, 150], il coinvolgimento di tale struttura rappresenta un nodo cruciale nell'outcome oncologico dei nostri pazienti.

In questo lavoro abbiamo dimostrato che la tecnica ecografica ad alta frequenza è in grado non solo di identificare i principali punti di repere anatomici laringei, ma anche di distinguere del materiale iniettato nel contesto sub-epiteliale (soluzione salina) dal tessuto circostante. Dunque, tale metodica diagnostica con uso di sonda ecografica sembra avere promettenti capacità di assistere il chirurgo nella distinzione intraoperatoria delle microstrutture anatomiche laringee dalla presenza di materiali estranei o alteranti la normale struttura anatomica. Di fatto l'ecografia endoscopica consente la possibilità di analisi e di studio con caratteristiche di tipo tridimensionale in modo mini-invasivo e in diretta, della laringe e del piano glottico in particolare, con opzioni di valutazione non solo in fase statica (intraoperatoria) ma anche dinamica (preoperatoria) che, insieme alla combinazione di informazione ottenute da altre metodiche quali la luce stroboscopica, NBI, spettrografia, potrebbe consentire un più accurato follow-up clinico dei pazienti affetti, ad esempio, da laringiti croniche con multiple aree di aspetto simil-leucoplasico la cui eventuale evoluzione potrebbe essere seguita ambulatorialmente.

In conclusione il possibile impiego di tale metodica nell'uomo *in vivo*, sulla base di questo studio preliminare su laringe animale ed umana *ex-vivo*, sembra aprire la strada ad una nuova procedura diagnostica, mini-invasiva, di basso costo e di facile applicabilità in grado di meglio caratterizzare la natura e la diffusione di lesioni laringee precancerigne e soprattutto cancerigne in particolare del piano glottico, permettendo una diagnosi accurata e guidando il chirurgo in un intervento radicale ma nel massimo rispetto delle strutture anatomiche laringee. Tale metodica rappresenta infatti uno strumento del tutto nuovo per la sua applicazione laringea, che, a ragione sembra capace di definire e suggerire il tipo di intervento più adatto per il singolo paziente, cosa al momento non programmabile sulla base di immagini routinarie, fortemente limitate da un potere di risoluzione non inferiore a 0,5 cm.

8 Bibliografia

1. Mehta, D.D. and R.E. Hillman, Voice assessment: updates on perceptual, acoustic, aerodynamic, and endoscopic imaging methods. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 2008. 16(3): p. 211-5.
2. Deliyski, D.D. and R.E. Hillman, State of the art laryngeal imaging: research and clinical implications. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 2010. 18(3): p. 147-52.
3. Alberti, P.W., The history of laryngology: a centennial celebration. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 1996. 114(3): p. 345-54.
4. Mafee MF, V.G., Becker M., *Imaging of the neck and head*, 2nd edn. 2005.
5. Uloza, V., V. Saferis, and I. Uloziene, Perceptual and acoustic assessment of voice pathology and the efficacy of endolaryngeal phonomicosurgery. *J Voice*, 2005. 19(1): p. 138-45.
6. Gallivan, K.H. and G.J. Gallivan, Bilateral mixed laryngoceles: simultaneous stroboscovideolaryngoscopy and external video examination. *J Voice*, 2002. 16(2): p. 258-66.
7. Hoorweg, J.J., et al., Reliability of interpretation of CT examination of the larynx in patients with glottic laryngeal carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2006. 135(1): p. 129-34.
8. Rumboldt, Z., et al., Imaging in head and neck cancer. *Curr Treat Options Oncol*, 2006. 7(1): p. 23-34.
9. Schade, G., C. Kothe, and R. Leuwer, [Sonography of the larynx--an alternative to laryngoscopy?]. *HNO*, 2003. 51(7): p. 585-90.
10. Rubin, J.S., et al., The potential role of ultrasound in differentiating solid and cystic swellings of the true vocal fold. *J Voice*, 2004. 18(2): p. 231-5.
11. Deliyski DD. Clinical Feasibility of High-Speed Videoendoscopy. *Perspectives on Voice and Voice Disorders* 2007;17:12–16;.
12. Doellinger, M., et al., Variability of normal vocal fold dynamics for different vocal loading in one healthy subject investigated by phonovibrograms. *J Voice*, 2009. 23(2): p. 175-81.
13. Verikas, A., et al., Advances in laryngeal imaging. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2009. 266(10): p. 1509-20.
14. Remacle, M., et al., Proposal for revision of the European Laryngological Society classification of endoscopic cordectomies. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2007. 264(5): p. 499-504.
15. De Campora E., Pagnini P., "Otorinolaringoiatria." Sez.V pp.281-320 Ed. Elsevier.
16. Andrea, M., Vasculature of the anterior commissure. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 1981. 90(1 Pt 1): p. 18-20.
17. Berkowith BKB, H.S., Moxham BJ., Anatomy of the larynx. In: Ferlito A, ed. *Diseases of the Larynx*. London: Arnold, 2000: p. 25-44.

18. Prades, J.M., et al., Descriptive anatomy of the cricoarytenoid articulation: application to articular dynamics in carcinology. *Surg Radiol Anat*, 2000. 22(5-6): p. 277-82.
19. Nguyen, M., C. Junien-Lavillauroy, and C. Faure, Anatomical intra-laryngeal anterior branch study of the recurrent (inferior) laryngeal nerve. *Surg Radiol Anat*, 1989. 11(2): p. 123-7.
20. Reidenbach, M.M., Borders and topographic relations of the cricoid area. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 1997. 254(7): p. 323-5.
21. Reidenbach, M.M., The paraglottic space and transglottic cancer: anatomical considerations. *Clin Anat*, 1996. 9(4): p. 244-51.
22. Gray, S.D., Cellular physiology of the vocal folds. *Otolaryngol Clin North Am*, 2000. 33(4): p. 679-98.
23. S.D. Gray , M.H., K. Sato, Molecular and cellular structure of vocal fold tissue.”, In Titze IR, Ed. *Vocal fold physiology: frontier in basic science*. San Diego: Singular publishing group CA, 1993: p. 1-34.
24. Noordzij, J.P. and R.H. Ossoff, Anatomy and physiology of the larynx. *Otolaryngol Clin North Am*, 2006. 39(1): p. 1-10.
25. Gray, S.D., S.S. Pignatari, and P. Harding, Morphologic ultrastructure of anchoring fibers in normal vocal fold basement membrane zone. *J Voice*, 1994. 8(1): p. 48-52.
26. Darby, I., O. Skalli, and G. Gabbiani, Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest*, 1990. 63(1): p. 21-9.
27. Pawlak, A.S., et al., Immunocytochemical study of proteoglycans in vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 1996. 105(1): p. 6-11.
28. Hammond, T.H., et al., The intermediate layer: a morphologic study of the elastin and hyaluronic acid constituents of normal human vocal folds. *J Voice*, 1997. 11(1): p. 59-66.
29. Gray, S.D., et al., Biomechanical and histologic observations of vocal fold fibrous proteins. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2000. 109(1): p. 77-85.
30. Balboni G., Anastasi G., Motta P. “Trattato di anatomia umana” IV Ed. Vol. 2nd. Cap.9 IV pp.241-256 Casa Editrice Edi-ermes.
31. Rossi G., ”trattato di otorinolaringoiatria” VI Ed. Cap. ” malattie dell’ipofaringe e laringe” Casa editrice Minerva Italica pp.491-564.
32. Alaimo E. “Otorinolaringoiatria” II Ed. Cap VI a cura di Ottaviani A. pp. 509-716.
33. Pignataro L. “trattato di otorinolaringoiatria e audiologia” IV Ed. Cap “la laringe” Edizione EdiSes pp.255-293.
34. Sataloff, R.T., Y.D. Heman-Ackah, and M.J. Hawkshaw, Clinical anatomy and physiology of the voice. *Otolaryngol Clin North Am*, 2007. 40(5): p. 909-29, v.
35. Jiang, J., E. Lin, and D.G. Hanson, Vocal fold physiology. *Otolaryngol Clin North Am*, 2000. 33(4): p. 699-718.
36. Hirano M., “Structure of the vocal fold in normal and disease states: anatomical and physical study.”, *ASHA Rep* (1981) 11:11-30.

37. Gray, S.D., et al., Vocal fold proteoglycans and their influence on biomechanics. *Laryngoscope*, 1999. 109(6): p. 845-54.
38. Gray S.D., Hirano M, Sato K, "Molecular and cellular structure of vocal fold tissue.", In Titze IR, Ed. *Vocal fold physiology: frontier in basic science*. San Diego: Singolar publishing group CA (1993) pp 1- 34.
39. Perello J., "La theorie muco-ondulatoire de la phonation." *Ann Oto Larynx* (1962) 79: 722-725.
40. Hirano M., Kakita Y., Cover body theory of vocal fold vibration., In Daniloff RG, Ed. *Speech science* San Diego: College Hill Press (1985) 1-46.
41. Hirano M.,Surgical anatmy and physiology of the vocal fold. In: Gouid WJ, Sataloff R.T., Spiegl JR, Ed. *Voice surgery*. St. Louis: Mosby-year book (1993): 135-158.
42. Titze I.R., Regulation of vocal power and efficiency by subglottal pressure and glottal width. In Fujimura O Ed. *Vocal physiology: voice production, mechanism and functions*. New York, Raven press, (1988) pp 227-237.
43. Berke, G.S., et al., The effect of air flow and medial adductory compression on vocal efficiency and glottal vibration. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 1990. 102(3): p. 212-8.
44. Shipp, T., E.T. Doherty, and P. Morrissey, Predicting vocal frequency from selected physiologic measures. *J Acoust Soc Am*, 1979. 66(3): p. 678-84.
45. Titze I.R., "A framework for the study of vocal register." *J Voice* (1990) 4:1-9.
46. Hollien, H., Peculiar case of "voiceprints". *J Acoust Soc Am*, 1974. 56(1): p. 210-3.
47. Murry, T., Subglottal pressure and airflow measures during vocal fry phonation. *J Speech Hear Res*, 1971. 14(3): p. 544-51.
48. Cohen, S.M., et al., Prevalence and causes of dysphonia in a large treatment-seeking population. *Laryngoscope*, 2012. 122(2): p. 343-8.
49. Cummings, Charles W., Flint P.W., "Benign vocal fold mucosal disorder.", *Cumming Otolaryngology- Head and Neck Surgery Philadelphia, Pa: Mosby Elsevier* (2010).
50. Ferlito, A., et al., Squamous epithelial changes of the larynx: diagnosis and therapy. *Head Neck*, 2012. 34(12): p. 1810-6.
51. Barnes L., Pee R.L., "Head and neck pathology. A text atlas of differential diagnosis. New York, NY (1990) published by Igaku Sohjin Medical Pub.
52. Friedman I., Ferlito A., "Granulomas and neoplasm of the larynx.", Edimburg, UK: Curchill Livingstone (1988) pp 111-122.
53. Ferlito, A., Carcinoma in situ of the larynx - an unsatisfactory diagnosis. *Clin Otolaryngol Allied Sci*, 1977. 2(3): p. 292.
54. Buckley, C.H., E.B. Butler, and H. Fox, Cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Pathol*, 1982. 35(1): p. 1-13.
55. Weller, M.D., et al., The risk and interval to malignancy of patients with laryngeal dysplasia; a systematic review of case series and meta-analysis. *Clin Otolaryngol*, 2010. 35(5): p. 364-72.

56. WHO-, Head and Neck tumor pathology and genetics. Edited by Barnes L., Everson J.W., Reichart P., Sidransky D.
57. Barnes L., Brandwein M., Som P.M., "Surgical pathology of the head and neck" 2nd edition Marcel Dekker Inc: New York.
58. Bryne, M., N. Jenssen, and M. Boysen, Histological grading in the deep invasive front of T1 and T2 glottic squamous cell carcinomas has high prognostic value. *Virchows Arch*, 1995. 427(3): p. 277-81.
59. Orvidas, L.J., et al., Verrucous carcinoma of the larynx: a review of 53 patients. *Head Neck*, 1998. 20(3): p. 197-203.
60. Schultz P., "Vocal fold cancer" *European Ann of Otolaryngology, Head and Neck diseases* (2010) 128:301-308.
61. Berthelet, E., et al., Sarcomatoid carcinoma of the head and neck. *Am J Surg*, 1994. 168(5): p. 455-8.
62. Stanley C.J., Ujiki G.T., Yokoo H. "Pseudocarcinoma of the larynx. Independent metastasis of carcinomatous and sarcomatous element." *Arch Otolaryngol* (1971) 94:458-465.
63. Lambert, P.R., P.H. Ward, and G. Berci, Pseudosarcoma of the larynx: a comprehensive analysis. *Arch Otolaryngol*, 1980. 106(11): p. 700-8.
64. Lefeure J.L., Pignat J.C., Chevalier D. "carcer du larynx " *Encycl Med Chirurg (Paris-France) Oto Rhino Laringologie* 20-710,A-10, (1993) p.24.
65. Chu, E.A. and Y.J. Kim, Laryngeal cancer: diagnosis and preoperative work-up. *Otolaryngol Clin North Am*, 2008. 41(4): p. 673-95, v.
66. Hansen, O., et al., Duration of symptoms: impact on outcome of radiotherapy in glottic cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2005. 61(3): p. 789-94.
67. Mehta, D.D. and R.E. Hillman, Current role of stroboscopy in laryngeal imaging. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 2012. 20(6): p. 429-36.
68. AJCC- Cancer staging manual 7th edition pp 41-52 Greene F.L., C.C.C., Fritz A.G., Ed. Springer.
69. Koch, B.B., et al., National survey of head and neck verrucous carcinoma: patterns of presentation, care, and outcome. *Cancer*, 2001. 92(1): p. 110-20.
70. Batsakis, J.G. and P. Suarez, Sarcomatoid carcinomas of the upper aerodigestive tracts. *Adv Anat Pathol*, 2000. 7(5): p. 282-93.
71. Mallofre, C., et al., Expression of cytokeratins in squamous cell carcinomas of the larynx: immunohistochemical analysis and correlation with prognostic factors. *Pathol Res Pract*, 1993. 189(3): p. 275-82.
72. Franchi, A., et al., Prediction of occult neck metastases in laryngeal carcinoma: role of proliferating cell nuclear antigen, MIB-1, and E-cadherin immunohistochemical determination. *Clin Cancer Res*, 1996. 2(10): p. 1801-8.
73. Krecicki, T., et al., Ki-67 immunostaining and prognosis in laryngeal cancer. *Clin Otolaryngol Allied Sci*, 1998. 23(6): p. 539-42.

74. Yilmaz, T., et al., Prognostic significance of vascular and perineural invasion in cancer of the larynx. *Am J Otolaryngol*, 1998. 19(2): p. 83-8.
75. Paul BC, C.S., Sridharan S, Fang Y, Amin MR, Branski RC., Diagnostic accuracy of history, laryngoscopy, and stroboscopy. *Laryngoscope*, 2013. 123: p. 215–219.
76. Ferlito A, D.C., Rinaldo A, Devaney KO., What is the earliest non-invasive malignant lesion of the larynx? *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.*, 2000. 62: p.:57–59;.
77. Zbaren, P., M. Becker, and H. Lang, Staging of laryngeal cancer: endoscopy, computed tomography and magnetic resonance versus histopathology. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 1997. 254 Suppl 1: p. S117-22.
78. Pilsbury H.R.C., K.J.A., Clinical versus histopathological staging in laryngeal cancer. *Arch Otolaryngol*, 1979. 105: p. 157-159.
79. Sataloff, R.T., J.R. Spiegel, and M.J. Hawkshaw, Stroboscovideolaryngoscopy: results and clinical value. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 1991. 100(9 Pt 1): p. 725-7.
80. Schwartz, S.R., et al., Clinical practice guideline: hoarseness (dysphonia). *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2009. 141(3 Suppl 2): p. S1-S31.
81. Djukic, V., et al., Stroboscopy in detection of laryngeal dysplasia effectiveness and limitations. *J Voice*, 2014. 28(2): p. 262 e13-262 e21.
82. Kraft, M., et al., Value of fluorescence endoscopy for the early diagnosis of laryngeal cancer and its precursor lesions. *Head Neck*, 2011. 33(7): p. 941-8.
83. Arens, C., et al., Histologic assessment of epithelial thickness in early laryngeal cancer or precursor lesions and its impact on endoscopic imaging. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2007. 264(6): p. 645-9.
84. Kennedy, J.C. and R.H. Pottier, Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*, 1992. 14(4): p. 275-92.
85. Akito Watanabe, M.T., Hitoshi Tsuje., The value of Narrow Banding imaging for early detection of laryngeal cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2009. 266: p. 1017-1023.
86. Ishiara R., I.H., Yamamoto S., A new method of diagnostic gastric intestinal metaplasia : Narrow Banding Imaging with magnifying endoscopy. *Endoscopy*, 2006. 38: p. 819-824.
87. Watanabe A., T.M., Tsuje H., Hosokawa M., The value of Narrow Banding Imaging endoscope for early detection of head and neck cancer. *Otolaryngol Head and Neck Surg*. 138: p. 446- 451.
88. Piazza, C., et al., Narrow band imaging and high definition television in the assessment of laryngeal cancer: a prospective study on 279 patients. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2010. 267(3): p. 409-14.
89. Warneke A., A.T., Leinung M., Soudah B., Contact Endoscopy for the evolution of pharyngeal and laryngeal mucosa. *The Laryngoscope*, 2009. 120: p. 253-258.
90. Cikojevic, D., I. Gluncic, and V. Pesutic-Pisac, Comparison of contact endoscopy and frozen section histopathology in the intra-operative diagnosis of laryngeal pathology. *J Laryngol Otol*, 2008. 122(8): p. 836-9.

91. Zbaren, P., M. Becker, and H. Lang, Pretherapeutic staging of laryngeal carcinoma. Clinical findings, computed tomography, and magnetic resonance imaging compared with histopathology. *Cancer*, 1996. 77(7): p. 1263-73.
92. Kuno, H., et al., Primary staging of laryngeal and hypopharyngeal cancer: CT, MR imaging and dual-energy CT. *Eur J Radiol*, 2014. 83(1): p. e23-35.
93. Barbera, L., et al., The role of computed tomography in the T classification of laryngeal carcinoma. *Cancer*, 2001. 91(2): p. 394-407.
94. Becker, M., [Diagnosis and staging of laryngeal tumors with CT and MRI]. *Radiologe*, 1998. 38(2): p. 93-100.
95. Banko, B., et al., MRI in evaluation of neoplastic invasion into preepiglottic and paraglottic space. *Auris Nasus Larynx*, 2014. 41(5): p. 471-4.
96. Hermans, R., Post-treatment imaging of head and neck cancer. *Cancer Imaging*, 2004. 4 Spec No A: p. S6-S15.
97. Perie, S., et al., Impact of FDG-PET to detect recurrence of head and neck squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2007. 137(4): p. 647-53.
98. Jeong, H.S., et al., Combined 18F-FDG PET/CT Imaging for the Initial Evaluation of Glottic Cancer. *Clin Exp Otorhinolaryngol*, 2008. 1(1): p. 35-40.
99. Hughes, O.R., et al., Optical and molecular techniques to identify tumor margins within the larynx. *Head Neck*, 2010. 32(11): p. 1544-53.
100. Chevallier P, M.P., Arens C, Raffalli C, Padovani B, Bruneton JN., Larynx and Hypopharynx. In: Bruneton JN. Applications of sonography in head and neck pathology. New York: Springer 2002;165–191;.
101. Ahuja, A.T., et al., Ultrasound of malignant cervical lymph nodes. *Cancer Imaging*, 2008. 8: p. 48-56.
102. Gritzmann, N., et al., Advanced laryngeal cancer: sonographic assessment. *Radiology*, 1989. 171(1): p. 171-5.
103. Desai, A.A., et al., Value of ultrasonography in laryngeal and laryngopharyngeal cancers. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*, 2004. 56(3): p. 191-5.
104. Kuribayashi, S., et al., Utility of sonography for evaluation of clinical T1 and T2 glottic carcinoma. *J Ultrasound Med*, 2009. 28(11): p. 1429-40.
105. Ooi, L.L., H.S. Chan, and K.C. Soo, Color Doppler imaging for vocal cord palsy. *Head Neck*, 1995. 17(1): p. 20-3.
106. Vats, A., et al., Laryngeal ultrasound to assess vocal fold paralysis in children. *J Laryngol Otol*, 2004. 118(6): p. 429-31.
107. Loveday, E.J., et al., Ultrasound imaging in laryngeal cancer: a preliminary study. *Clin Radiol*, 1994. 49(10): p. 676-82.
108. Hu, Q., et al., Staging of laryngeal carcinoma: comparison of high-frequency sonography and contrast-enhanced computed tomography. *Clin Radiol*, 2012. 67(2): p. 140-7.

109. Hu, Q., et al., Assessment of glottic squamous cell carcinoma: comparison of sonography and non-contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *J Ultrasound Med*, 2011. 30(11): p. 1467-74.
110. Xia CX, Z.Q., Zhao HX, Yan F, Li SL, Zhang SM., Usefulness of ultrasonography in assessment of laryngeal carcinoma. *Br J Radiol*, 2013. 86: p. 20130343.
111. Kraft, M., et al., Anatomical landmarks for endosonography of the larynx. *Head Neck*, 2010. 32(3): p. 326-32.
112. Arens, C. and H. Glanz, Endoscopic high-frequency ultrasound of the larynx. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 1999. 256(6): p. 316-22.
113. Hsiao, T.Y., et al., Noninvasive assessment of laryngeal phonation function using color Doppler ultrasound imaging. *Ultrasound Med Biol*, 2001. 27(8): p. 1035-40.
114. Hsiao, T.Y., et al., Elasticity of human vocal folds measured in vivo using color Doppler imaging. *Ultrasound Med Biol*, 2002. 28(9): p. 1145-52.
115. Hirano M. Phonosurgery: Basic and clinical investigations. *Otologia (Fukuoka)* 1975;21(Suppl. 1):239–262;.
116. Hirano, M., Morphological structure of the vocal cord as a vibrator and its variations. *Folia Phoniatr (Basel)*, 1974. 26(2): p. 89-94.
117. Tsai, C.G., et al., Dynamic B-mode ultrasound imaging of vocal fold vibration during phonation. *Ultrasound Med Biol*, 2009. 35(11): p. 1812-8.
118. Dubinsky T, Horii S, Odwin CS: Ultrasonic physics and instrumentation. Appleton & Lange's Review for the Ultrasound Examination. Odwin CS, Dubinsky T, Fleischer AC, Eds. Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut, 1993, p 8.
119. Hedrick WR, Hykes L, Starchman DE: Ultrasound Physics and Instrumentation. Mosby, St. Louis, 1995, chapter 1.
120. Pisani R, Liboni W. Principi fisici degli ultrasuoni. In: *Ecodoppler vascolare*. Rabbia C, De Lucchi R, Cirillo R (Eds). Edizioni Minerva Medica, Torino, 1999. 1.
121. Ermett H. Signal processing in functional and morphological ultrasound imaging. In: Bogdan U, Becker G, Sclachetzki F, (Eds): *Echoenhancers and Transcranial Duplex sonography*. Blackwell Wiss.– Verlag, Berlin (1998).
122. McWhorter, A.J. and H.T. Hoffman, Transoral laser microsurgery for laryngeal malignancies. *Curr Probl Cancer*, 2005. 29(4): p. 180-9.
123. Remacle, M., et al., Endoscopic cordectomy. A proposal for a classification by the Working Committee, European Laryngological Society. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2000. 257(4): p. 227-31.
124. Motta, G., et al., T1-T2-T3 glottic tumors: fifteen years experience with CO2 laser. *Acta Otolaryngol Suppl*, 1997. 527: p. 155-9.
125. Piquet, J.J. and D. Chevalier, [Laser and glottis excision]. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac*, 1993. 110(4): p. 227-9.

126. Eckel, H.E., Local recurrences following transoral laser surgery for early glottic carcinoma: frequency, management, and outcome. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2001. 110(1): p. 7-15.
127. Rizzotto G., "Attualità in oncologia laringea" XCVII congresso nazionale (Riccione 2010) ed. Torograf.
128. Goessler, U.R., Traditional transcutaneous approaches in head and neck surgery. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg*, 2012. 11: p. Doc06.
129. De Vincentiis M., "Linee Guida sul Cancro della Laringe"., Società di Otorinolaringologia e Chirurgia cervico-faciale.
130. Tumori della testa e del collo: algoritmi diagnostici." Linee Guida Multidisciplinari Associazione Italiana Radioterapia Oncologica (2012).
131. Zeitels, S.M. and G.B. Healy, Laryngology and phonosurgery. *N Engl J Med*, 2003. 349(9): p. 882-92.
132. Zbaren, P., M. Becker, and H. Lang, Pretherapeutic staging of hypopharyngeal carcinoma. Clinical findings, computed tomography, and magnetic resonance imaging compared with histopathologic evaluation. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 1997. 123(9): p. 908-13.
133. Cherin, E., et al., Ultrahigh frame rate retrospective ultrasound microimaging and blood flow visualization in mice in vivo. *Ultrasound Med Biol*, 2006. 32(5): p. 683-91.
134. Kobayashi, T., "Ultrasonic tissue characterization." *Medicina (B Aires)*. 1981. 18: p. 1132-1135.
135. Yokoi H, H.N., Nakama S, et al., The tissue characterization by ultrasonography in relation to the content of collagen fibers of gastric wall, skin and muscle. *J Nissei Hosp*, 1984. 12: p. 13-17.
136. Tamura, E., S. Kitahara, and N. Kohno, Intralaryngeal application of a miniaturized ultrasonic probe. *Acta Otolaryngol*, 2002. 122(1): p. 92-5.
137. A.P. Guideline "AIUM practice guidelines for the performance of ultrasound examinations of the head and neck" *J ultrasound Med.*, Vol 33, N° 2, pp.662-682, (mar 2014).
138. Kraft, M. and C. Arens, Technique of high-frequency endolaryngeal ultrasound. *J Laryngol Otol*, 2008. 122(10): p. 1109-11.
139. Colden, D., et al., Stroboscopic assessment of vocal fold keratosis and glottic cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2001. 110(4): p. 293-8.
140. Zeitels, S.M., et al., Voice and treatment outcome from phonosurgical management of early glottic cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl*, 2002. 190: p. 3-20.
141. Nunez-Batalla F., D.-M.J.P., Coca-Pelaz A., Suarez-Nieto C., voice outcome after laser cordectomy. *Journal of Laryngology and voice*, 2011. 1: p. 6-11.
142. Wenig, B.M., Intraoperative consultation (IOC) in mucosal lesions of the upper aerodigestive tract. *Head Neck Pathol*, 2008. 2(2): p. 131-44.

143. DiNardo, L.J., et al., Accuracy, utility, and cost of frozen section margins in head and neck cancer surgery. *Laryngoscope*, 2000. 110(10 Pt 1): p. 1773-6.
144. Zech M, Scheer M, Maier H, Heppt W. Endosonography of the larynx. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1994;251:480–481;.
145. Arens, C., et al., Endolaryngeal high-frequency ultrasound. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 1998. 255(5): p. 250-5.
146. Tamura, E., S. Kitahara, and N. Kohno, Clinical assessment of intralaryngeal ultrasonography. *Laryngoscope*, 2001. 111(10): p. 1767-70.
147. Kraft, M., et al., Clinical value of endosonography in the assessment of laryngeal cancer. *Head Neck*, 2013. 35(2): p. 195-200.
148. Bozzato, A., et al., [Influence of thyroid cartilage ossification in laryngeal ultrasound]. *Laryngorhinootologie*, 2007. 86(4): p. 276-81.
149. Rothberg, R., et al., Thyroid cartilage imaging with diagnostic ultrasound. Correlative studies. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 1986. 112(5): p. 503-15.
150. Erkan, M., et al., Ultrasonography in laryngeal cancers. *J Laryngol Otol*, 1993. 107(1): p. 65-8.