



Universidad de Oviedo

Programa de Doctorado en Biomedicina y Oncología  
Molecular

Instituto Universitario de Oncología del Principado de  
Asturias

# “Expresión de PD-L1 e infiltración de linfocitos CD8+ como biomarcadores para la inmunoterapia en el cáncer nasosinusal”

---

TESIS DOCTORAL

Sara Reda del Barrio  
Abril de 2021



Universidad de Oviedo

Programa de Doctorado en Biomedicina y Oncología  
Molecular

Instituto Universitario de Oncología del Principado de  
Asturias

# “Expresión de PD-L1 e infiltración de linfocitos CD8+ como biomarcadores para la inmunoterapia en el cáncer nasosinusal”

---

TESIS DOCTORAL

**Autor**

Sara Reda del Barrio

**Directores**

Dr. D. José Luis Llorente Pendás  
Dr. D. Marinus Antonius Hermsen

**Tutor**

Dr. D. César Antonio  
Álvarez Marcos



## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Expresión de PD-L1 e infiltración de linfocitos CD8+ como biomarcadores para la inmunoterapia en el cáncer nasosinusal	Inglés: PD-L1 expression and CD8+ tumour-infiltrating lymphocytes as biomarkers for immunotherapy in sinonasal cancer
2.- Autor	
Nombre: Sara Reda del Barrio	DNI/Pasaporte/NIE: .
Programa de Doctorado: Biomedicina y Oncología Molecular	
Órgano responsable: Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias	

### RESUMEN (en español)

**Introducción y Objetivos:** Los carcinomas nasosinuales son tumores infrecuentes, con mal pronóstico a pesar de los avances en la cirugía y radioterapia. El desarrollo de tratamientos alternativos, entre los cuales se incluye la inmunoterapia, podría desempeñar un papel importante en la mejora del pronóstico de estos pacientes. Los anticuerpos monoclonales anti-PD-1 Nivolumab y Pembrolizumab ya han sido aprobados para los carcinomas pulmonares de células no pequeñas (CPCNP) y los carcinomas escamosos de cabeza y cuello (CECC), entre otros tumores. La expresión tumoral de PD-L1 e infiltración de linfocitos T CD8+ han sido estudiados como posibles biomarcadores de respuesta a tratamiento, sin embargo su papel en los carcinomas nasosinuales todavía no ha sido estudiado. El objetivo de este estudio fue evaluar el grado de expresión tumoral de PD-L1 y el nivel de linfocitos T CD8+ en los adenocarcinomas nasosinuales de tipo intestinal (ITAC) y los carcinomas escamosos nasosinuales (CENS), así como su relación con los parámetros clínico-patológicos y pronósticos.

**Métodos:** La expresión tumoral de PD-L1 y el nivel de linfocitos T CD8+ fueron analizados mediante inmunohistoquímica en 57 CENS y 133 ITAC. Los resultados fueron relacionados con diversas variables clínico-patológicas y la supervivencia.

**Resultados:** En nuestra serie un 46% de los CENS y un 26% de los ITAC expresaron PD-L1 en >5% de las células tumorales, y se observaron linfocitos T CD8+ en el 88% de los CENS y en el 65% de los ITAC. Observamos una relación estadísticamente significativa entre la expresión tumoral de PD-L1 y los niveles altos de linfocitos T CD8+, tanto en los ITAC ( $p=0,000$ ) como en los CENS ( $p=0,000$ ). No observamos una relación estadísticamente significativa entre la expresión tumoral de PD-L1 y la SG y SE en ninguno de los dos tipos tumorales, y en los ITAC el nivel alto de TILs CD8+ resultó ser un factor pronóstico favorable independiente para la SG.

**Conclusiones:** Nuestros resultados nos indican que una proporción de los pacientes con CENS e ITAC se podrían beneficiar del uso de la inmunoterapia con fármacos anti-PD-1/PD-L1, ya aprobados en tumores de cabeza y cuello.



#### RESUMEN (en Inglés)

**Introduction and Objectives:** Sinonasal cancer is a rare malignancy, and despite improvements in surgery and radiotherapy, patients still have a very poor prognosis. There is a clear need for new therapeutic options, and immunotherapy could be a possible option to improve the prognosis of these patients. The anti-PD-1 monoclonal antibodies Nivolumab and Pembrolizumab have already been approved in non-small-cell lung carcinoma (NSCLC) and head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), among other tumours. PD-L1 expression and infiltrating CD8+ lymphocytes have been investigated as possible biomarkers to predict treatment response, however their possible role in sinonasal cancer has not been investigated yet. Our aim was to analyse tumour PD-L1 expression and infiltrating CD8+ lymphocytes in intestinal-type adenocarcinomas (ITAC) and sinonasal squamous cell carcinomas (SNSCC), and to correlate them to clinico-pathological characteristics and prognosis.

**Methods:** PD-L1 expression and infiltrating CD8+ lymphocytes were analysed by immunohistochemistry in 57 SNSCC and 133 ITAC. Results were then correlated to clinico-pathological characteristics and survival.

**Results:** In our series PD-L1 expression in >5% of tumour cells was observed in 46% of SNSCC and 26% of ITAC, and infiltrating CD8+ lymphocytes were detected in 88% of SNSCC and 65% of ITAC. We found a correlation between tumour PD-L1 expression and high levels of CD8+ lymphocytes in both SNSCC ( $p=0,000$ ) and ITAC ( $p=0,000$ ). No correlation was found between tumour PD-L1 expression and survival in neither types of tumours, and the presence of high levels of CD8+ lymphocytes was considered to be an independent positive prognostic factor for OS in ITAC.

**Conclusions:** Our results show that a proportion of patients with SNSCC and ITAC may benefit from anti-PD-1 immunotherapy, which has already been approved in head and neck tumours.

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO  
EN \_\_\_\_\_

## AGRADECIMIENTOS

Con esta tesis finalizo una etapa que comenzó hace 5 años cuando llegué a Oviedo para empezar la residencia. Para mi ha sido un privilegio poder realizar esta tesis y me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han hecho posible este trabajo.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis. Al Prof. José Luis Llorente Pendás, por haberme dado la oportunidad de formar parte de esta línea de investigación, por su apoyo y docencia, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como otorrinolaringóloga, y al que estaré eternamente agradecida. Al Dr. Mario Hermesen, por su ayuda en la elaboración de esta tesis y por haberme introducido en el mundo de la investigación. También quiero agradecer la colaboración de todos los miembros del grupo de Otorrinolaringología del laboratorio del ISPA e IUOPA.

A mis tutores, al Prof. César Álvarez Marcos por su orientación y paciencia, y al Dr. Fernando López, a quien considero un referente profesional, por preocuparse por mi formación y por guiarme en todo momento.

A todos mis compañeros del Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Central de Asturias, con los que he tenido la suerte de formarme, por todo lo que me han enseñado y por los buenos momentos compartidos, tanto en el hospital como fuera.

A mis amigos y a Borja, con los que he formado una segunda familia en Asturias, por haber hecho de esta etapa una experiencia que nunca olvidaré.

Por último, quiero agradecer a mi familia por estar siempre ahí. En especial, quiero hacer mención a mi abuela, fallecida hace pocos meses por Covid-19, por su apoyo y amor incondicional y por haber sido para mi un ejemplo de vida a seguir.



# INDICE

<b>1. Introducción .....</b>	<b>17</b>
<b>1.1. Presentación del problema.....</b>	<b>19</b>
<b>1.2. Tumores nasosinuales .....</b>	<b>20</b>
1.2.1. Epidemiología .....	20
1.2.2. Etiopatogenia .....	20
1.2.3. Histopatología.....	21
1.2.4. Presentación clínica .....	24
1.2.5. Diagnóstico .....	25
1.2.6. Estadificación.....	26
1.2.7. Tratamiento.....	28
1.2.8. Pronóstico .....	30
<b>1.3. Aspectos inmunológicos .....</b>	<b>31</b>
1.3.1. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune.....	31
1.3.1. Tipos de inmunoterapia .....	36
<b>1.4. El receptor PD-1 y su ligando PD-L1.....</b>	<b>38</b>
1.4.1. Caracterización y función biológica .....	38
1.4.2. PD-1 y PD-L1 en inmunoterapia .....	39
1.4.3. Utilidad clínica del análisis de PD-1/PD-L1.....	41
1.4.4. Técnicas de análisis de la expresión de PD-L1.....	42
1.4.5. PD-L1 en el cáncer nasosinusal .....	43
<b>2. Hipótesis.....</b>	<b>45</b>
<b>3. Objetivos .....</b>	<b>49</b>
<b>3.1. Objetivo general.....</b>	<b>51</b>
<b>3.2. Objetivos específicos.....</b>	<b>51</b>
<b>4. Material y Método.....</b>	<b>53</b>
<b>4.1. Pacientes estudiados .....</b>	<b>55</b>
<b>4.2. Recogida de muestras.....</b>	<b>55</b>
<b>4.3. Técnica de los “Tissue Arrays” .....</b>	<b>55</b>
4.3.1. Selección de las zonas a muestrear .....	55
4.3.2. Elaboración de la base de datos y esquema del “Tissue Array” .....	56
4.3.3. Elaboración del “Tissue Array” .....	56
4.3.4. Secciones del bloque.....	57
4.3.5. Requerimientos mínimos estándar del “Tissue Array”.....	57
<b>4.4. Análisis mediante inmunohistoquímica.....</b>	<b>57</b>
4.4.1. Interpretación de las técnicas inmunohistoquímicas .....	59
<b>4.5. Descripción de las variables.....</b>	<b>61</b>
<b>4.6. Análisis estadístico .....</b>	<b>62</b>
<b>5. Resultados .....</b>	<b>63</b>
<b>5.1. Aspectos clínico-patológicos.....</b>	<b>65</b>
5.1.1. En los ITAC .....	65
5.1.2. En los CENS .....	69
<b>5.2. Relaciones entre las variables y las características clínico-patológicas .....</b>	<b>74</b>
5.2.1. En los ITAC .....	74
5.2.2. En los CENS .....	77
<b>5.3. Valoración de la expresión inmunohistoquímica de PD-L1 .....</b>	<b>80</b>
5.3.1. En los ITAC .....	81
5.3.2. En los CENS .....	81

<b>5.4. Valoración de la presencia de linfocitos CD8+ en el microambiente tumoral.....</b>	<b>82</b>
5.4.1. En los ITAC .....	82
5.4.2. En los CENS .....	83
<b>5.5. Significado clínico-patológico de la expresión de PD-L1 .....</b>	<b>83</b>
5.5.1. En los ITAC .....	83
5.5.2. En los CENS .....	84
<b>5.6. Relación entre la expresión de PD-L1 y el curso de la enfermedad.....</b>	<b>86</b>
5.6.1. En los ITAC .....	86
5.6.2. En los CENS .....	87
<b>5.7. Significado clínico-patológico del nivel de TILs CD8+ .....</b>	<b>88</b>
5.7.1. En los ITAC .....	88
5.7.2. En los CENS .....	89
<b>5.8. Relación entre el nivel de TILs CD8+ y el curso de la enfermedad .....</b>	<b>90</b>
5.8.1. En los ITAC .....	90
5.8.2. En los CENS .....	91
<b>5.9. Significado clínico-patológico del tipo de microambiente tumoral.....</b>	<b>92</b>
5.9.1. En los ITAC .....	92
5.9.2. En los CENS .....	93
<b>5.10. Relación entre el tipo de microambiente tumoral y el curso de la enfermedad ...</b>	<b>94</b>
5.10.1. En los ITAC .....	94
5.10.2. En los CENS .....	95
<b>5.11. Relación entre la cantidad de linfocitos CD8+ y la expresión de PD-L1.....</b>	<b>96</b>
5.11.1. En los ITAC .....	96
5.11.2. En los CENS .....	96
<b>5.12. Análisis multivariante .....</b>	<b>97</b>
5.12.1. En los ITAC .....	97
5.12.2. En los CENS .....	97
<b>6. Discusión .....</b>	<b>99</b>
<b>6.1. Justificación.....</b>	<b>101</b>
<b>6.2. Aspectos clínico-patológicos.....</b>	<b>102</b>
<b>6.3. Expresión de PD-L1.....</b>	<b>103</b>
<b>6.4. Linfocitos T CD8+ en el microambiente tumoral .....</b>	<b>107</b>
<b>6.5. Tipos de microambiente tumoral .....</b>	<b>109</b>
<b>6.6. Otros biomarcadores en investigación.....</b>	<b>111</b>
<b>6.7. Posibles futuras opciones terapéuticas en el cáncer nasosinusal.....</b>	<b>112</b>
<b>7. Conclusiones .....</b>	<b>117</b>
<b>8. Bibliografía .....</b>	<b>121</b>
<b>9. Anexo.....</b>	<b>137</b>
<b>9.1. Comunicaciones a congresos.....</b>	<b>139</b>
<b>9.2. Publicaciones en revistas científicas.....</b>	<b>139</b>



## ABREVIATURAS

- ACN: adenocarcinoma nasosinusal
- APC: células presentadoras de antígeno (“antigen presenting cells”)
- CECC: carcinoma escamoso de cabeza y cuello
- CENS: carcinoma escamoso nasosinusal
- CPCP: carcinoma pulmonar de células pequeñas
- CPCNP: carcinoma pulmonar de células no pequeñas
- EGF: factor de crecimiento epidérmico
- IFN- $\gamma$ : interferón gamma
- IHQ: inmunohistoquímica
- ITAC: adenocarcinoma de tipo intestinal
- MDSCs: células supresoras derivadas de la serie mieloide (“myeloid-derived suppressor cells”)
- PD-1: receptor de la proteína 1 de muerte celular programada (“programmed cell death protein 1”)
- PD-L1: ligando del receptor PD-1 (“programmed death ligand 1”)
- QT: quimioterapia
- RM: resonancia magnética
- ROS: especies oxígeno-reactivas (“reactive oxygen species”)
- RT: radioterapia
- TAM: macrófagos asociados al tumor
- TC: tomografía computerizada
- TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformante beta
- TILs: infiltrados linfoides asociados al tumor (“tumor infiltrating lymphocytes”)
- TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa
- Tregs: células T reguladoras
- VEB: virus de Epstein-Barr
- VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular
- VPH: virus del papiloma humano



# 1. Introducción



## **1.1. Presentación del problema**

Los carcinomas nasosinuales constituyen un grupo de tumores poco frecuentes y agresivos originados en las fosas nasales y senos paranasales. Representan aproximadamente el 0,2-0,8% del total de neoplasias malignas y menos del 5% de las neoplasias de cabeza y cuello<sup>1-3</sup>. La baja incidencia de los carcinomas nasosinuales es un obstáculo para su estudio, clasificación y estadificación, dificultando que se pueda acumular experiencia sobre los resultados de tratamientos.

A pesar de los avances en la cirugía y radioterapia, el pronóstico de estos tumores continúa siendo malo en estadios avanzados. La respuesta a la quimioterapia es generalmente escasa, por lo que son necesarias nuevas opciones terapéuticas para los estadios más avanzados, y la inmunoterapia podría ser una opción terapéutica en algunos casos.

En esta tesis doctoral se han estudiado un grupo de pacientes con carcinomas escamosos nasosinuales (CENS) y adenocarcinomas de tipo intestinal (ITAC), con el objetivo final de investigar nuevas opciones terapéuticas en estos pacientes. En ensayos clínicos con carcinomas escamosos de cabeza y cuello (CECC) y cáncer pulmonar de células no pequeñas (CPCNP), dos tumores con histologías similares a los CENS y los ITAC, la inmunoterapia ha demostrado unas tasas de respuesta significativas.

Actualmente la inmunoterapia está enfocada en los llamados puntos de control inmunológico, que regulan de forma negativa la función inmune de los linfocitos T. El receptor PD-1 es uno de los receptores más estudiados en el contexto clínico de la inmunoterapia del cáncer, y al interactuar con su ligando PD-L1 bloquea los linfocitos T activados. Esta vía de PD-1/PD-L1 es utilizada por diversos tipos tumorales para evadir el sistema inmune del huésped. Existen anticuerpos monoclonales que bloquean la interacción entre PD-1 y PD-L1, consiguiendo restaurar la actividad de los linfocitos T y aumentando la respuesta inmune antitumoral.

En el 2016, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) aprobó el uso de Pembrolizumab y Nivolumab, dos anticuerpos monoclonales anti-PD-1, para los CECC metastásicos o recurrentes. A la hora de seleccionar a los pacientes susceptibles de beneficiarse de este tipo de inmunoterapia, algunos estudios han demostrado la utilidad de la expresión de PD-L1 en las células tumorales y del nivel de linfocitos T en el microambiente tumoral, como posibles biomarcadores.

## **1.2. Tumores nasosinuales**

### **1.2.1. Epidemiología**

Los tumores nasosinuales representan aproximadamente el 3-5% de todos los tumores de cabeza y cuello, con una incidencia de aproximadamente 0,5-1,0 casos/100.000 habitantes<sup>1,4,5</sup>. Los CENS y los adenocarcinomas nasosinuales (ACN) representan aproximadamente el 70% de los tumores malignos nasosinuales. El 30% restante incluye el melanoma mucoso maligno, el esteseuroblastoma, el carcinoma indiferenciado, el carcinoma NUT, el carcinoma SMARCB1-deficiente, el carcinoma multifenotípico relacionado a VPH, el carcinoma neuroendocrino, el teratocarcinosarcoma y muchos otros<sup>6</sup>.

La edad media de aparición de los tumores nasosinuales es de 50-70 años, aunque en los casos de SNUC, carcinoma NUT, adenocarcinoma de tipo no intestinal y el esteseuroblastoma pueden aparecer a edades más tempranas<sup>7</sup>.

Existe una mayor predisposición por el sexo masculino en los CENS (2:1) y los ITAC (6:1), lo cual puede estar relacionado con la exposición ocupacional a ciertos carcinógenos industriales, como se expondrá más adelante, así como a alteraciones genéticas en el cromosoma X<sup>6</sup>.

Con respecto a la localización, la distribución exacta es difícil de definir dado que la gran mayoría afectan a más de una localización al diagnóstico. En aproximadamente el 45% de los casos los tumores nasosinuales se originan en las fosas nasales, en el 35% de los casos en el seno maxilar, y en el 10% de los casos en el etmoides, siendo excepcionales los tumores primarios del seno frontal y del seno esfenoidal<sup>4-8</sup>.

### **1.2.2. Etiopatogenia**

No se conocen los mecanismos etiopatogénicos exactos del cáncer nasosinusal pero se han descrito varios agentes carcinogénicos implicados en el desarrollo de estos tumores. Los CENS y los ITAC se han relacionado con exposiciones ocupacionales como el polvo de madera y de cuero, el níquel y el cromo<sup>9</sup>. Los trabajadores de la industria de la madera tienen hasta 500-900 veces más riesgo de desarrollar un ITAC y 20 veces más riesgo de desarrollar un CENS, respecto a la población general<sup>1,10</sup>. Los trabajadores de la industria peletera tienen un riesgo 10 veces superior al de la población general de desarrollar un ITAC<sup>1</sup>.

En algunos casos de tumores nasosinuales el virus del papiloma humano (VPH) y el virus de Epstein-Barr (VEB) se han visto implicados<sup>11,12</sup>. Se ha demostrado la presencia de VPH 16 y 18, predominantemente en los CENS<sup>12</sup>. En un metaanálisis se observó una

prevalencia de VPH del 29,6% en los tumores nasosinusales <sup>13</sup>. La presencia de un papiloma invertido también se considera un factor de riesgo ya que se ha observado una tasa de malignización a CENS del 5% <sup>14</sup>.

Aunque de manera menos evidente que en los carcinomas faringolaríngeos, existe evidencia de que el consumo de tabaco aumenta el riesgo de presentar un CENS <sup>4,15-18</sup>.

El mecanismo etiopatogénico de estos tumores no se conoce con exactitud, aunque se cree que están involucrados varios factores, entre los que destacan la inflamación y genotoxicidad desencadenados por las partículas carcinógenas. La genotoxicidad se divide en primaria y secundaria; la primaria es la producida directamente sobre las células diana del organismo, y la secundaria es la producida por la respuesta inflamatoria del individuo en respuesta a la exposición a diferentes partículas <sup>19</sup>. El efecto genotóxico primario es producido fundamentalmente por la producción de especies oxígeno-reactivas (ROS) que inducen daños en el ADN, modificaciones en la señalización intracelular, alteraciones genéticas y alteraciones epigenéticas, mientras que el efecto genotóxico secundario está mediado por células inflamatorias que provocan una inflamación crónica <sup>20,21</sup>.

Se ha visto que el estroma juega un papel muy importante en la progresión tumoral, y actualmente muchos estudios se centran en el microambiente tumoral, sus células inflamatorias y las vías activadas <sup>22,23</sup>.

### **1.2.3. Histopatología**

En las fosas nasales y senos paranasales se originan tumores con una gran variedad histológica, y lesiones con la misma histología pueden mostrar diferentes grados de diferenciación. Entre el 50 y el 90% de los tumores nasosinusales son de estirpe epitelial, siendo el CENS el más frecuente (50-80%), seguido del ACN (10-20%) <sup>2,3,8</sup>.

La mucosa de las fosas nasales, a diferencia de la del resto de las vías aéreas superiores, deriva del ectodermo, y contiene numerosas glándulas mucosas por invaginación de la mucosa de revestimiento. Estas particularidades se reflejan en la histogénesis de ciertos tumores, como el papiloma invertido y el neuroestesioblastoma, que sólo tienen asiento en las fosas nasales <sup>24</sup>.

La gran parte de las fosas nasales y senos paranasales está recubierta de un epitelio pseudoestratificado ciliado de tipo respiratorio en el que se distinguen 4 tipos de células: células cilíndricas ciliadas, células cilíndricas no ciliadas, células basales y células caliciformes (*Figura 1*). Por otro lado, el vestíbulo nasal está recubierto por un epitelio

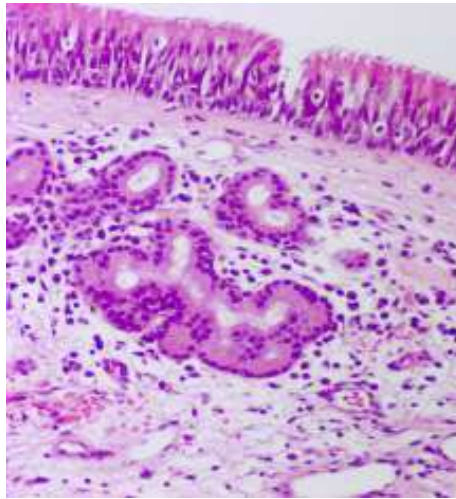
poliestratificado plano queratinizado, mientras que el techo de las fosas nasales está recubierto por un epitelio olfatorio sensorial <sup>1</sup> (*Figura 2*).

El carcinoma epidermoide es la forma más frecuente de carcinoma nasosinusal, y está constituido por trabéculas o nidos de tamaño variable, formadas por células que se asemejan a las de los epitelios planos poliestratificados, con distinto grado de atipia citológica, siendo generalmente de alto grado citológico. Existen formas de carcinoma epidermoide queratinizantes y no queratinizantes; la forma queratinizante es la forma más frecuente y presenta queratinización tanto en forma de disqueratosis individuales como formando globos córneos (*Figura 3*), mientras que la forma no queratinizante está constituida por células de aspecto más basaloide. La OMS clasifica los CENS en bien diferenciados, moderadamente diferenciados y pobremente diferenciados. Otras variedades de carcinoma epidermoide, como el carcinoma verrucoso, papilar, basaloide y sarcomatoide, son menos frecuentes en esta región. A excepción del carcinoma verrucoso, el pronóstico del carcinoma epidermoide nasosinusal depende más del grado de extensión tumoral que del tipo histológico, y así los tumores del vestíbulo nasal tienen mejor pronóstico al diagnosticarse en etapas más tempranas <sup>24</sup>.

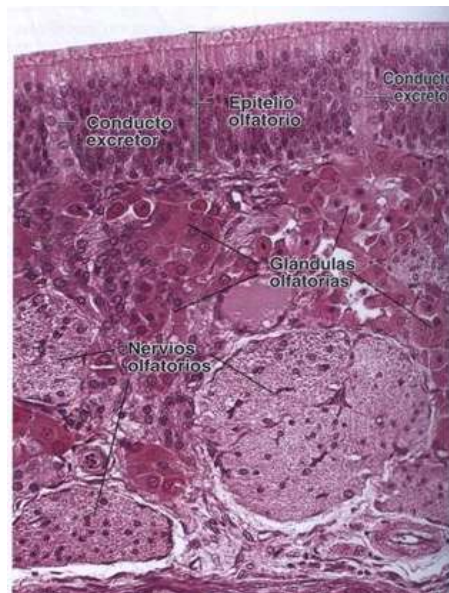
En la mayoría de los casos el diagnóstico histopatológico de carcinoma epidermoide es evidente, aunque en algunos casos son necesarios estudios de inmunohistoquímica para diferenciarlos de otros tumores, especialmente los tumores poco diferenciados.

Los ACN son tumores glandulares y se dividen en 2 grupos: los ITAC y los de tipo no intestinal. Se han propuesto dos clasificaciones histológicas para los ITAC. La clasificación de Kleinsasser y Schroeder <sup>25</sup> los divide en cuatro categorías: papilar tubular de células cilíndricas tipos I-III (bien, moderadamente y poco diferenciado), tipo alveolar con células caliciformes, tipo células en anillo de sello y tipo transicional. La clasificación de Barnes <sup>26</sup>, que es la más utilizada por su simplicidad, los divide en 5 subtipos histológicos: papilar (18%), colónico (40%), sólido (20%), mucinoso (22%), y mixto. Estos subtipos muestran diferentes patrones de crecimiento: el papilar está formado por finos tallos conectivos que sustentan varios estratos de células cuboideas o cilíndricas con escasa atipia citológica; el colónico crece con arquitectura túbulo-glandular; el sólido muestra pérdida de diferenciación con mayor atipia citológica; y el mucinoso muestra abundante mucosecreción extracelular e intracelular <sup>24,27</sup> (*Figura 4*). Todos estos tumores se subdividen en alto y bajo grado, según el grado de atipia citológica, siendo el pronóstico relativamente bueno para los tumores bien diferenciados mientras que en los tumores pobremente diferenciados el pronóstico se asemeja al de los carcinomas epidermoides.

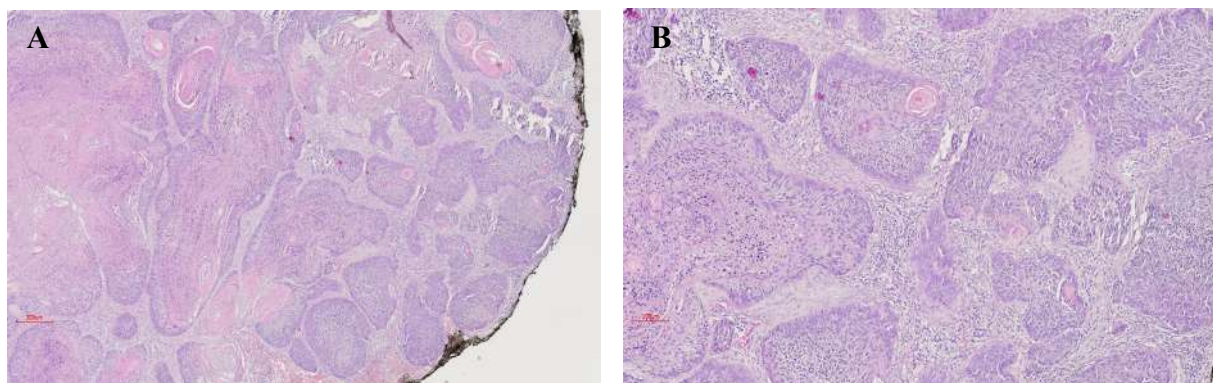




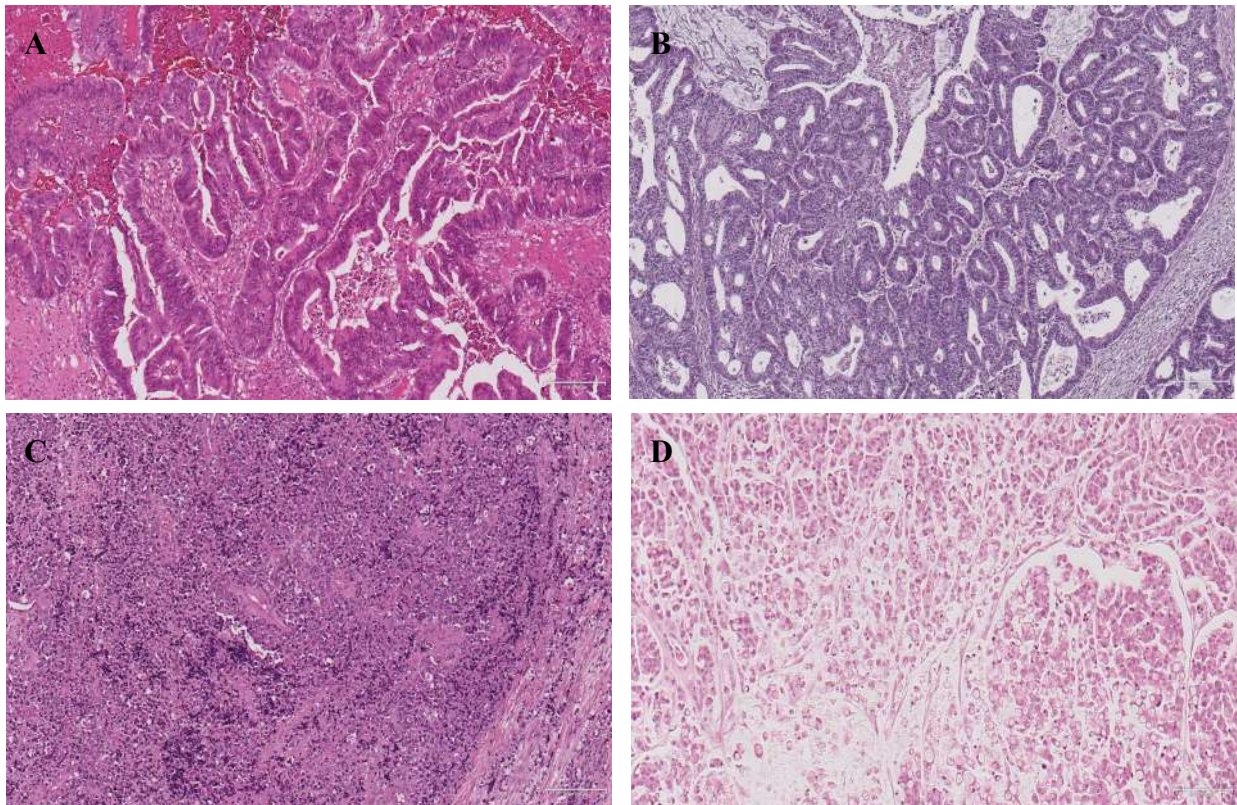
**Figura 1.** Imagen histológica del epitelio pseudoestratificado ciliado de tipo respiratorio (HE X20).



**Figura 2.** Microfotografía de la mucosa olfatoria (X240) (Tomado de Ross, M.H et al. <sup>28</sup>).



**Figura 3.** Imagen histológica de un carcinoma epidermoide queratinizante con queratinización en forma de globos córneos . A) HE X4. B) HE X10.



**Figura 4.** Imagen histológica de los subtipos de ITAC. A) Subtipo papilar, formado predominantemente por papilas revestidas por células epiteliales, con algunas células caliciformes, sin atipia celular o nuclear (HE X10). B) Subtipo colónico, formado por glándulas revestidas por células cilíndricas pleomórficas (HE X10). C) Subtipo sólido, formado por células pleomórficas con núcleos vesiculares y nucléolos prominentes (HE X10). D) Subtipo mucinoso, formado por células en anillo de sello con mucina intracelular (HE X20).

#### 1.2.4. Presentación clínica

El diagnóstico de estos tumores normalmente es tardío debido a la inespecificidad de sus síntomas, que se asemejan a los de los procesos inflamatorios nasosinuales<sup>1,29</sup>.

En los estadios iniciales suelen producir clínica inespecífica como rinorrea, epistaxis, hiposmia y dolor local<sup>31</sup>. En los estadios avanzados, cuando alcanzan dimensiones significativas o afectan a estructuras próximas aparece clínica más llamativa. La afectación de la órbita puede producir síntomas como proptosis, diplopia, pérdida de agudeza visual y síndrome conjuntival<sup>32</sup>. La afectación de la base del cráneo y cavidad craneal puede producir síntomas neurológicos como déficits neurales por afectación de los pares craneales, cefalea, oftalmoplejia, parestesias y algias faciales<sup>33</sup>. También puede existir invasión de la fosa

infratemporal, mucosa oral y piel de la mejilla, produciendo deformidades faciales, trismus o lesiones intraorales (*Figura 5*).



**Figura 5.** Ejemplo de un CENS exteriorizado a piel de la mejilla (A) y de un CENS con invasión de la órbita (B).

La afectación ganglionar al diagnóstico es poco frecuente (2-20%), variando según la histología tumoral y las estructuras afectadas <sup>1,29,34</sup>.

Las metástasis a distancia, en general, son muy poco frecuentes (2-10%) <sup>1,29,35</sup>.

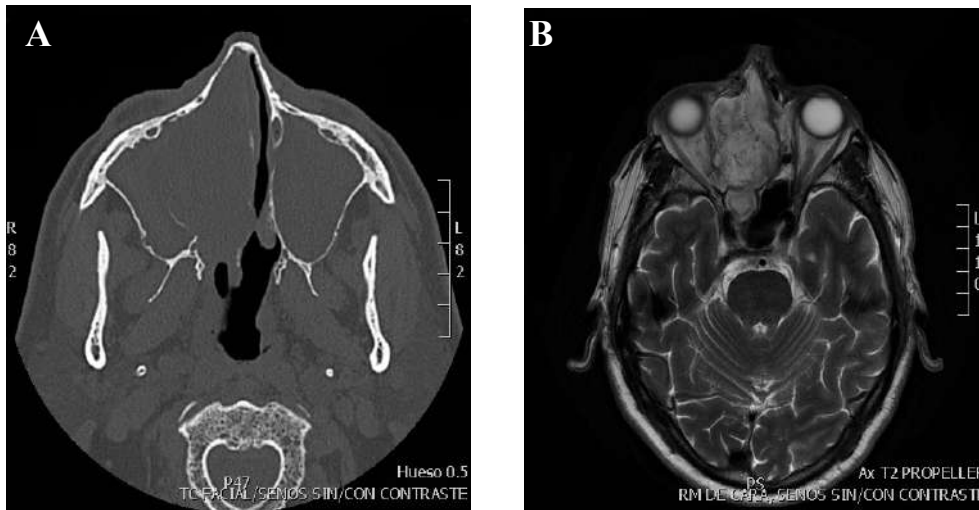
### **1.2.5. Diagnóstico**

Es muy importante el diagnóstico precoz de los tumores nasosinuales, por lo que la sintomatología nasal unilateral de larga evolución y refractaria a tratamientos habituales debe obligar a descartar un tumor nasosinusal.

En primer lugar, se debe realizar una historia clínica exhaustiva, que incluya las posibles exposiciones ocupacionales al polvo de madera u otras partículas. La exploración física debe comenzar con una exploración otorrinolaringológica completa. Es necesario realizar la exploración nasal mediante la nasofibroscoopia o la endoscopia nasal rígida, ya que la rinoscopia proporciona datos limitados. También se debe realizar una exploración otológica, cervical y neurológica de los pares craneales V, los oculomotores (III, IV y VI) y los pares bajos (IX, X, XI y XII).

Las pruebas de imagen son de gran importancia ya que nos permiten determinar la extensión tumoral y planificar el tratamiento. Ante la sospecha de un tumor nasosinusal maligno, se debe realizar una tomografía computerizada (TC) y una resonancia magnética (RM) <sup>15,36,37</sup> (*Figura 6*). El TC nos permite valorar la erosión ósea y nos ayuda a planificar el tratamiento quirúrgico o radioterápico <sup>15</sup>. La RM nos permite valorar la afectación orbitaria, intracraneal y perineural, y se considera la modalidad de imagen estándar para el seguimiento postoperatorio <sup>38,39</sup>.

El valor de la tomografía por emisión de positrones (PET)-TC no está aún bien definido pero es de utilidad especialmente en pacientes con riesgo o sospecha de metástasis o recurrencia <sup>40,41</sup>.



**Figura 6.** A) TC de un ITAC a nivel etmoidal derecho con erosión del tabique y extensión a fosa nasal contralateral y a seno maxilar ipsilateral. B) RM de mismo paciente que muestra la invasión intraorbitaria.

Antes de iniciar el tratamiento es obligatorio obtener una confirmación histológica y se debe tomar una biopsia representativa de la lesión evitando zonas necróticas o muy superficiales <sup>34</sup>.

### 1.2.6. Estadificación

La clasificación que se utiliza en la actualidad para los tumores nasosinuales de origen epitelial es la 8ª edición del American Joint Committee on Cancer (AJCC) y de la Organización Internacional contra el Cáncer (UICC) <sup>42</sup> (Tablas 1-5). Por un lado, se clasifican los tumores originados en el seno maxilar y por otro los tumores originados en el etmoides y fosas nasales. Los tumores originados en los senos frontales y esfenoidales no tienen una clasificación propia ya que se trata de localizaciones muy poco frecuentes.

Los tumores se clasifican según su extensión tumoral (T), afectación de ganglios linfáticos regionales (N) y presencia de metástasis a distancia (M).

**Tablas 1-4.** Clasificación TNM <sup>42</sup>.

<b>SENO MAXILAR</b>	
<b>Categoría T</b>	<b>Criterios</b>
<b>Tx</b>	No se puede analizar el tumor primario
<b>Tis</b>	Carcinoma <i>in situ</i>
<b>T1</b>	Tumor limitado a la mucosa antral sin erosión ni destrucción ósea
<b>T2</b>	Tumor produce erosión o destrucción ósea incluyendo extensión hacia paladar duro y/o meato medio, sin alcanzar pared posterior de seno maxilar ni apófisis pterigoides
<b>T3</b>	Tumor invade una de las siguientes áreas: pared posterior de seno maxilar, tejido subcutáneo, suelo o pared medial de la órbita, fosa pterigoidea, senos etmoidales
<b>T4a</b>	Tumor invade el contenido orbital anterior, piel de la mejilla, apófisis pterigoides, fosa infratemporal, lámina cribosa, seno frontal o esfenoidal
<b>T4b</b>	Tumor invade una de las siguientes áreas: ápex orbitario, duramadre, cerebro, fosa craneal media, pares craneales excepto V2, nasofaringe o clivus

<b>Categoría N</b>	<b>Criterios</b>
<b>Nx</b>	No se puede asegurar existencia de ganglios
<b>N0</b>	Ausencia de ganglios metastásicos
<b>N1</b>	Metástasis en un único ganglio ipsilateral ≤3cm, sin extensión extranodal
<b>N2a</b>	Metástasis en un único ganglio ipsilateral de >3cm pero <6cm, sin extensión extranodal
<b>N2b</b>	Metástasis en múltiples ganglios ipsilaterales, ninguno >6cm, sin extensión extranodal
<b>N2c</b>	Metástasis en ganglios bilaterales o contralaterales, ninguno >6cm, sin extensión extranodal
<b>N3a</b>	Metástasis en un ganglio de >6cm, sin extensión extranodal
<b>N3b</b>	Metástasis en cualquier ganglio(s) con extensión extranodal

<b>Categoría M</b>	<b>Criterios</b>
<b>M0</b>	Ausencia de metástasis
<b>M1</b>	Presencia de metástasis

<b>FOSAS NASALES Y SEÑO ETMOIDAL</b>	
<b>Categoría T</b>	<b>Criterios</b>
<b>Tx</b>	No se puede analizar el tumor primario
<b>Tis</b>	Carcinoma <i>in situ</i>
<b>T1</b>	Tumor limitado a una única sublocalización, con o sin invasión ósea

<b>T2</b>	Tumor invade dos sublocalizaciones en una única región, o se extiende hacia una región adyacente dentro del complejo nasoetmoidal, con o sin invasión ósea
<b>T3</b>	Tumor invade suelo o pared medial de la órbita, seno maxilar, paladar o lámina cribosa
<b>T4a</b>	Tumor invade una de las siguientes áreas: el contenido orbital anterior, piel de la mejilla o de la nariz, mínima extensión hacia fosa craneal anterior, apófisis pterigoides, seno frontal o esfenoidal
<b>T4b</b>	Tumor invade una de las siguientes áreas: ápex orbitario, duramadre, cerebro, fosa craneal media, pares craneales excepto V2, nasofaringe o clivus

**Tabla 5.** Estadios de los carcinomas nasosinusales <sup>42</sup>.

Estadio	T	N	M
<b>0</b>	Tis	N0	M0
<b>I</b>	T1	N0	M0
<b>II</b>	T2	N0	M0
<b>III</b>	T3	N0	M0
<b>III</b>	T1, T2, T3	N1	M0
<b>IVa</b>	T4a	N0, N1	M0
<b>IVa</b>	T1, T2, T3, T4a	N2	M0
<b>IVb</b>	Cualquier T	N3	M0
<b>IVb</b>	T4b	Cualquier N	M0
<b>IVc</b>	Cualquier T	Cualquier N	M1

### 1.2.7. Tratamiento

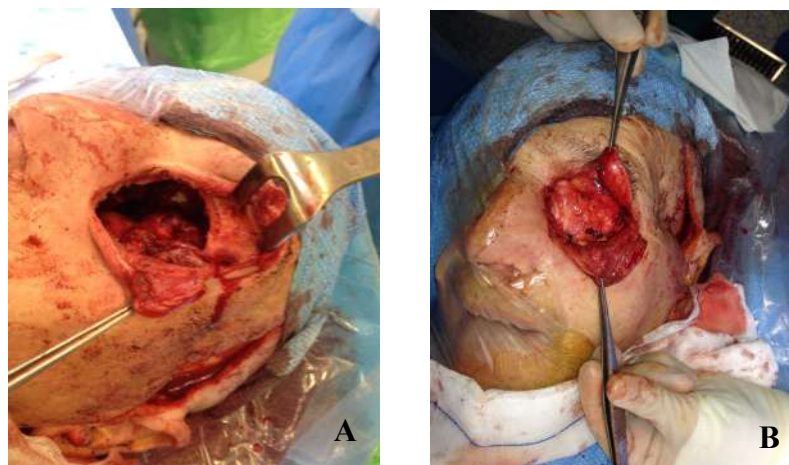
La estrategia terapéutica debe ser individualizada en función de la histología tumoral, el estadio, la edad y comorbilidades del paciente <sup>1,43</sup>. El tratamiento de elección de los tumores nasosinusales es la resección quirúrgica completa preferiblemente con RT complementaria <sup>1,34,44</sup>. Típicamente, los tumores nasosinusales tienden a presentar recidivas locales con frecuencia (50-80%) <sup>1,8,26</sup>, siendo la principal causa de mortalidad, por lo que se suele aconsejar la administración de RT postoperatoria aun cuando la resección quirúrgica se considere completa. La RT postoperatoria idealmente se debe administrar hacia las 6 semanas después de la cirugía <sup>45</sup>. Únicamente se podría evitar la administración de RT adyuvante en casos seleccionados de tumores T1-T2 de fosa nasal y etmoides que hayan sido extirpados con márgenes libres <sup>30</sup>.

La resección quirúrgica es el tratamiento de elección tanto inicialmente como en las recidivas, y el abordaje quirúrgico va a depender de la localización del tumor, de su extensión

y de las posibilidades reconstructivas <sup>1</sup>. El objetivo de la cirugía es principalmente obtener unos márgenes oncológicos libres, y se puede realizar mediante un abordaje endoscópico, abierto o combinado. Tradicionalmente la cirugía abierta ha sido de elección para los tumores nasosinuales, pero en los últimos años los abordajes han ido evolucionando obteniendo resultados oncológicos similares, con menor morbilidad <sup>46</sup>. Los abordajes abiertos se pueden realizar mediante incisiones pequeñas o mediante *degloving* (Figura 7), evitando así grandes cicatrices faciales y secuelas. En algunos casos puede estar indicado realizar resecciones muy amplias que precisen reconstrucciones con colgajos regionales o libres (Figura 8).



**Figura 7.** Ejemplo de abordaje mediante *degloving*.



**Figura 8.** Ejemplo de una maxilectomía parcial y exenteración (A) y reconstrucción con colgajo temporal (B).

Los abordajes endoscópicos han supuesto un gran avance para el tratamiento de los tumores nasosinuales, y comparado con los abordajes tradicionales, nos permiten alcanzar lesiones profundas centofaciales con una menor manipulación de estructuras neurovasculares y del parénquima cerebral, sin comprometer los resultados oncológicos <sup>47-49</sup>.

Las ventajas para el paciente incluyen una menor estancia hospitalaria, ausencia de cicatrices faciales y una menor tasa de complicaciones.

En los casos en los que el tumor infiltre estructuras neurocríticas (v.g. invasión cerebral extensa o del quiasma óptico), estaría indicado realizar una resección subtotal asociada a RT y/o QT, ya que no existe evidencia de que en estos casos resecciones agresivas mejoren significativamente la supervivencia. La cirugía también puede estar indicada como tratamiento paliativo en algunos casos.

La RT se puede administrar de forma aislada o en concomitancia con QT, como tratamiento radical en tumores muy avanzados o inoperables. Las técnicas de elección son la RT de intensidad modulada (IMRT) y RT guiada por la imagen (IGRT), la tomoterapia, la arcoterapia modulada volumétricamente (VMAT) y la terapia con partículas. Estas técnicas permiten administrar dosis altas de radiación al tumor, minimizando la toxicidad sobre los órganos vitales próximos<sup>45</sup>. La QRT adyuvante a la cirugía se podría valorar en casos de tumores con márgenes positivos, histologías agresivas o tumores metastásicos. Según algunos autores la QT (+/- RT) neoadyuvante a la cirugía se podría usar en caso de tumores localmente avanzados para reducir el tamaño tumoral<sup>50</sup>.

En el caso de tumores localmente avanzados o metastásicos, cuando la cirugía y/o la RT están contraindicados o ya no son efectivos, se puede administrar QT como tratamiento paliativo. El uso de algunos marcadores moleculares puede ayudar a predecir la respuesta a la QT en algunos casos seleccionados, por ejemplo se ha demostrado una respuesta favorable a la QT en los CENS con niveles bajos de la proteína ERCC1 (proteína reparadora del ADN), y en los ITAC con TP53 de tipo salvaje<sup>51,52</sup>. No obstante, la mayoría de los ITAC (86%) presentan mutaciones en el gen TP53<sup>53</sup>, y la respuesta a la QT generalmente es escasa en los tumores nasosinuales<sup>1</sup>.

### **1.2.8. Pronóstico**

Los CENS generalmente tienen mal pronóstico con una supervivencia global a los 5 años del 30-50%<sup>34,54,55</sup>. El pronóstico varía ligeramente según las diferentes localizaciones del tumor, siendo peor en los tumores de etmoides con una supervivencia del 48% a los 5 años, frente al 62% de los tumores de seno maxilar y al 77% de los tumores de fosa nasal<sup>34</sup>. El pronóstico también varía según el tamaño tumoral, con una supervivencia a los 5 años del 80-90% para los tumores T1, frente al 55% para los T2, el 50% para los T3 y el 27% para los T4<sup>34</sup>. En los CENS clásicos el grado histológico no tiene valor pronóstico<sup>56</sup>. Un factor de muy



mal pronóstico son las metástasis ganglionares o a distancia, ya que en estos casos las supervivencias son de 6 a 12 meses<sup>34</sup>.

Los ITAC tienen una supervivencia global a los 5 años del 60-70%<sup>57-59</sup>. El pronóstico depende fundamentalmente del estadio tumoral, siendo la supervivencia a los 5 años del 80% en los tumores T1 frente al 30% en los T4<sup>2,4,8</sup>. Asimismo, la histología tiene un valor pronóstico, siendo los tipos papilar y colónico de mejor pronóstico que los tipos sólido y mucinoso<sup>26,60</sup>. Las recidivas locales son frecuentes en los tumores nasosinuales (50-80%) y son la principal causa de mortalidad<sup>1,8,26</sup>.

### **1.3. Aspectos inmunológicos**

#### **1.3.1. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune**

En los últimos años las investigaciones se han centrado en los mecanismos utilizados por los tumores para evadir el sistema inmune; uno de los mecanismos conocidos es la generación de un “microambiente” de inmunosupresión que afecta a los linfocitos T citotóxicos (*Figura 9*). Las células tumorales pueden utilizar varios mecanismos que incluyen los siguientes: inhibir de forma directa la función de los linfocitos T citotóxicos o inducir su apoptosis, adquirir alteraciones genéticas y epigenéticas que alteran la respuesta inmune antitumoral, e inhibir la expresión de algunos antígenos de membrana para que las células tumorales no sean detectadas por las células presentadoras de antígeno (APC) y disminuir la estimulación de los linfocitos T citotóxicos<sup>61</sup>.

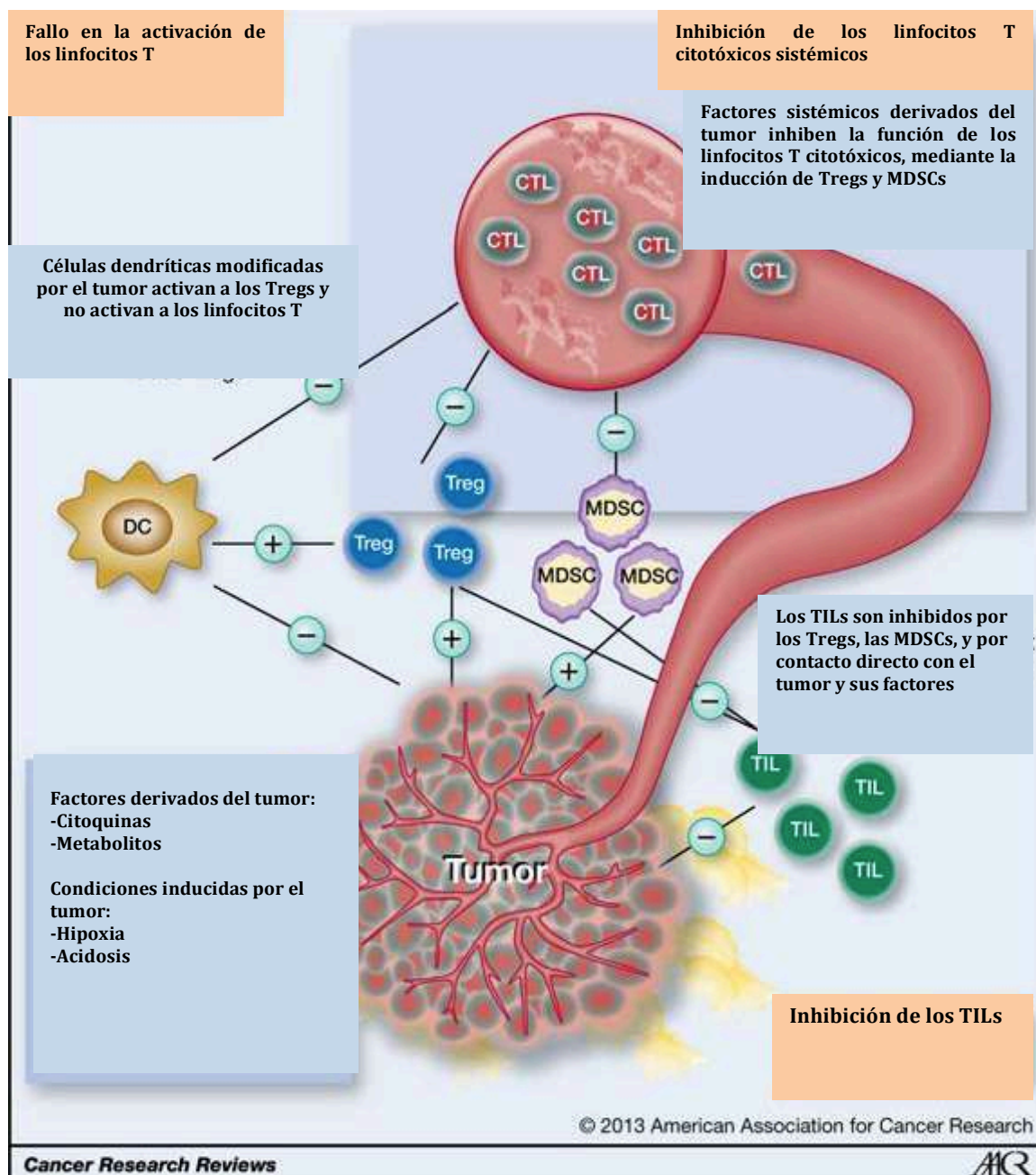
Para que los linfocitos T CD8+ citotóxicos ejerzan su función antitumoral se requiere la presentación de los antígenos presentes en las células tumorales mediante las APC. Las células dendríticas son un tipo de APC y se ha observado que las células tumorales son capaces de inhibir su función mediante la producción de diferentes factores como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), la interleuquina 10 (IL-10) y la IL-8. Se han identificado células dendríticas en diversos tipos tumorales, sin embargo no se ha demostrado una relación entre el número de células dendríticas en el microambiente tumoral y el pronóstico tumoral<sup>62</sup>.

Las células T reguladoras o Tregs son una subpoblación de linfocitos CD4+, CD25+, con función inhibidora sobre el sistema inmune. Representan el 2-5% del total de linfocitos CD4+ en la sangre periférica y se caracterizan por expresar Foxp3, CTLA4, LAG-3 (gen 3 de activación de linfocitos) y GITR (proteína relacionada con el receptor del factor de necrosis tumoral inducido por corticoides)<sup>63</sup>. Los Tregs inducidos inhiben a los linfocitos T

citotóxicos de forma directa o mediante la liberación de citoquinas como la IL-10 o el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ). Debido a su acción inhibidora del sistema inmune, el aumento de los Tregs en pacientes oncológicos puede facilitar la progresión tumoral. Se ha demostrado en varios estudios un mayor número de Tregs en el tejido tumoral y sangre periférica de pacientes con algunos tipos tumorales <sup>64,65</sup>, así como una correlación entre el aumento de Tregs y la presencia de metástasis y peor pronóstico<sup>66,67</sup>. Sin embargo, el aumento de Tregs también se ha relacionado con un mejor pronóstico en algunos tumores como el carcinoma colorrectal y algunos linfomas <sup>68,69</sup>, lo cual sugiere que la función de los Tregs podría depender de otros factores presentes en el microambiente tumoral.

Las células supresoras derivadas de la serie mieloide (MDSCs) son unas células inmaduras de estirpe mieloide originadas en la médula ósea, que en condiciones normales se diferencian en monocitos, granulocitos o células dendríticas. En varios tipos tumorales se ha observado una inhibición de este proceso de diferenciación con el consiguiente aumento del número de MDSCs en la sangre periférica y tejidos tumorales <sup>70,71</sup>. Algunos estudios han demostrado una relación entre un mayor número de MDSCs y una peor supervivencia global y libre de progresión <sup>72</sup>. Las MDSCs contribuyen a generar una tolerancia inmunológica en el microambiente tumoral mediante la inhibición de la activación de los linfocitos T <sup>73</sup>, la inducción de los Tregs <sup>74,75</sup>, y la inhibición de las células dendríticas <sup>76</sup>. También se ha demostrado que las MDSCs están implicadas en la resistencia a determinados quimioterápicos como el Sunitinib y el Cisplatino en el cáncer pulmonar <sup>77-80</sup>, o la Doxorubicina y el Melfalán en el mieloma múltiple <sup>81</sup>.

Los infiltrados linfoides asociados al tumor (TILs; del inglés “tumor infiltrating lymphocytes”) son los linfocitos T citotóxicos situados en el interior del tumor, y se ha observado que su función lítica se puede inhibir al interactuar con las células tumorales. Algunos autores abogan que las células tumorales o los exosomas liberados por estas, pueden expresar receptores de ligandos de muerte celular como por ejemplo FasL, que inducen la apoptosis de los TILs <sup>82</sup>. Los TILs CD8+ inhiben la progresión tumoral mediante su efecto citotóxico directo sobre las células tumorales o a través de la liberación de citoquinas como el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) o el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )<sup>83</sup>. Se ha demostrado una relación entre un mayor número de TILs CD8+ en el microambiente tumoral y un mejor pronóstico en múltiples tumores como el melanoma, carcinoma colorrectal, de ovario, de mama, CPCNP y CECC <sup>84-89</sup>.



**Figura 9.** Mecanismos tumorales de evasión del sistema inmune (Adaptado de Aerts, J.G *et al.*<sup>61</sup>).

Los macrófagos también se han visto implicados en la evolución de los tumores. Existen 2 subpoblaciones de macrófagos con diferentes funciones: los macrófagos tipo M1 y los macrófagos tipo M2 <sup>90</sup>. Los macrófagos tipo M1 tienen una función inhibitora del crecimiento celular mediante la producción de óxido nítrico (ON) e induciendo una respuesta Th1/citotóxica en los linfocitos T <sup>91</sup>. Por otro lado los macrófagos tipo M2 promueven el crecimiento celular y transforman los linfocitos T en Tregs mediante la producción de moléculas como la Ornitina, VEGF, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), TGFβ e IL-

10<sup>90-92</sup>. Por lo tanto, los macrófagos pueden tener la capacidad de inhibir el crecimiento tumoral o estimularlo, dependiendo de las condiciones<sup>91,93</sup>. Las células tumorales generan unas condiciones de hipoxia y acidosis en el microambiente tumoral que inducen la aparición de macrófagos con fenotipo proangiogénico (M2), y estos a su vez producen factores como el VEGF y la metaloproteinasa MMP-9, estimulando la neoformación de vasos sanguíneos<sup>94</sup>. En la mayoría de las neoplasias se ha observado un predominio de los macrófagos tipo M2, favoreciendo la progresión tumoral<sup>92,95,96</sup>.

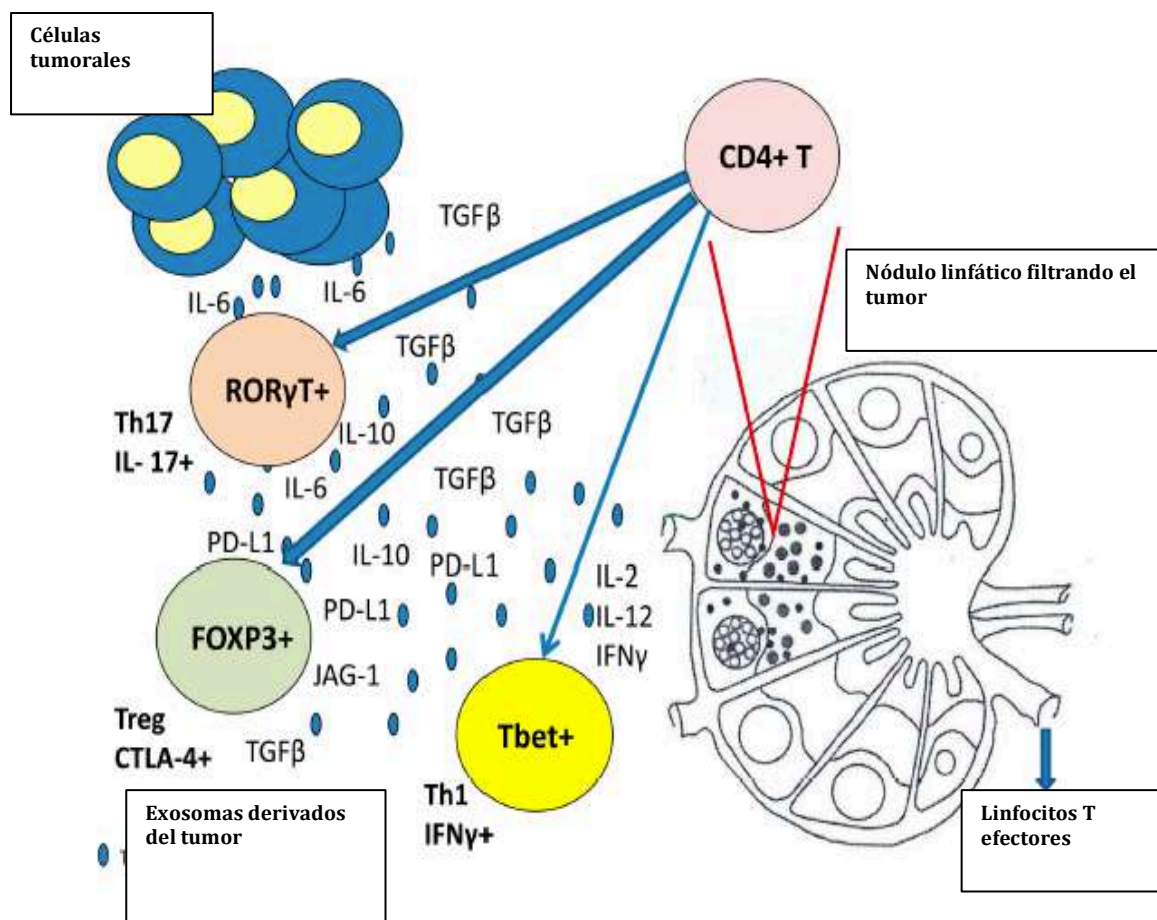
Las células NK son linfocitos granulares grandes con capacidad de identificar y eliminar células tumorales de forma directa, así como activar células dendríticas, macrófagos y linfocitos T. Las células tumorales también son capaces de inhibir la función de las células NK, favoreciendo la progresión tumoral. El aumento de células NK intratumorales se ha asociado con un mejor pronóstico en una variedad de tumores sólidos como el CECC, carcinoma pulmonar, gástrico y colorrectal, mientras que en otros tumores como el carcinoma ductal invasivo y el de ovario se ha asociado con un peor pronóstico<sup>97</sup>.

En el microambiente tumoral, además de células tumorales, existen células inmunes (macrófagos, células NK, linfocitos T y B); estroma tumoral (fibroblastos, células endoteliales, células mesenquimales); vasos sanguíneos y una gran variedad de factores inmunoinhibidores<sup>98</sup>. Las células en el microambiente tumoral están reprogramadas por el tumor para favorecer su progresión o proteger las células tumorales de la respuesta inmune del huésped. Así pues, el microambiente tumoral es un conjunto dinámico de células y factores que favorecen el crecimiento tumoral y contribuyen a la resistencia tumoral a diversos fármacos<sup>99</sup>. Estudios realizados *in situ* sugieren que cada tumor crea su propio microambiente tumoral, que lo diferencia de otros tumores con la misma histopatología. Asimismo, se ha demostrado que la administración de determinadas terapias altera el contenido del microambiente tumoral<sup>100</sup>. Por lo tanto, el microambiente tumoral varía continuamente para adaptarse a los mecanismos inmunes del huésped y a los diferentes tratamientos recibidos<sup>99</sup>.

El microambiente tumoral de los CECC contiene ganglios linfáticos que filtran el tumor, y que también sirven como órganos inmunológicos para la diferenciación y maduración de los linfocitos T, y para su interacción con las células dendríticas presentadoras de antígenos tumorales. Los nódulos linfáticos están rodeados de una gran cantidad de factores inhibidores liberados por el tumor (TGF- $\beta$ , IL-10, IL-6, PD-L1, JAG-1) y escasa cantidad de IL-2 e IFN- $\gamma$ . En este ambiente las células T se diferencian mayoritariamente en Treg o Th17, y no en linfocitos efectores Th1 productores de IFN- $\gamma$ . Como consecuencia de esto, el microambiente

tumoral presenta grandes cantidades de Treg y células Th17 proinflamatorias, y escasa cantidad de células efectoras Th1 con efecto anti-tumoral, lo cual favorece la progresión tumoral (Figura 10)<sup>99</sup>.

Asimismo, en el microambiente tumoral de pacientes con CECC se ha observado que los Tregs sobreexpresan CTLA-4, PD-1 y TIM-3 en la superficie de las células y potencian la inmunosupresión<sup>101</sup>. Existen varios mecanismos moleculares de inmunosupresión utilizados por los Tregs y otras células reguladoras en pacientes con CECC (Tabla 6). Estos mecanismos incluyen vías inhibitorias sobreexpresadas en estos tumores, que contribuyen a la inmunosupresión local y sistémica.



**Figura 10.** El microambiente tumoral de los CECC contiene una gran cantidad de factores inhibidores liberados por el tumor (TGF-β, IL-10, IL-6, PD-L1, JAG-1) y escasa cantidad de IL-2 e IFN-γ, por lo que las células T se diferencian mayoritariamente en Treg o Th17 que favorecen la progresión tumoral. Tbet, RORγT y FOXP3 son factores de transcripción que determinan la diferenciación de los linfocitos. Los exosomas derivados del tumor contribuyen a generar este ambiente inmunosupresor (Adaptado de Whiteside, TL<sup>99</sup>).

**Tabla 6.** Rutas moleculares sobreexpresadas en el microambiente tumoral de CECC con efecto inmunosupresor (Adaptado de Whiteside, T.L <sup>99</sup>).

Rutas de señalización alteradas	Efecto sobre las células inmunes o tumorales
EGF/EGFR	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Resistencia tumoral a la respuesta inmune</li> <li>↑ Producción de citoquinas/ factores con efecto inhibidor</li> <li>↑ Función supresora de los Treg</li> </ul>
IL-6, EGF, VEGF/STAT3	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Resistencia tumoral a la respuesta inmune</li> <li>↑ Producción de citoquinas/ factores con efecto inhibidor</li> <li>↓ Maduración de las células dendríticas</li> <li>↓ Actividad citolítica de los linfocitos T citotóxicos y células NK</li> </ul>
Cox-2/PGE2	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Resistencia tumoral a la respuesta inmune</li> <li>↓ Funciones de las células inmunes mediante la ruta cAMP</li> </ul>
PI3K/COX-2/PGE2	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ Supervivencia de las células inmunes</li> </ul>
PD-1/PD-L1	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Señales autocrinas tumorales y supervivencia</li> <li>↓ Funciones antitumorales de los linfocitos T, B, células NK y monocitos</li> <li>↑ Los Treg y funciones supresoras</li> </ul>
TGF-β/ TGF-βRI+RII	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Crecimiento tumoral</li> <li>↓ Funciones de los linfocitos T CD8+, diferenciación de linfocitos CD4+ a Treg y Th17</li> </ul>
Adenosina/A2AR	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ Funciones de los linfocitos T mediante la ruta cAMP</li> </ul>
Ectoenzimas CD39/CD73	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Producción de Adenosina</li> <li>↑ Señalización A2AR</li> <li>↓ Funciones de las células inmunes</li> </ul>
Fas/FasL	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Apoptosis de los linfocitos T CD8+ activados</li> </ul>
JAG-1/NOTCH-1	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Resistencia tumoral a la respuesta inmune</li> <li>↓ Funciones de las células inmunes</li> <li>↑ Proliferación de los Tregs</li> </ul>

### 1.3.1. Tipos de inmunoterapia

El objetivo de la inmunoterapia es potenciar la respuesta inmune dirigida contra el tumor, y existen varias modalidades que se pueden dividir en 2 grupos: la inmunoterapia activa y la inmunoterapia pasiva. La inmunoterapia activa estimula las células inmunes *in vivo* mediante la administración de células con capacidad de activar el sistema inmune del paciente o a través de mediadores inmunológicos, mientras que la inmunoterapia pasiva utiliza agentes obtenidos *in vitro* dirigidos frente a antígenos específicos.

Un ejemplo de inmunoterapia activa es la terapia celular adoptiva con linfocitos T, que consiste en extraer linfocitos T del paciente y modificarlos para que se dirijan contra antígenos tumorales específicos. Dentro de esta terapia se incluye el uso de TILs, linfocitos T con receptor de antígeno quimérico (CARTs) y la transfección del receptor de linfocitos T

(TCR). Esta técnica tiene algunos inconvenientes como que en algunos tumores existen escasos o ausencia de TILs, el número de linfocitos T citotóxicos en la sangre periférica suele ser muy reducido, y en muchos casos existe una amplia diversidad de antígenos tumorales. Por otro lado, existen otras estrategias dirigidas a aumentar la eficacia de los linfocitos T citotóxicos mediante la reducción de los Tregs, como por ejemplo el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos frente a CD25 (como daclizumab y basiliximab), o el uso de ciclofosfamida <sup>62</sup>.

Otro ejemplo de inmunoterapia activa son las vacunas terapéuticas, cuyo objetivo es dirigir el sistema inmune del paciente frente a dianas concretas. Se han evaluado varias vacunas, entre las que se incluyen las vacunas con células dendríticas, que consisten en aislar células dendríticas del paciente, estimularlas para que presenten un antígeno tumoral específico y reintroducirlas en el paciente. Actualmente sólo hay una vacuna terapéutica aprobada por la FDA, Sipuleucel-T (Provenge), aprobada en el 2010 para el cáncer de próstata avanzado resistente a la castración <sup>102</sup>.

En cuanto a la inmunoterapia pasiva, los agentes más utilizados son los anticuerpos monoclonales y las citoquinas recombinantes. Se han desarrollado anticuerpos monoclonales dirigidos frente a antígenos importantes para el crecimiento tumoral como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), otros neutralizan ligandos secretados por las células tumorales como el VEGF, y otros se han conjugado con radioisótopos o con fármacos quimioterapéuticos con el fin de incrementar su potencial citotóxico. Dentro de las citoquinas aprobadas en la clínica se encuentran la IL-2 y el IFN- $\alpha$ , que han mostrado eficacia en el carcinoma renal y melanoma, pero con una elevada toxicidad <sup>103</sup>.

En los CECC se han estudiado varios tipos de inmunoterapia, y los más utilizados en la actualidad son los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el tumor, sus productos o las células reguladoras inducidas por el tumor <sup>99</sup>. Cetuximab, un anticuerpo IgG1 monoclonal quimérico dirigido frente a EGFR, fue aprobado por la FDA para el tratamiento de CECC en el 2006, sin embargo se ha observado que sólo es eficaz en el 10-20% de los pacientes con CECC <sup>104</sup>.

En la actualidad la inmunoterapia está enfocada en los llamados puntos de control inmunológico o “checkpoints”, que regulan de forma negativa la función inmune de los linfocitos T citotóxicos. Los receptores de los puntos de control inmunológico más estudiados en el contexto clínico de la inmunoterapia del cáncer incluyen el receptor del antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4) y el receptor de la proteína 1 de muerte celular programada

(PD-1), entre otros. La unión de estos receptores con sus ligandos inhibe la función de los linfocitos T citotóxicos; estos pierden la capacidad de proliferar, de segregar citoquinas como la IL-2 y de destruir las células tumorales<sup>61</sup>. Existen anticuerpos monoclonales específicos que inhiben estos puntos de control inmunológico, aumentando la actividad antitumoral del sistema inmune. El primer anticuerpo monoclonal aprobado frente a estos “checkpoints” fue el anti-CTLA-4 (Ipilimumab), posteriormente se desarrollaron otros como los anti-PD-1 (Nivolumab y Pembrolizumab) y los anti-PD-L1 (Atezolizumab), entre otros. En el 2016 los anticuerpos monoclonales anti-PD-1 Nivolumab y Pembrolizumab fueron aprobados por la FDA para los pacientes con CECC cuya enfermedad ha progresado durante o después de la quimioterapia basada en platino<sup>105,106</sup>.

## **1.4. El receptor PD-1 y su ligando PD-L1**

### **1.4.1. Caracterización y función biológica**

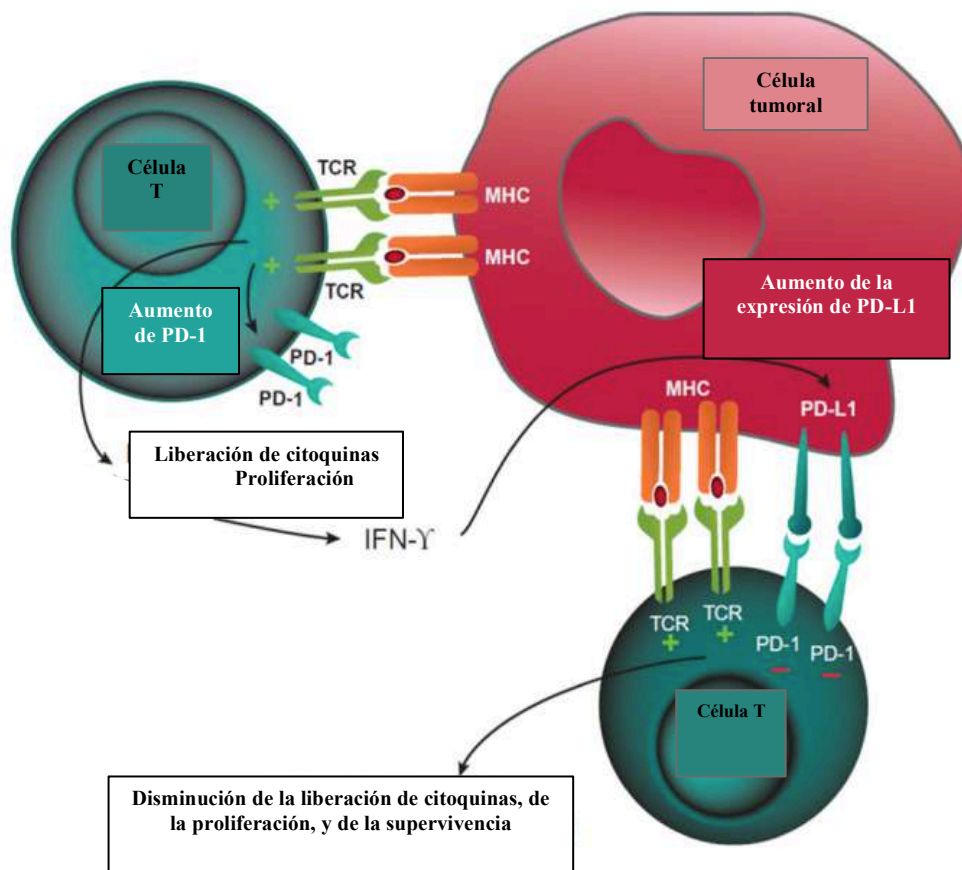
El receptor PD-1, también denominado receptor CD279, es una proteína transmembrana tipo I que se expresa en una gran parte de las células inmunes, como los linfocitos B y T, las células NK, las células dendríticas, los mastocitos y los macrófagos<sup>107-109</sup>.

Los ligandos del receptor PD-1 se denominan PD-L1 o B7-H1 y PD-L2 o B7-DC<sup>110</sup>. PD-L1 se expresa en algunas células inmunes, en el endotelio y en las células epiteliales nativas y tumorales, y se ha detectado en una amplia variedad de tumores: CECC, CPCNP, gástrico, colorrectal, pancreático, de mama, de ovario, melanoma, glioblastoma, linfoma y varios tipos de leucemia<sup>111-116</sup>.

El receptor PD-1 se considera uno de los receptores más importantes en la inmunomodulación, ya que bloquea los linfocitos T CD8+ activados y por consiguiente inhibe el sistema inmune<sup>117,118</sup>. La interacción entre el receptor PD-1 en los linfocitos T CD8+ y los ligandos PD-L1 de las APC evita reacciones autoinmunes así como posibles daños tisulares secundarios a una respuesta inmune desencadenada tras un proceso inflamatorio o una infección<sup>119,120</sup>. Asimismo, la interacción entre la molécula PD-L1 de las células neoplásicas y el receptor PD-1 de los linfocitos T CD8+ inhibe la función antitumoral de los linfocitos T CD8+ activados y se considera un mecanismo de evasión del sistema inmune<sup>121</sup>.



En el microambiente tumoral tanto las células neoplásicas como los TILs pueden expresar PD-L1 y PD-1, y se ha demostrado que la expresión de PD-L1 en las células tumorales y en las células del sistema inmune está fuertemente asociada con la expresión de PD-1 en los TILs (*Figura 11*). Por lo tanto, la expresión de PD-L1 indica la existencia de un microambiente inmunológico reactivo <sup>122</sup>.

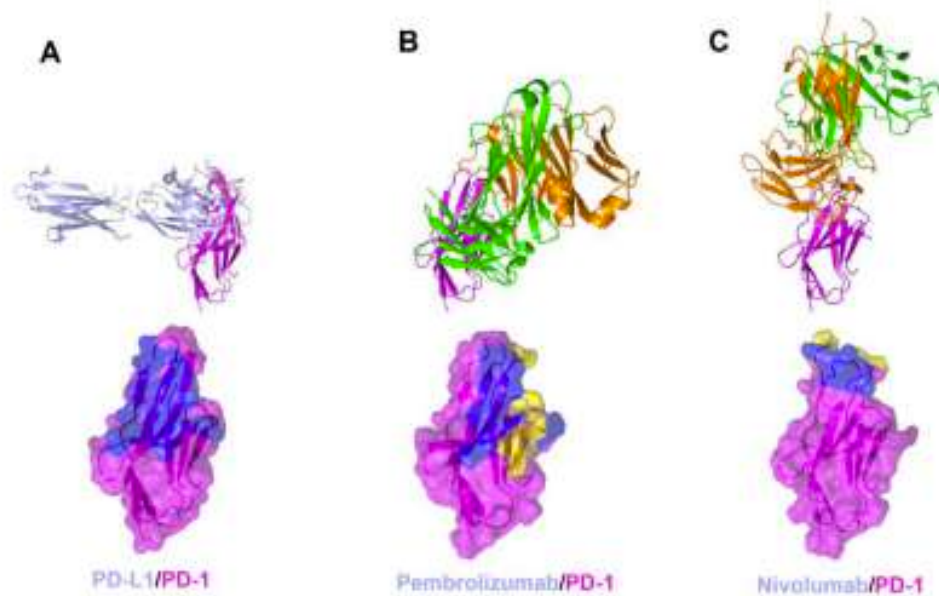


**Figura 11.** Inhibición de los linfocitos T CD8+ mediada por PD-1. La estimulación prolongada del receptor de los linfocitos T CD8+ (TCR) puede aumentar la expresión de PD-1, y la liberación de citoquinas inflamatorias puede inducir la expresión de PD-L1 en las células tumorales. La interacción entre PD-1 y PD-L1 inhibe la función antitumoral del linfocito T CD8+ (Adaptado de Buchbinder, El *et al.* <sup>123</sup>).

#### 1.4.2. PD-1 y PD-L1 en inmunoterapia

Existen anticuerpos monoclonales dirigidos tanto frente a PD-1 como a PD-L1, y la unión de estos anticuerpos monoclonales bloquea la interacción receptor-ligando, y por lo tanto restaura la actividad de los linfocitos T y aumenta la respuesta inmune antitumoral. El bloqueo de esta interacción sería especialmente beneficiosa en los tumores que utilizan este

mecanismo de escape del sistema inmune. La interacción entre PD-1 y los anticuerpos monoclonales anti-PD-1 ha sido ilustrada mediante las estructuras cristalinas de PD-1 unidas al fragmento variable (Fv) o fragmento de unión a antígeno (Fab) de los anticuerpos (*Figura 12*)<sup>124</sup>.



**Figura 12.** Estructura cristalina de PD-1 y los anticuerpos anti-PD-1. (A) PD-1 (rosa) unido a PD-L1 (azul claro), y el sitio de unión de PD-L1 (azul oscuro) en la superficie de PD-1. (B) PD-1 unido a Pembrolizumab, y su epítipo (amarillo y azul oscuro) en la superficie de PD-1. (C) PD-1 unido a Nivolumab, y su epítipo (amarillo y azul oscuro) en la superficie de PD-1. Las cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos están señaladas en naranja y verde, respectivamente, y la zona azul oscura muestra las regiones compartidas entre los epítopos de los anticuerpos y el sitio de unión de PD-L1<sup>124</sup>.

En la actualidad existen 6 fármacos dirigidos frente a PD-1/PD-L1 que han sido aprobados por la FDA<sup>124</sup> (*Tabla 7*).

**Tabla 7.** Anticuerpos anti-PD-1/PD-L1 aprobados por la FDA (Adaptado de Lee, HT *et al.* <sup>124</sup>).

Diana	Anticuerpo	Nombre comercial	Tipo tumoral (año de aprobación por la FDA)
PD-1	Nivolumab (IgG4)	Opdivo	Melanoma (2014) CPNCP (2015) Linfoma Hodgkin (2016) CECC (2016) Carcinoma urotelial (2017) Carcinoma hepatocelular (2017)
	Pembrolizumab (IgG4)	Keytruda	Melanoma (2014) CPNCP (2015) CECC (2016) Linfoma Hodgkin (2017) Carcinoma Urotelial (2017) Carcinoma gástrico (2017) Carcinoma cutáneo de células escamosas (2018)
	Cemiplimab (IgG4)	Libtayo	Carcinoma urotelial (2016) CPNCP (2016)
PD-L1	Atezolizumab (IgG1)	Tecentriq	Carcinoma urotelial (2017) CPNCP (2018)
	Durvalumab (IgG1)	Imfinzi	Carcinoma de células de Merkel (2017) Carcinoma urotelial (2017)
	Avelumab (IgG1)	Bavencio	Carcinoma de células de Merkel (2017) Carcinoma urotelial (2017)

### 1.4.3. Utilidad clínica del análisis de PD-1/PD-L1

Actualmente en la práctica clínica es habitual la realización de técnicas inmunohistoquímicas y/o moleculares para seleccionar a los pacientes que con más probabilidad se van a beneficiar de determinados tratamientos quimioterápicos. En el caso de los tratamientos anti PD-1/PD-L1 todavía no se conoce un biomarcador con verdadero valor predictivo, sin embargo varios estudios sugieren que la detección de PD-L1 en las células tumorales mediante inmunohistoquímica puede ayudar a predecir una respuesta clínica favorable a estos fármacos <sup>108,117,125</sup>.

En el CPCNP se ha estudiado ampliamente el valor predictivo de la expresión tumoral de PD-L1, observándose mejores repuestas a los fármacos anti-PD-1 en tumores PD-L1 positivos <sup>126,127</sup>. Sin embargo, la expresión de PD-1 en los linfocitos T y en otras células inmunes apenas se ha estudiado como posible biomarcador. En el estudio retrospectivo de Paré *et al.* <sup>128</sup> se analizó la expresión de PD-1, mediante la determinación del mRNA, en 34 tipos tumorales tratados con Nivolumab o Pembrolizumab, y según los autores la expresión de PD-1 se podría asociar con la sensibilidad a los fármacos anti-PD-1. Esta expresión parece estar asociada a la presencia de linfocitos CD8+ activados, no obstante se trata de un estudio limitado a un grupo heterogéneo de pacientes con diversos tumores, y son necesarios estudios prospectivos y aleatorizados para establecer la utilidad clínica y el umbral de positividad óptimo. En el estudio de Schultheis *et al.* <sup>129</sup>, realizado con pacientes con CPCP, se observó una expresión de PD-1 mayoritariamente en los linfocitos T localizados en la interfase estroma-tumor y en una proporción muy inferior en los linfocitos T intratumorales.

No se conocen los mecanismos exactos por los que las células neoplásicas adquieren la capacidad de expresar PD-L1, pero se sabe que para ello utilizan algunas de las rutas oncogénicas de señalización ya conocidas, como la vía PI3/PKB y la vía JAK/STAT, así como en respuesta a citoquinas producidas por un infiltrado inflamatorio, como el interferón <sup>130-133</sup>.

En algunos casos se ha observado positividad para PD-1/PD-L1 únicamente en los TILs o en los macrófagos asociados al tumor (TAM), y no en las células neoplásicas. En un estudio en el que se analizaron 5 tipos de tumores sólidos se observó una relación entre la expresión de PD-L1 en las células tumorales y los TILs PD-1+, y se demostró que la positividad para cualquiera de los dos marcadores tiene valor predictivo de respuesta a las terapias anti-PD-1 <sup>134</sup>.

Varios estudios han demostrado que los TILs CD8+ en el microambiente tumoral inducen la expresión de PD-L1 mediante la liberación de IFN- $\gamma$  y tienen beneficios clínicos <sup>135</sup>. Los TILs CD8+ preexistentes son liberados mediante los inhibidores de PD-1/PD-L1 y contribuyen a la regresión tumoral <sup>136,137</sup>. Recientemente se han descrito 4 tipos de microambiente tumoral basados en la expresión de PD-L1 y la presencia de TILs CD8+: tipo I (PD-L1+ TIL+), tipo II (PD-L1- TIL-), tipo III (PD-L1+ TIL-) y tipo IV (PD-L1- TIL+). Según esta clasificación los tumores de tipo I tienen una mayor probabilidad de responder a las terapias anti PD-1/PD-L1 <sup>138</sup>.

#### **1.4.4. Técnicas de análisis de la expresión de PD-L1**

Para valorar la expresión de PD-L1 mediante inmunohistoquímica se debe realizar sobre tejido tumoral fijado en formol e incluido en parafina <sup>117,134</sup>. El resultado se valora mediante el porcentaje de células tumorales positivas para PD-L1, y en la mayoría de los estudios la intensidad de tinción no influye en el score <sup>139,140</sup>.

Existen diferentes anticuerpos anti-PD-L1 para la detección de la expresión de PD-L1 mediante inmunohistoquímica, cada uno identifica diferentes epítomos de la molécula dependiendo del clon utilizado. Los diferentes clones pueden estar dirigidos frente al dominio extracelular (SP263, 22C3 y 28-8) o intracelular (E1L3N y SP142) <sup>139</sup>, y el empleo de clones diferentes puede dar resultados diferentes <sup>140</sup>. La tinción también puede verse modificada según el sistema químico de visualización utilizado. Por estos motivos, para cada clon se utiliza un test de detección inmunohistoquímica concreto.

Se han descrito dos patrones de tinción de PD-L1 en las células tumorales: el patrón membranoso y el citoplasmático. El patrón membranoso se define como positivo cuando se

observa tinción circular completa de la membrana celular <sup>141</sup>, y algunos autores consideran este patrón el biomarcador principal a la hora de predecir la respuesta al tratamiento anti-PD-1 <sup>108</sup>. Los tests de detección de PD-L1 utilizados en la actualidad varían en la valoración del patrón de tinción, ya que algunos consideran positivas únicamente las tinciones citoplasmáticas, otros únicamente las tinciones membranosas, y otros consideran positivas ambas tinciones <sup>109,141</sup>.

En cuanto al punto de corte, todavía no se ha establecido cuál debe ser el porcentaje mínimo de células que expresen PD-L1 para poder clasificar una neoplasia como positiva para PD-L1. El porcentaje de células que expresan PD-L1 utilizado como punto de corte oscila entre  $\geq 1\%$ ,  $\geq 5\%$ ,  $\geq 10\%$  y  $\geq 50\%$  de las células tumorales, según los diferentes estudios <sup>142-144</sup>.

En algunos estudios en los que se ha realizado la detección de PD-L1 mediante técnicas de cuantificación de expresión génica basadas en mRNA se han observado resultados con mayor sensibilidad que los tests inmunohistoquímicos, con porcentajes de detección del 37,2% frente al 18,5% <sup>141</sup>. Esto se podría deber a la heterogeneidad de los tumores, ya que los tissue arrays utilizados para el estudio inmunohistoquímico pueden ver limitada su representatividad, o también se podría deber al hecho de que los estudios de expresión génica utilizan volúmenes mayores de tejido tumoral.

#### **1.4.5. PD-L1 en el cáncer nasosinusal**

La expresión de PD-L1 en el cáncer nasosinusal aún no es bien conocida, y existen escasos trabajos publicados hasta la fecha. En el estudio de Riobello *et al.*, realizado por nuestro grupo de investigación, se analizó la expresión de PD-L1 en 53 casos de CENS y 126 ITAC, observando una expresión de PD-L1 en el 34% de los CENS y en el 17% de los ITAC <sup>145</sup>. Quan *et al.* observaron positividad para PD-L1 en un 30,2% de los pacientes con CENS; se valoró como positiva la tinción membranosa en  $>5\%$  de las células tumorales <sup>146</sup>. Dicha expresión se correlacionó de forma significativa con un peor pronóstico y con niveles altos de TILs CD8+. En el análisis multivariante, el nivel de TILs CD8+ resultó ser un factor pronóstico independiente y favorable para la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad <sup>146</sup>. Según este estudio, la correlación entre la expresión de PD-L1 y los TILs CD8+ en el CENS indica que la vía de PD-1/PD-L1 puede ser una diana inmunoterapéutica prometedora en estos tumores.



# 2. Hipótesis





- Los tumores nasosinusales son tumores infrecuentes, con mal pronóstico a pesar de los diversos tratamientos existentes. El desarrollo de tratamientos alternativos para los estadios avanzados o recidivas, entre los cuales se incluye la inmunoterapia, podría desempeñar un papel importante en la mejora del pronóstico de estos pacientes.
  
- A pesar de las particularidades etiológicas y clínicas de los CENS y los ITAC, sus patrones histológicos son similares a los de los CPCNP y los CECC.
  
- Los anticuerpos monoclonales anti-PD-1 Nivolumab y Pembrolizumab ya han sido aprobados para los CPCNP y los CECC, y se ha demostrado la utilidad de la expresión tumoral de PD-L1 y del número de TILs CD8+ como biomarcadores de respuesta a la inmunoterapia anti-PD-1 en estos tumores, lo cual también se podría aplicar a los CENS y los ITAC.
  
- El conocimiento de la expresión tumoral de PD-L1 y del microambiente tumoral de los CENS y los ITAC, de lo cual se dispone de escasos estudios hasta la fecha, permitiría establecer relaciones con algunas variables clínico-patológicas y seleccionar aquellos pacientes susceptibles de ser tratados con los anticuerpos monoclonales anti-PD-1/PD-L1.



# 3. Objetivos



### **3.1. Objetivo general**

- Determinar el grado de expresión de PD-L1 y el nivel de linfocitos CD8+ en los ITAC y CENS.

### **3.2. Objetivos específicos**

- Describir los aspectos clínico-patológicos más importantes de nuestra serie de pacientes con ITAC y CENS.
- Determinar, mediante inmunohistoquímica (IHQ), la expresión de PD-L1 en las muestras tumorales de los pacientes de nuestra serie.
- Determinar el nivel de linfocitos CD8+ en las muestras tumorales de los pacientes de nuestra serie.
- Clasificar a los pacientes de nuestra serie según el tipo de microambiente tumoral basado en la expresión tumoral de PD-L1 y el nivel de linfocitos CD8+.
- Relacionar la expresión de PD-L1, el nivel de linfocitos CD8+ y el tipo de microambiente tumoral con las variables clínico-patológicas estudiadas y con la supervivencia de los pacientes.



# 4. Material y Método





## **4.1. Pacientes estudiados**

Se estudiaron de forma retrospectiva 133 casos de ITAC y 57 casos de CENS tratados en el Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Central de Asturias.

Todos los paciente fueron intervenidos con fines curativos entre 1978 y 2014. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes, y el estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital. Algunos pacientes recibieron tratamiento complementario (RT y/o QT) según la estadificación tumoral, y ningún caso recibió RT y/o QT preoperatoria.

En todos los pacientes se constató un historial clínico bien documentado, con seguimiento suficiente, así como con un diagnóstico anatomopatológico de carcinoma epidermoide o adenocarcinoma de tipo intestinal realizado por un patólogo experimentado en cabeza y cuello del Servicio de Anatomía Patológica.

## **4.2. Recogida de muestras**

Las muestras estudiadas procedían de 133 ITAC y 57 CENS primarios, y estaban almacenadas en el banco de tumores de nuestro hospital. El trabajo de laboratorio se realizó en el Laboratorio de Otorrinolaringología del Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA).

Para realizar los estudios mediante inmunohistoquímica (IHQ) se utilizaron muestras de tejido tumoral fijado en formol e incluido en parafina.

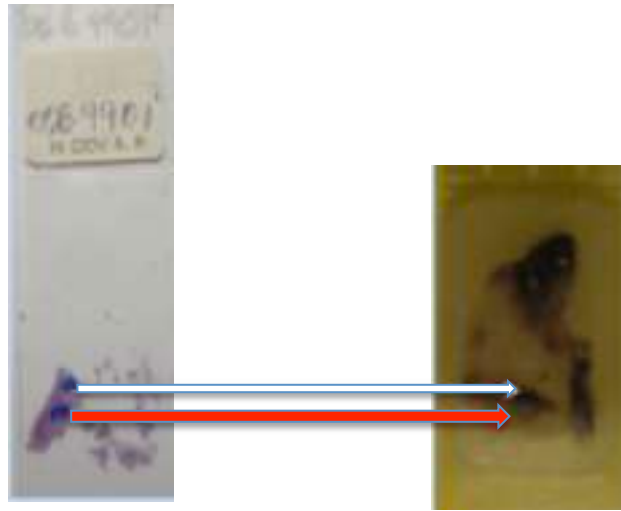
## **4.3. Técnica de los “Tissue Arrays”**

Empleamos la técnica conocida como “Tissue Arrays”, introducida en 1998 por Kononen *et al.*<sup>147</sup>. El “Tissue Arrayer” extrae un cilindro de tejido tumoral con una aguja de pequeño diámetro (1mm), y lo coloca en el bloque denominado “receptor” en el que se disponen de forma matricial un gran número de cilindros. Las principales ventajas de esta técnica son la reducción del tiempo empleado, el menor consumo de tejido y coste de material, y la posibilidad de análisis simultáneo y estandarizado de múltiples muestras tumorales. Los inconvenientes incluyen el tamaño reducido de la muestra, la tinción heterogénea, la posible pérdida de cilindros y la selección incorrecta del tejido.

### **4.3.1. Selección de las zonas a muestrear**

Realizamos cortes de los bloques incluidos en el estudio y los teñimos con hematoxilina-eosina. El patólogo revisa las laminillas teñidas correspondientes a cada bloque, elige las

áreas representativas y las marca con círculos (mínimo 3) de 1 mm de diámetro para poder identificar las zonas correspondientes en cada bloque (*Figura 13*).



**Figura 13.** Ejemplo de selección de zona a muestrear: se marcan con círculos las zonas más representativas de la muestra con hematoxilina-eosina y se identifican las zonas correspondientes en cada bloque de parafina.

#### **4.3.2. Elaboración de la base de datos y esquema del “Tissue Array”**

Elaboramos el esquema topográfico del “Tissue Array” en una tabla de Microsoft Office Word que dispone de tantas casillas como cilindros de tejido. En cada casilla añadimos el número de biopsia identificativo.

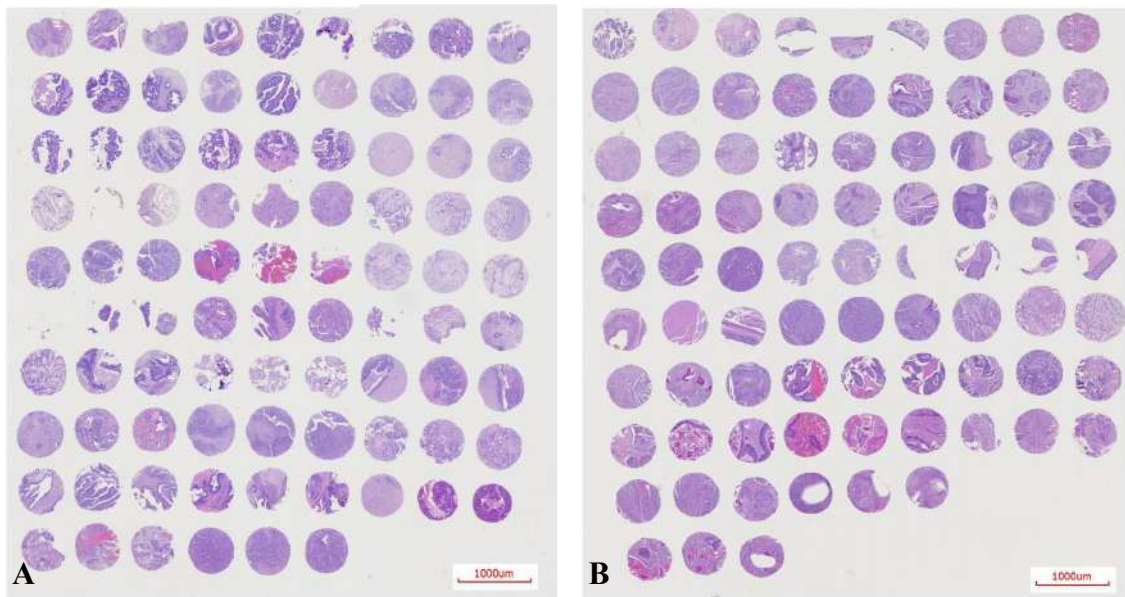
Realizamos bloques de “Tissue Array” de 2 x 2,5 cm, con pocillos de tumor de 1 mm separados por 1,5 mm.

#### **4.3.3. Elaboración del “Tissue Array”**

Para la elaboración de los bloques seguimos las instrucciones técnicas del proveedor del aparato. Tras extraer los *cores* de tejido de 1 mm de diámetro, se van colocando en el bloque receptor según el esquema previamente definido. Tras completar este proceso, se realiza la homogenización del bloque en la estufa a 60°C durante 12-15 minutos, colocándolo boca abajo sobre un porta. Posteriormente lo dejamos enfriar a temperatura ambiente el tiempo necesario, y después lo introducimos en la nevera para endurecerlo antes de proceder a cortarlo.

#### 4.3.4. Secciones del bloque

Realizamos las secciones de una sola tanda, para evitar la pérdida de tejido que supone reorientar el bloque. Se realizan cortes de 3µm, y en el primer corte útil se realiza una tinción de hematoxilina-eosina de control. Si son necesarias más de 20 secciones, se debe realizar un corte de control por cada 20 secciones y se tiñe con hematoxilina-eosina.



**Figura 14.** “Tissue array” de 29 casos de ITAC (A) y 27 casos de CENS (B) con 3 muestras de cada caso (HE).

#### 4.3.5. Requerimientos mínimos estándar del “Tissue Array”

Para dar por válido el “Tissue Array” todos los tumores muestreados deben estar representados en las secciones, o al menos en un número superior al 90%.

Los cilindros deben estar intactos una vez seccionados, o en caso de que se haya perdido parte del tejido, al menos el 50% del caso debe estar representado.

Si se pierden más de 3 casos, se debe proceder a la repetición del “Tissue Array”.

#### 4.4. Análisis mediante inmunohistoquímica

La IHQ es un procedimiento histopatológico en el que se utiliza un anticuerpo marcado con un enzima para unirse a un antígeno específico. La unión del anticuerpo al antígeno en el tejido orgánico se visualiza mediante la actividad enzimática, y esto nos permite identificar la localización tisular o citológica de una sustancia específica.

Las muestras de tejido tumoral fijado en formol e incluido en parafina se cortan en secciones de 3µm, se colocan en portas siliconizados (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) y se secan en la estufa a 56°C-58°C (mínimo 2 horas y máximo 18).

A continuación, las muestras son desparafinadas con xilol e hidratadas mediante un gradiente de alcoholes hasta llegar al agua. El desenmascaramiento antigénico se realiza con solución recuperadora de antígenos en el PT-link de Dako® a 95°C durante 20 minutos, y se dejan las preparaciones dentro de la solución recuperadora de antígenos hasta que reduzca la temperatura a 60°C. Después, se colocan las preparaciones en un recipiente que contenga Buffer de lavado.

La técnica inmunohistoquímica se realiza en el inmunoteñidor automático “Autostainer plus” (Dako®). Se introducen las muestras en un buffer de lavado y en una solución bloqueante de peroxidasa durante 5 minutos, y se añade el anticuerpo monoclonal primario dirigido hacia la proteína que deseamos detectar durante un tiempo variable, dependiendo del tipo de anticuerpo utilizado.

Para el estudio de la expresión de PD-L1 utilizamos el anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 de conejo clon E1L3N (1/100 Monoclonal Rabbit, Cell Signalling Technology, Cambridge UK). Para la determinación del microambiente tumoral, estudiamos las células inmunes mediante los marcadores inmunohistoquímicos CD8 (TILs CD8+) y CD68 (macrófagos). Utilizamos el anticuerpo monoclonal anti-CD8 de ratón clon C8/144B, IR623 (Monoclonal Mouse Anti-Human CD8, DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) y el anticuerpo monoclonal anti-CD68 de ratón clon PG-M1 (Monoclonal Mouse Anti-Human CD68, DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca), con un tiempo de incubación de 20 minutos.

Para la inmunodetección utilizamos el sistema EnVision Plus “anti-mouse” empleando como sustrato el cromógeno diaminobenzidina (DakoCytomation). El sistema EnVision Plus es una técnica de tinción en 2 pasos en la que el anticuerpo primario le sigue un polímero conjugado. Este sistema aumenta la sensibilidad, lo que permite incrementar las diluciones del anticuerpo primario y produce menos fondo que las técnicas tradicionales de avidina-biotina.

Como último paso se contrasta la preparación mediante hematoxilina durante un minuto. Tras la tinción, las preparaciones se deshidratan mediante alcoholes de graduación ascendente y se montan con un cubreobjetos.

#### **4.4.1. Interpretación de las técnicas inmunohistoquímicas**

Patrón de tinción de PD-L1: se valoró la tinción membranosa, citoplasmática o la coexistencia de ambas.

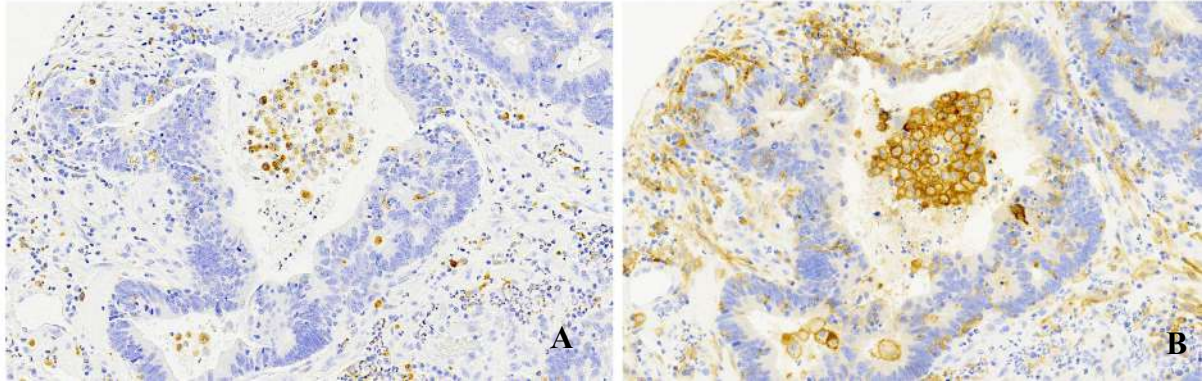
Porcentaje de células tumorales PD-L1+: evaluamos la expresión inmunohistoquímica de PD-L1 en las células tumorales y el porcentaje fue estimado sobre el total de células tumorales presentes en el área examinada. Se valoró como positiva la tinción membranosa y/o citoplasmática en >5% de las células tumorales.

Intensidad de tinción de PD-L1: se clasificó bajo los epígrafes ausencia de tinción (0), tinción citoplasmática débil (1), tinción citoplasmática y membranosa moderada (2) y tinción citoplasmática y membranosa intensa (3).

Expresión inmunohistoquímica de CD8+: la tinción citoplasmática y membranosa de CD8 fue clasificada en 3 grados: 0%, 1-10% y >10% de las células presentes en el estroma o intratumoral. Posteriormente los agrupamos en 2 grupos: CD8<sup>bajo</sup> para 0% o 1-10%, y CD8<sup>alto</sup> para >10%. En cuanto a la intensidad de tinción observamos que la intensidad de tinción fue similar en todos los casos.

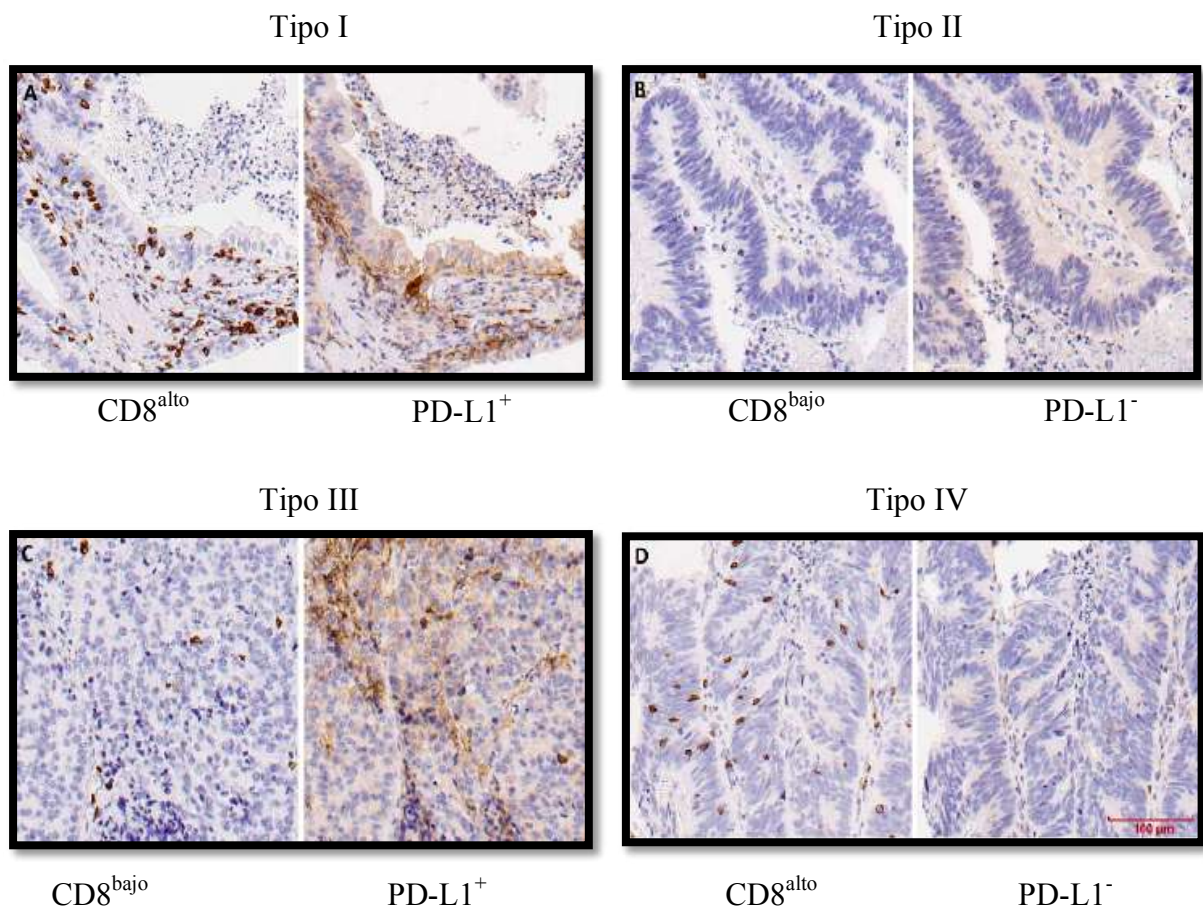
Localización de los TILs CD8+: evaluamos los TILs CD8+ en el estroma y en el interior de los nidos tumorales. Observamos que todos los TILs CD8+ intratumorales también presentaban positividad para CD8+ estromal, por lo que nos centramos en analizar los TILs CD8+ intratumorales.

Expresión inmunohistoquímica de CD68+ (Figura 15): evaluamos la presencia de macrófagos CD68+ en el estroma o intratumoral, y los clasificamos en 2 grupos: ausencia de tinción y presencia de tinción. También evaluamos la expresión inmunohistoquímica de PD-L1 en los macrófagos CD68+, siendo el 5% el punto de corte de positividad.



**Figura 15.** Tinción inmunohistoquímica de macrófagos CD68+ (A) y macrófagos PD-L1+ (B).

Tipos de microambiente tumoral (Figura 16): identificamos 4 tipos de microambiente tumoral basados en la expresión de PD-L1 en las células tumorales y los TILs CD8+ intratumorales presentes: tipo I (CD8<sup>alto</sup>/PD-L1<sup>+</sup>), tipo II (CD8<sup>bajo</sup>/PD-L1<sup>-</sup>), tipo III (CD8<sup>bajo</sup>/PD-L1<sup>+</sup>) y tipo IV (CD8<sup>alto</sup>/PD-L1<sup>-</sup>).



**Figura 16.** Tinción inmunohistoquímica de los TILs CD8+ y de las células tumorales PD-L1+ en los 4 tipos de microambiente tumoral.

## 4.5. Descripción de las variables

Las variables clínico-patológicas que se seleccionaron y estudiaron fueron las siguientes:

- Edad de los pacientes (media y rango)
- Sexo de los pacientes (hombre o mujer)
- En el caso de los CENS la localización tumoral (seno maxilar o etmoides)
- En el caso de los ITAC el subtipo histológico (Papilar, Colónico, Sólido o Mucinoso)
- Exposición a la madera
- En el caso de los CENS el grado histológico (bien, moderadamente o pobremente diferenciado)
- Estadio TNM (I, II, III, IVa, IVb)
- Categoría T (T1, T2, T3, T4)
- Categoría N (N0, N+)
- Categoría M (M0, M+)
- Invasión intracraneal (Si, No)
- Afectación duramadre (Si, No)
- Afectación orbitaria (ausencia, periórbita u órbita)
- Radioterapia postoperatoria (Si, No)
- Supervivencia libre de enfermedad
- Supervivencia global
- Supervivencia específica para tumor
- Estado del paciente (vivo, muerto por tumor, muerto por otra causa, vivo con recidiva)

#### **4.6. Análisis estadístico**

El análisis estadístico sobre las distintas variables numéricas y descriptivas estudiadas se ha realizado con el programa informático SPSS (“Statistical Package for Social Science”), versión 20.0 para MAC (SPSS® Inc. Illinois, EE.UU).

Aplicamos el test de Chi-Cuadrado ( $\chi^2$ ) para analizar posibles asociaciones entre los TILs CD8+, la expresión de PD-L1 y otros parámetros clínico-patológicos. El nivel de significación se fijó para una  $p \leq 0,05$ .

Para estimar la supervivencia se utilizaron las curvas Kaplan-Meier, comparando las distribuciones de supervivencia mediante la Prueba de Logaritmo del Rango “Log-Rank Test”. Los valores con una  $p \leq 0,05$  fueron considerados significativos.

El análisis multivariante (para examinar el impacto relativo de las variables que dieron resultados significativos en el análisis univariante) se ha llevado a cabo mediante el método de regresión de Cox.



# 5. Resultados



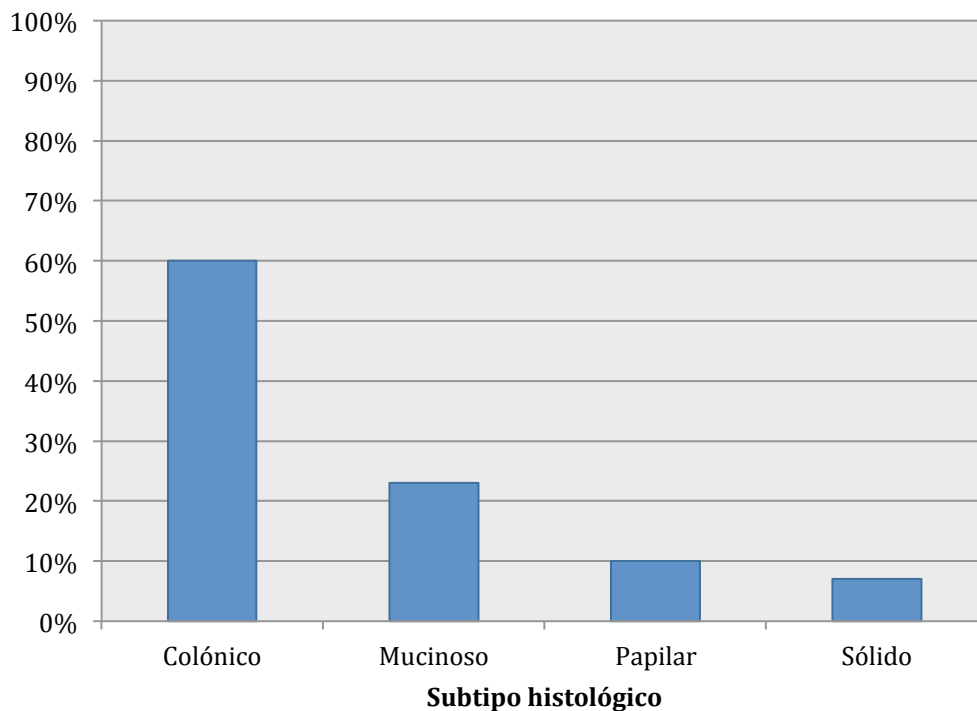
## 5.1. Aspectos clínico-patológicos

Las muestras estudiadas correspondían a un total de 133 casos de ITAC y 57 casos de CENS tratados en el Hospital Universitario Central de Asturias. Se definen las características de los pacientes seleccionados, comparándolas con lo esperado en estos tipos de tumores. Asimismo, se pretende establecer asociaciones con las diferentes variables obtenidas mediante inmunohistoquímica.

### 5.1.1. En los ITAC

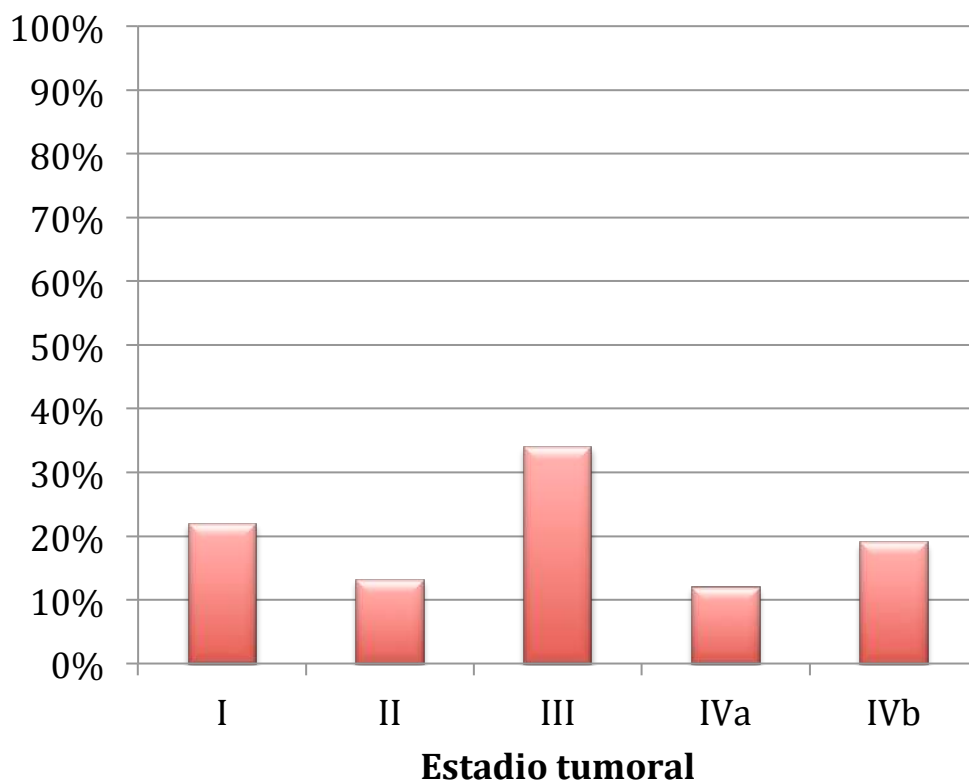
De los 133 pacientes con ITAC, 131 fueron varones (98%) y 2 mujeres (2%), con una media de edad al diagnóstico de 66 años (rango 28-92 años). 118 pacientes (89%) presentaban antecedente de exposición al polvo de la madera.

En cuanto al subtipo histológico, se observó que el más frecuente fue el subtipo colónico (80 casos; 60%), seguido del mucinoso (30 casos; 23%), el papilar (13 casos; 10%) y finalmente el sólido (10 casos; 7%) (*Figura 17*).



**Figura 17.** Clasificación de los ITAC según el subtipo histológico.

Con respecto al estadio tumoral T (tamaño del tumor) al diagnóstico, se observó un predominio de pacientes con tumores en estadios localmente avanzados. 86 pacientes (65%) presentaban tumores en estadios T3-T4 y 47 pacientes (35%) presentaban tumores en estadios T1-T2. La presencia de metástasis a distancia se constató en 13 pacientes (10%). En cuanto al estadio tumoral TNM, 30 pacientes (22%) presentaban un estadio I, 17 pacientes (13%) un estadio II, 45 pacientes (34%) un estadio III, 16 pacientes (12%) un estadio IVa y 25 pacientes (19%) un estadio IVb (*Figura 18*).



**Figura 18.** Clasificación de los ITAC según el estadio tumoral.

En cuanto a los factores pronósticos que se consideraron en nuestro estudio, se objetivó la presencia de invasión intracraneal en 15 pacientes (11%), la invasión de la periórbita en 18 pacientes (14%) y de la órbita en 4 pacientes (3%). Se administró RT complementaria postoperatoria en 76 pacientes (57%).

Los datos clínico-patológicos según el subtipo histológico se muestran en la *Tabla 8*.

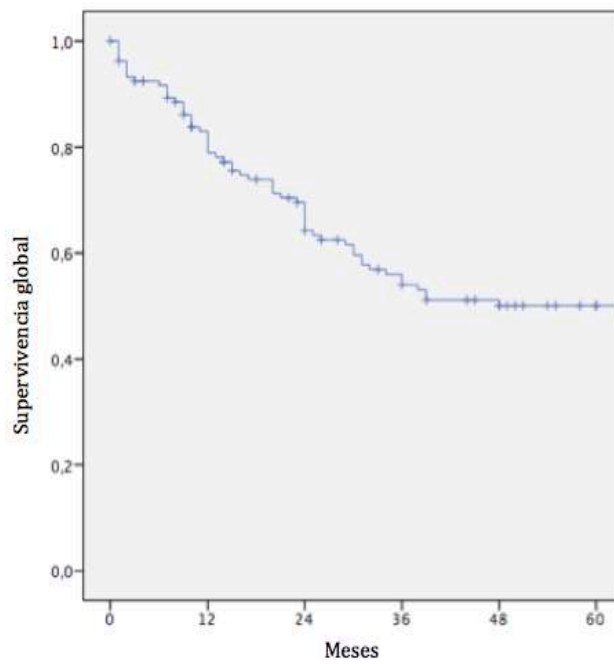
**Tabla 8.** Aspectos clínico-patológicos de los ITAC estudiados según el subtipo histológico.

		<b>Total n=133 (%)</b>	<b>Colónico n=80 (60%)</b>	<b>Mucinoso n=30 (23%)</b>	<b>Papilar n=13 (10%)</b>	<b>Sólido n=10 (7%)</b>
<b>Edad Media</b>	66 años (28-92)					
<b>Género</b>	Hombre		79 (99%)	30 (100%)	13 (100%)	9 (90%)
	Mujer		1 (1%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1%)
<b>Estadio</b>	Estadio I		19 (24%)	5 (17%)	4 (31%)	2 (20%)
	Estadio II		13 (16%)	1 (3%)	3 (23%)	0 (0%)
	Estadio III		27 (34%)	10 (33%)	5 (38%)	3 (30%)
	Estadio IVa		7 (9%)	7 (23%)	1 (8%)	1 (10%)
	Estadio IVb		14 (17%)	7 (23%)	0 (0%)	4 (40%)
<b>Invasión Intracraneal</b>	Si		6 (7%)	6 (20%)	0 (0%)	3 (30%)
	No		74 (93%)	24 (80%)	13 (100%)	7 (70%)
<b>Invasión de la Órbita</b>	Órbita		1 (1%)	3 (10%)	0 (0%)	0 (0%)
	Periórbita		7 (9%)	8 (27%)	1 (8%)	2 (20%)
	No		72 (90%)	19 (63%)	12 (92%)	8 (80%)
<b>Radioterapia</b>	Si		48 (60%)	16 (53%)	7 (54%)	5 (50%)
	No		32 (40%)	14 (47%)	6 (46%)	5 (50%)

El tiempo medio de seguimiento fue de 56 meses (rango 1-460 meses). Tras el tratamiento inicial y durante el periodo de seguimiento 70 pacientes (53%) presentaron recidivas y 6 pacientes (5%) presentaron metástasis a distancia que coincidieron con recidivas no tratables.

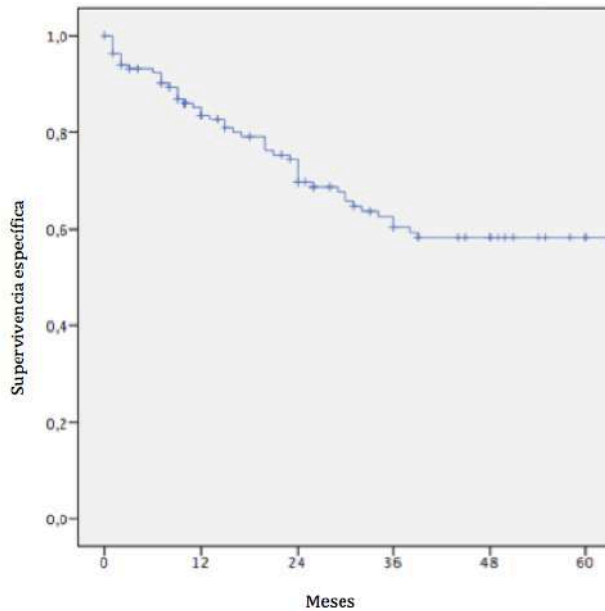
La principal causa de mortalidad en nuestra serie fue la presencia de recidiva local y metástasis a distancia. 73 pacientes (55%) fallecieron durante el seguimiento. De estos, 53 pacientes (73%) fallecieron debido a recidivas locales o metástasis a distancia, y 20 pacientes (27%) fallecieron debido a procesos intercurrentes.

La supervivencia global (SG) de los pacientes fue del 54% y del 48% a los 3 y 5 años de seguimiento, respectivamente (*Figura 19*).



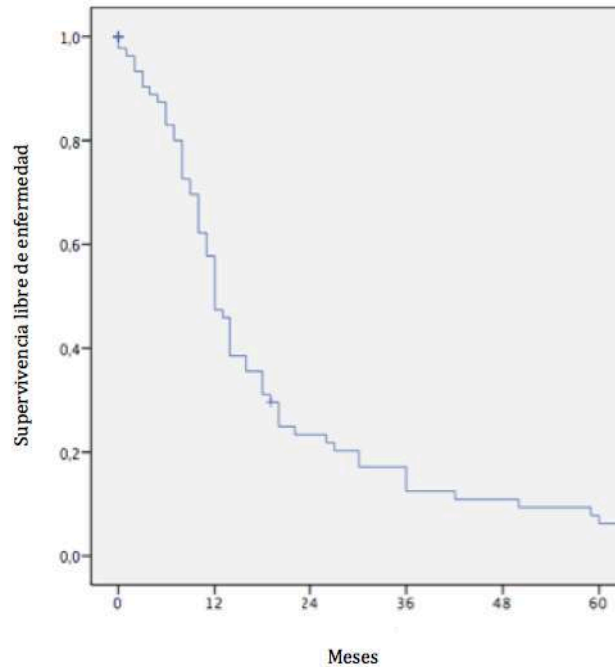
**Figura 19.** Supervivencia global en los ITAC.

La supervivencia específica (SE) de los pacientes fue del 60% y del 57% a los 3 y 5 años de seguimiento, respectivamente (*Figura 20*).



**Figura 20.** Supervivencia específica en los ITAC.

La supervivencia libre de enfermedad (SLE) fue del 13% y del 6% a los 3 y 5 años respectivamente (*Figura 21*).

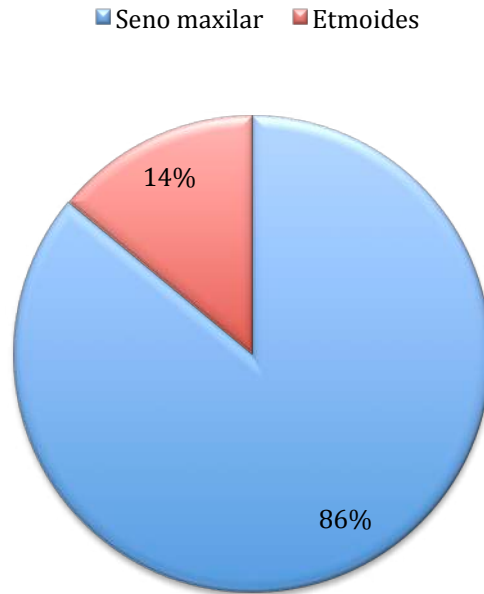


**Figura 21.** Supervivencia libre de enfermedad en los ITAC.

### 5.1.2. En los CENS

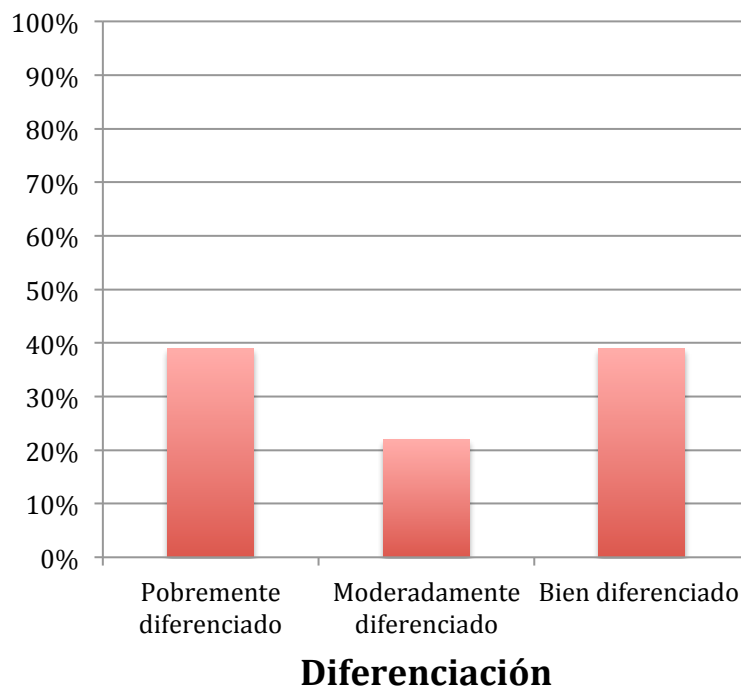
De los 57 pacientes con CENS, 37 fueron varones (65%) y 20 mujeres (35%), con una media de edad al diagnóstico de 65 años (rango 37-93 años).

En cuanto a la localización tumoral, se observó que en 49 casos (86%) el tumor se originaba en el seno maxilar y en 8 casos (14%) se originaba en el etmoides (*Figura 22*).



**Figura 22.** Localización tumoral de los CENS.

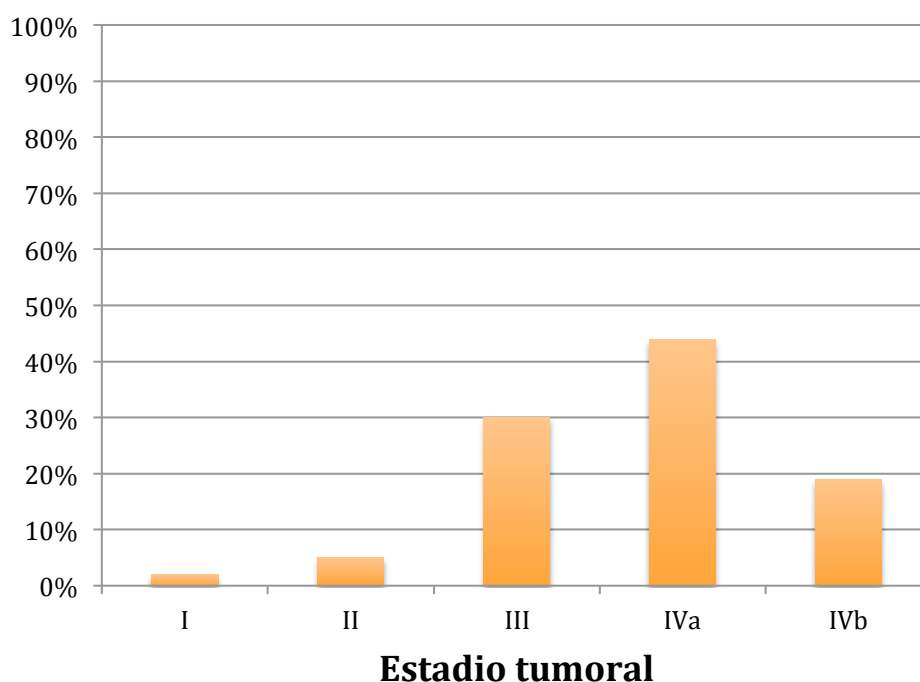
En relación con el grado de diferenciación, se observó que en 22 casos (39%) el tumor era pobremente diferenciado, en 13 casos (23%) moderadamente diferenciado y en 22 casos (39%) bien diferenciado (*Figura 23*).



**Figura 23.** Grado de diferenciación histológica de los CENS.



Con respecto al estadio tumoral T (tamaño del tumor) al diagnóstico, se observó un predominio de pacientes con tumores en estadios localmente avanzados. 51 pacientes (89%) presentaban tumores en estadios T3-T4 y 6 pacientes (11%) presentaban tumores en estadios T1-T2. La presencia de metástasis ganglionares cervicales se objetivó en 10 pacientes (18%) y la presencia de metástasis a distancia en 7 pacientes (12%). En cuanto al estadio tumoral TNM, 1 paciente (2%) presentaba un estadio I, 3 pacientes (5%) un estadio II, 17 pacientes (30%) un estadio III, 25 pacientes (44%) un estadio IVa y 11 pacientes (19%) un estadio IVb (*Figura 24*).



**Figura 24.** Clasificación de los CENS según el estadio tumoral.

En cuanto a los factores pronósticos que se consideraron en nuestro estudio, se objetivó la presencia de invasión intracraneal en 10 pacientes (18%), la invasión de la periórbita en 19 pacientes (33%) y de la órbita en 7 pacientes (12%). Se administró RT complementaria postoperatoria en 41 pacientes (72%).

Los datos clínico-patológicos según la localización tumoral se muestran en la *Tabla 9*.

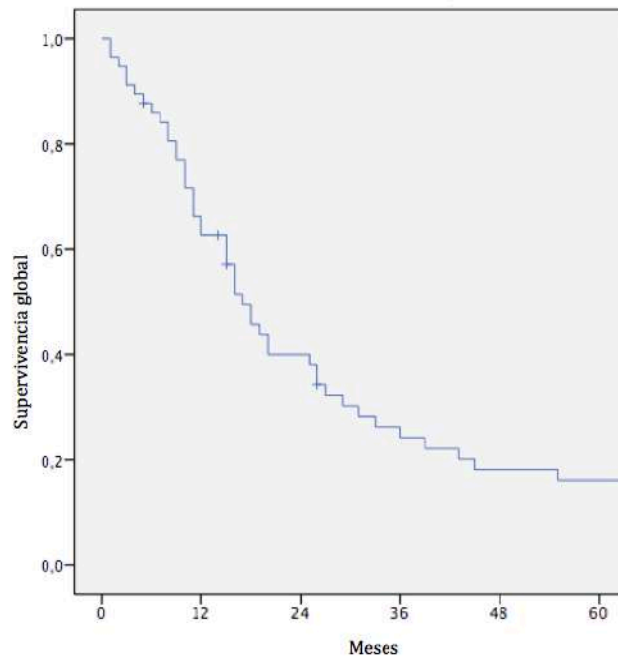
**Tabla 9.** Aspectos clínico-patológicos de los CENS estudiados según la localización tumoral.

		<b>Total n=57 (%)</b>	<b>Maxilar n=49 (86%)</b>	<b>Etmoidal n=8 (14%)</b>
<b>Edad Media</b>	65 años (37-93)			
<b>Género</b>	Hombre		30 (61%)	7 (88%)
	Mujer		19 (39%)	1 (12%)
<b>Estadio</b>	Estadio I		0 (0%)	1 (13%)
	Estadio II		3 (6%)	0 (0%)
	Estadio III		15 (31%)	2 (25%)
	Estadio IVa		22 (45%)	3 (38%)
	Estadio IVb		9 (18%)	2 (25%)
<b>Invasión Intracraneal</b>	Si		7 (14%)	3 (38%)
	No		42 (86%)	5 (63%)
<b>Invasión de la Órbita</b>	Órbita		6 (12%)	1 (13%)
	Periórbita		17 (35%)	2 (25%)
	No		26 (53%)	5 (63%)
<b>Radioterapia</b>	Si		35 (71%)	7 (88%)
	No		14 (29%)	1 (13%)

El tiempo medio de seguimiento fue de 39 meses (rango 1-312 meses). Tras el tratamiento inicial y durante el periodo de seguimiento 44 pacientes (77%) presentaron recidivas y 7 pacientes (12%) presentaron metástasis a distancia que coincidieron con recidivas no tratables.

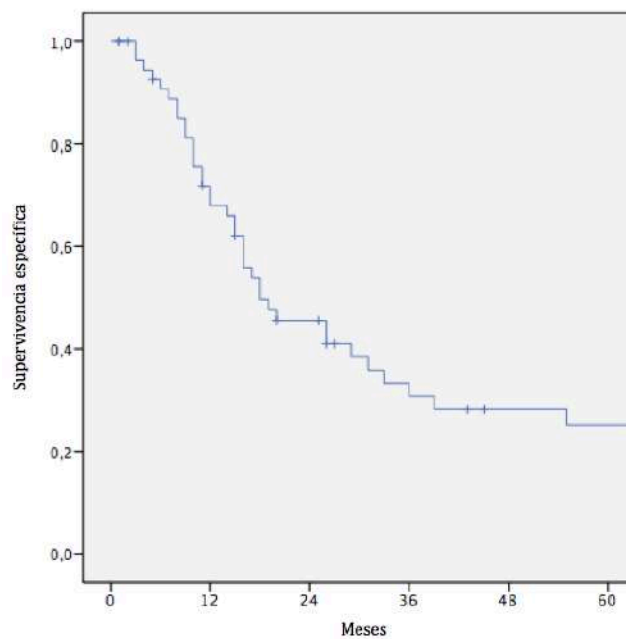
La principal causa de mortalidad en nuestra serie fue la presencia de recidiva local y metástasis a distancia. 49 pacientes (86%) fallecieron durante el seguimiento. De estos, la gran mayoría (41 pacientes; 84%) fallecieron debido a recidivas locales o metástasis a distancia, y 8 pacientes (16%) fallecieron debido a procesos intercurrentes.

La supervivencia global (SG) de los pacientes fue del 24% y del 14% a los 3 y 5 años de seguimiento, respectivamente (*Figura 25*).



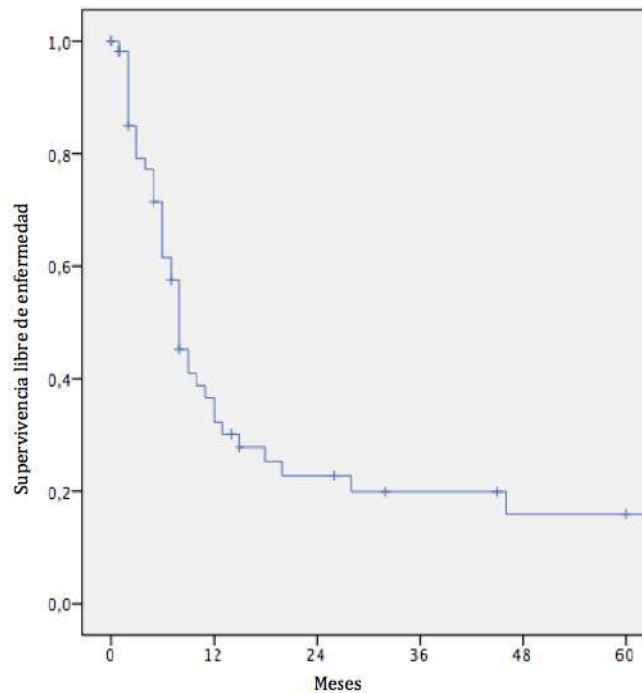
**Figura 25.** Supervivencia global en los CENS.

La supervivencia específica (SE) de los pacientes fue del 30% y del 22% a los 3 y 5 años de seguimiento, respectivamente (*Figura 26*).



**Figura 26.** Supervivencia específica en los CENS.

La supervivencia libre de enfermedad (SLE) fue del 16% y del 11% a los 3 y 5 años respectivamente (*Figura 27*).



**Figura 27.** Supervivencia libre de enfermedad en los CENS.

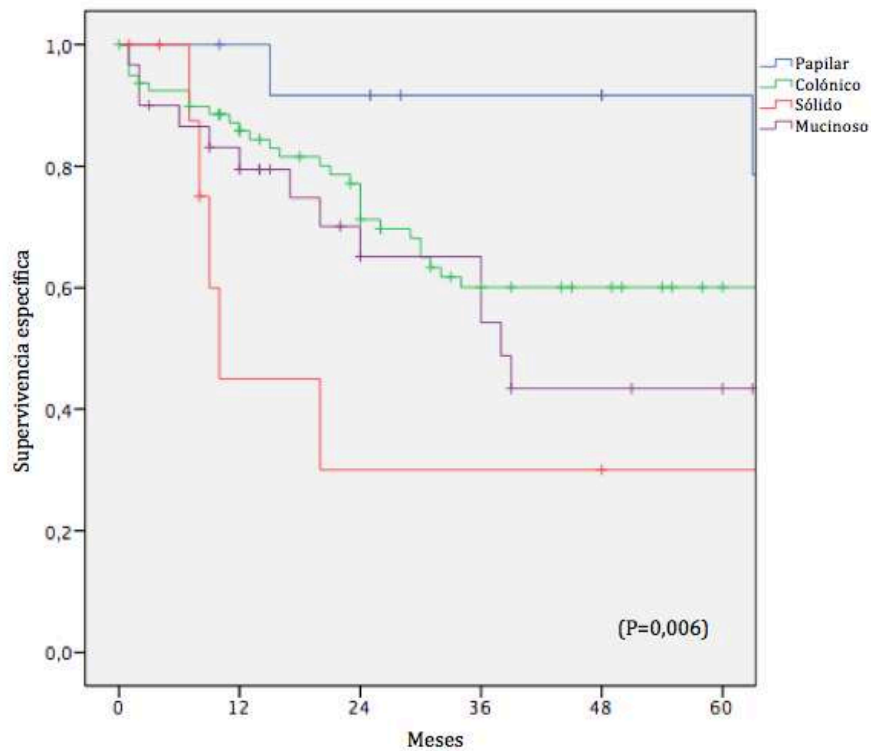
## 5.2. Relaciones entre las variables y las características clínico-patológicas

Se analizó la relación entre la supervivencia y las siguientes características clínico-patológicas:

- 1) El subtipo histológico en los ITAC y la localización tumoral en los CENS
- 2) El estadio tumoral
- 3) La invasión intracraneal
- 4) La presencia de recidivas locorregionales
- 5) El desarrollo de metástasis a distancia

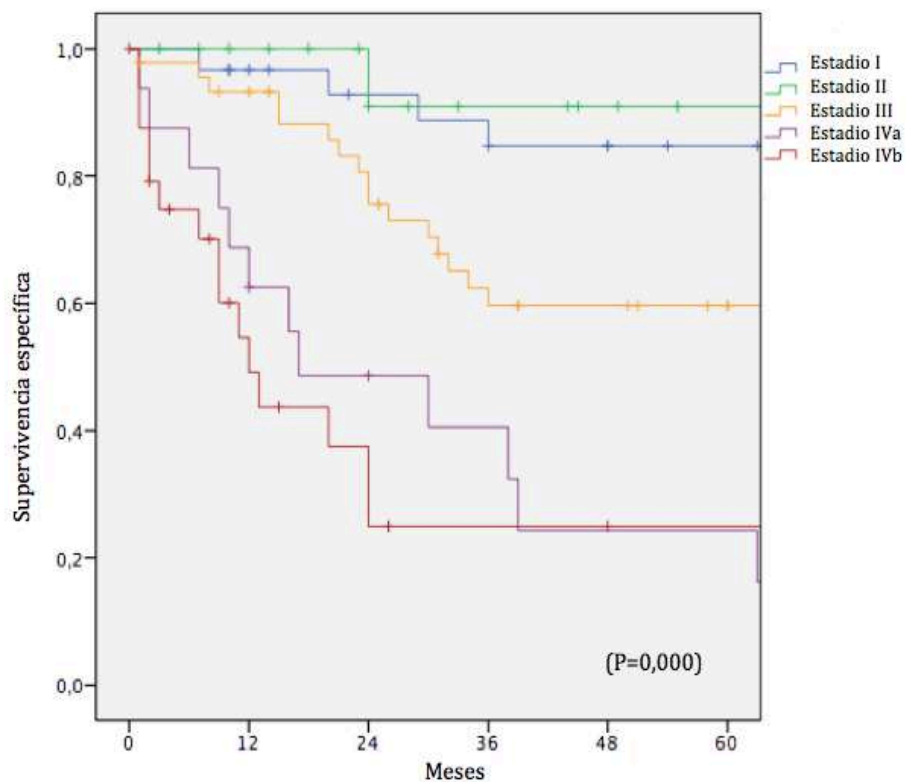
### 5.2.1. En los ITAC

Al analizar la relación entre la supervivencia específica del tumor y el subtipo histológico, observamos que existe una correlación estadísticamente significativa, con mayor supervivencia en los subtipos papilar y colónico, y menor supervivencia en los subtipos sólido y mucinoso (log-rank 12,530;  $p=0,006$ ) (*Figura 28*).



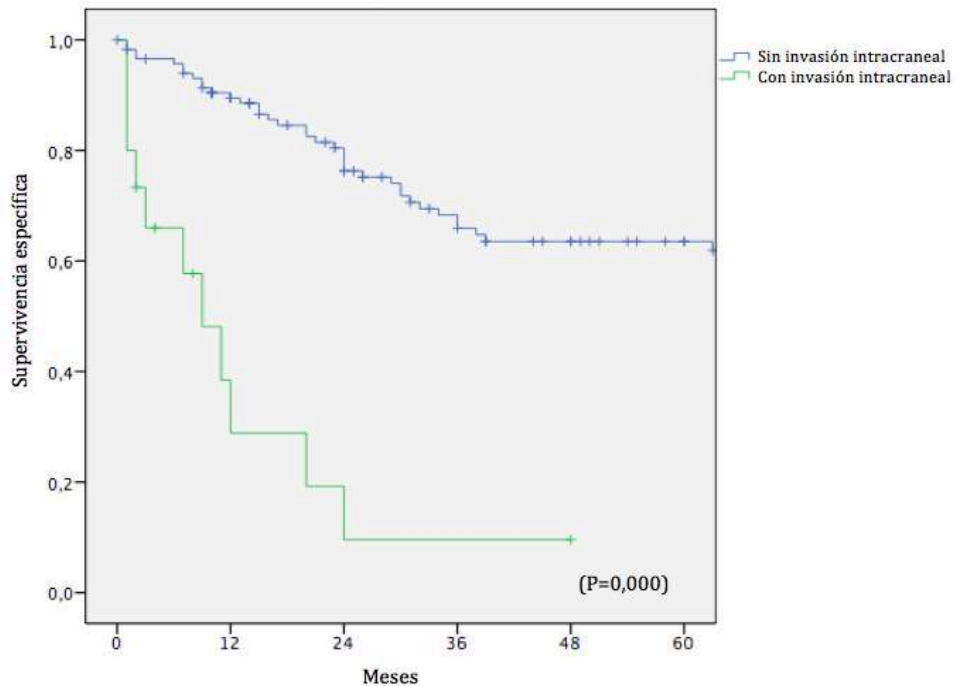
**Figura 28.** Supervivencia específica en los ITAC según el subtipo histológico.

Al analizar la relación entre la supervivencia específica del tumor y el estadio tumoral, observamos que existe una mejor supervivencia en los estadios iniciales (I y II) en comparación con los estadios avanzados (III y IV) (log-rank 48,964;  $P=0,000$ ) (Figura 29).



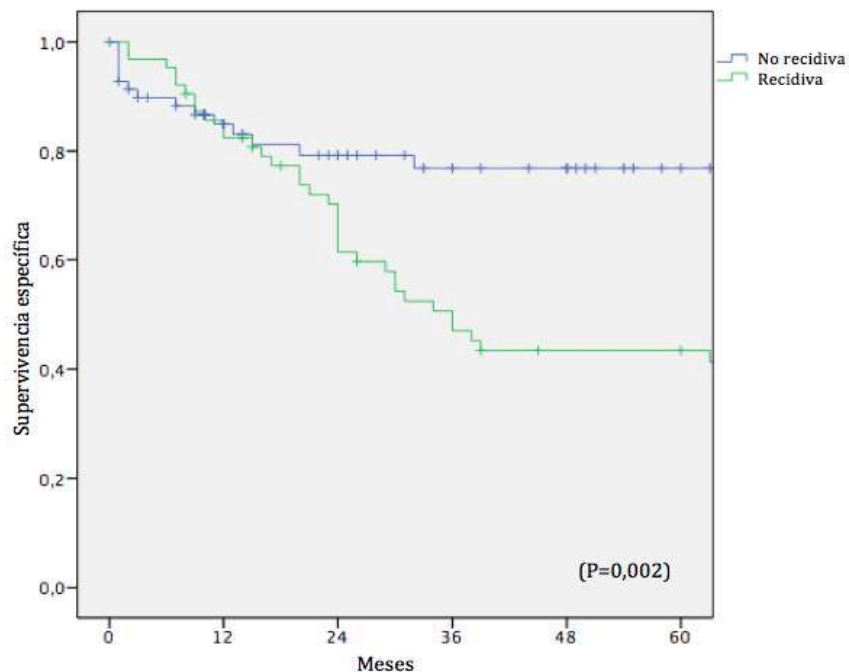
**Figura 29.** Supervivencia específica en los ITAC según el estadio tumoral.

Observamos que existe una correlación estadísticamente significativa entre la invasión intracraneal y el empeoramiento de la supervivencia específica tumoral (log-rank 37,874;  $p=0,000$ ) (Figura 30).



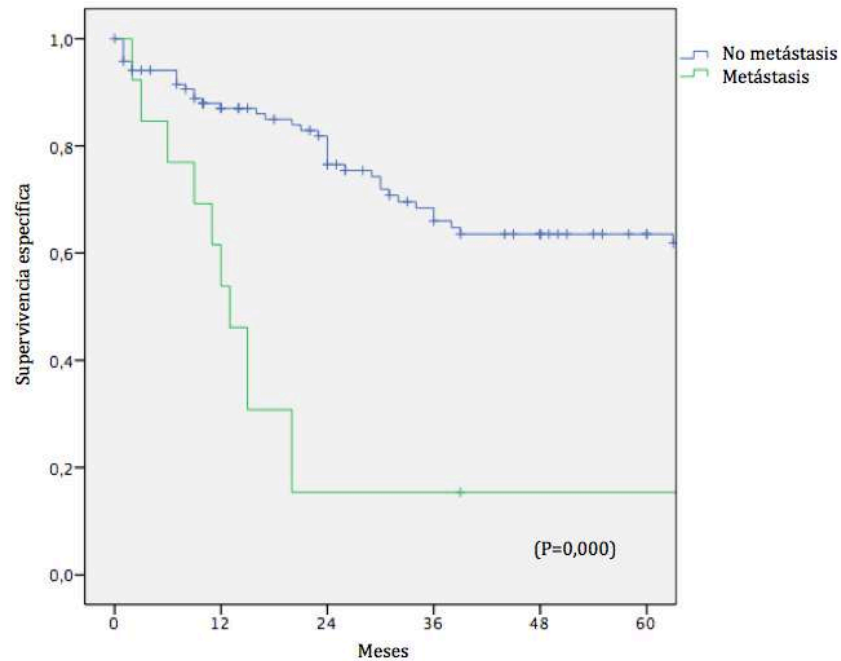
**Figura 30.** Supervivencia específica en los ITAC según la presencia de invasión intracraneal.

El desarrollo de recidivas locorregionales también se correlacionó de forma estadísticamente significativa con un empeoramiento de la supervivencia específica tumoral (log-rank 9,523;  $p=0,002$ ) (Figura 31).



**Figura 31.** Supervivencia específica en los ITAC según el desarrollo de recidiva locorregional.

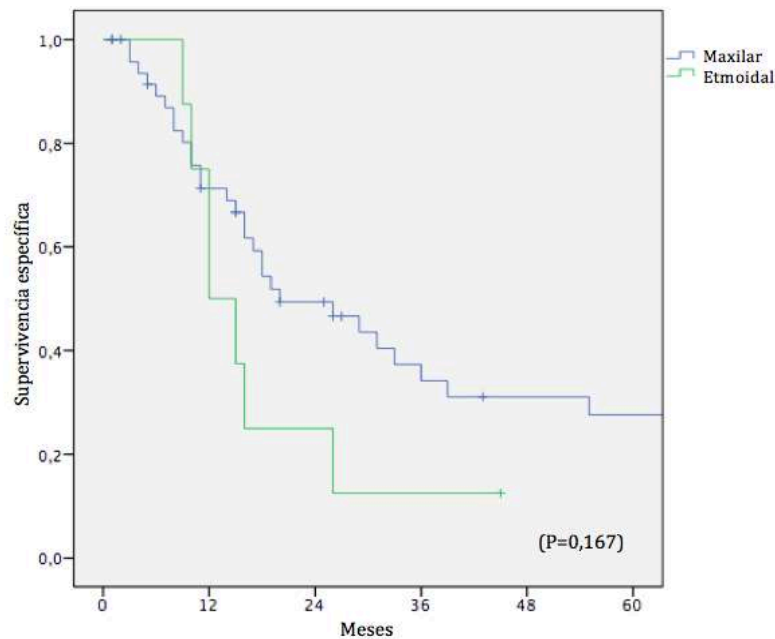
Asimismo, observamos que el desarrollo de metástasis a distancia se relacionó de forma significativa a una peor supervivencia específica tumoral (log-rank 27,521;  $p=0,000$ ) (Figura 32).



**Figura 32.** Supervivencia específica en los ITAC según la presencia de metástasis a distancia.

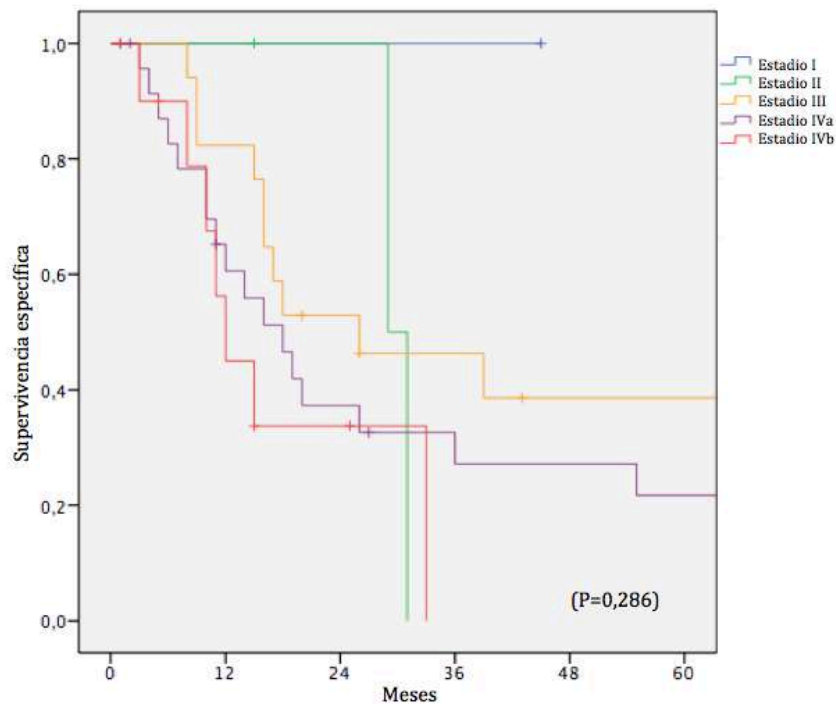
### 5.2.2. En los CENS

Al relacionar la supervivencia específica del tumor con la localización tumoral, no observamos significancia estadística pero sí una tendencia hacia una disminución de la supervivencia en los tumores etmoidales (log-rank 1,908;  $p=0,167$ ) (Figura 33).



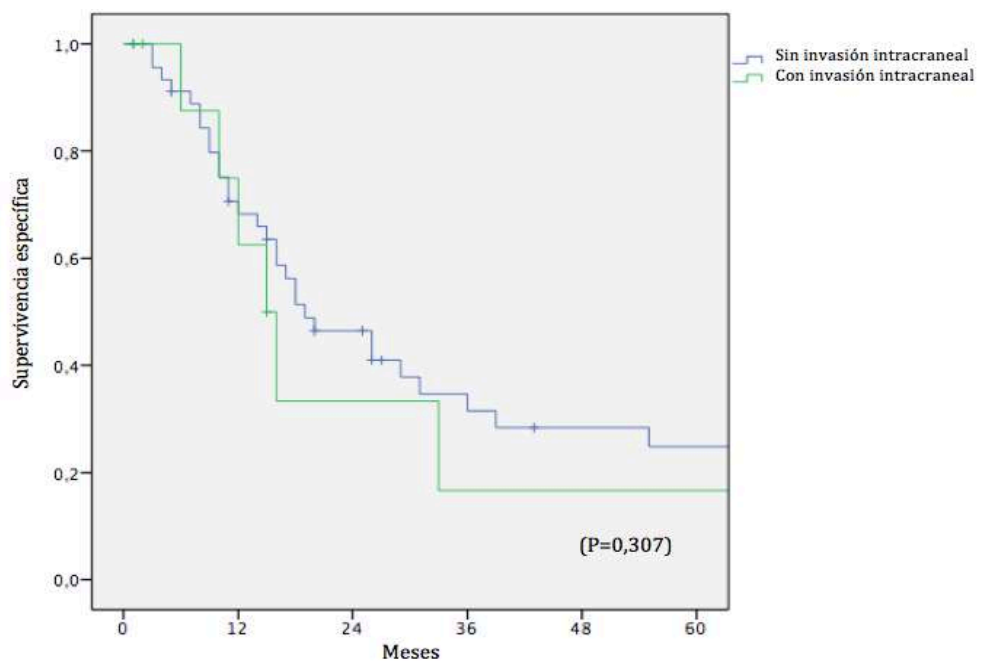
**Figura 33.** Supervivencia específica en los CENS según la localización tumoral.

Al analizar la relación entre la supervivencia específica y el estadio tumoral en los CENS, observamos una tendencia hacia una peor supervivencia en los estadios avanzados (III y IV) pero sin alcanzar significancia estadística (log-rank 5,010;  $p=0,286$ ) (Figura 34).



**Figura 34.** Supervivencia específica en los CENS según el estadio tumoral.

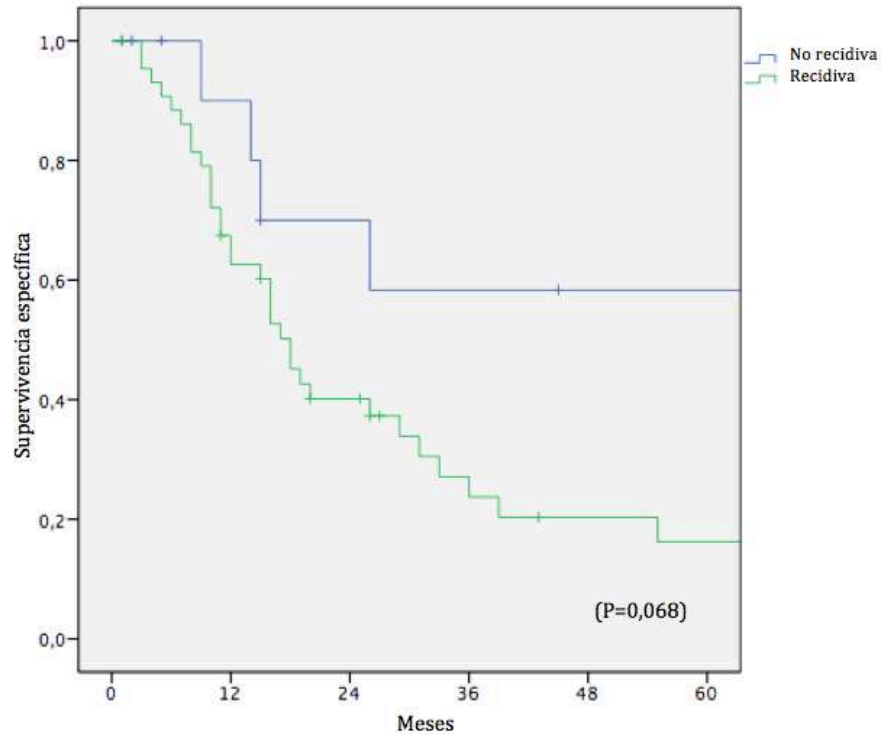
No observamos una correlación estadísticamente significativa entre la invasión intracraneal y la supervivencia específica tumoral pero sí una tendencia hacia una disminución de la supervivencia (log-rank 1,042;  $p=0,307$ ) (Figura 35).



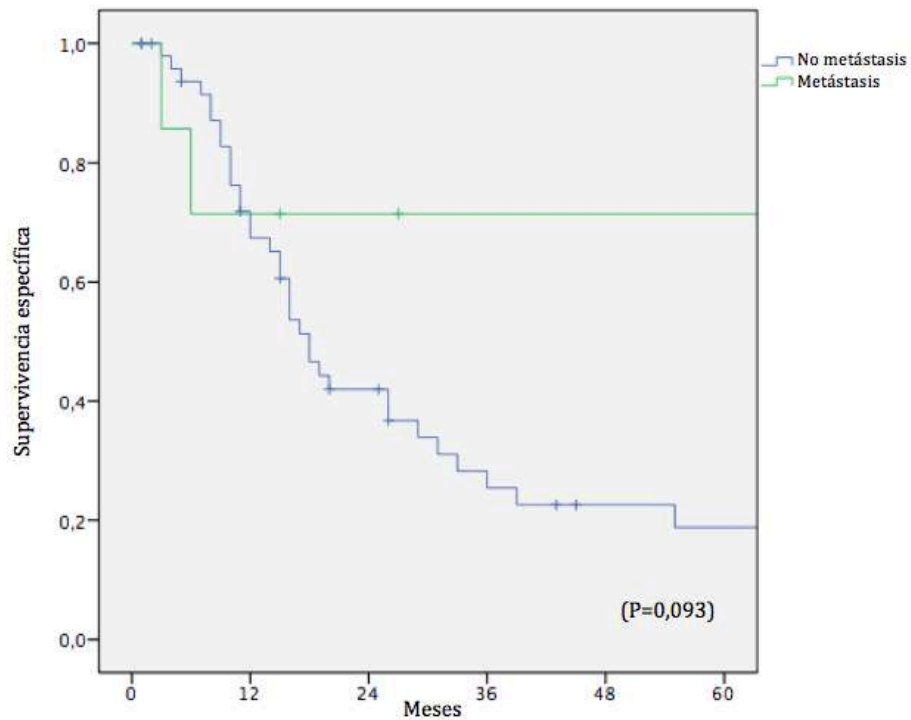
**Figura 35.** Supervivencia específica en los CENS según la presencia de invasión intracraneal.



Tampoco observamos una correlación estadísticamente significativa entre la supervivencia específica tumoral y la presencia de recidiva locorregional (log-rank 3,336;  $p=0,068$ ) (Figura 36) ni la presencia de metástasis a distancia (log-rank 2,828;  $p=0,093$ ) (Figura 37).



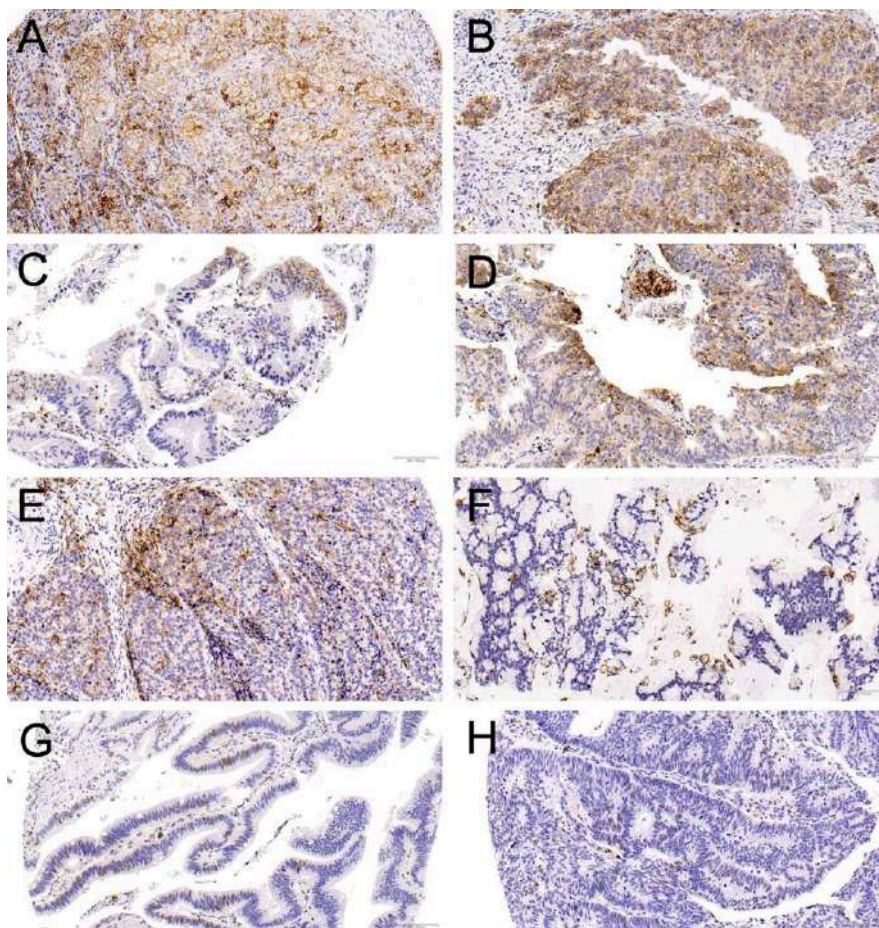
**Figura 36.** Supervivencia específica en los CENS según la presencia de recidiva locorregional.



**Figura 37.** Supervivencia específica en los CENS según la presencia de metástasis a distancia.

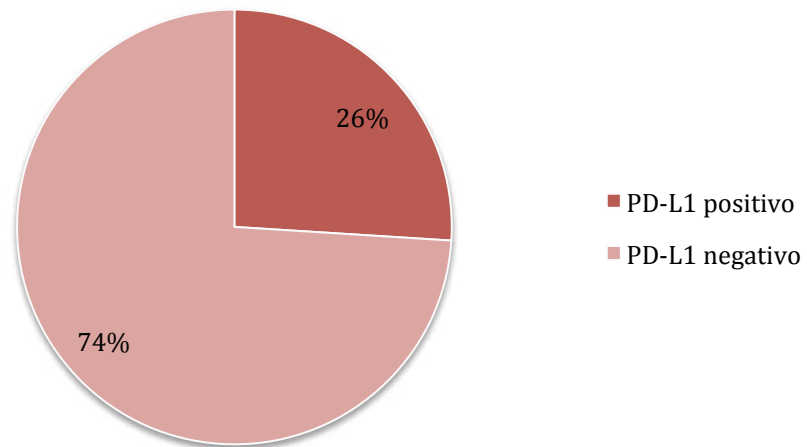
### 5.3. Valoración de la expresión inmunohistoquímica de PD-L1

La tinción de PD-L1 fue mayoritariamente focal en los ITAC y difusa en los CENS (*Figura 38*). Observamos una tinción inmunohistoquímica para PD-L1 en >5% de las células tumorales en el 26% en los ITAC y el 46% en los CENS (*Figuras 39 y 40*).



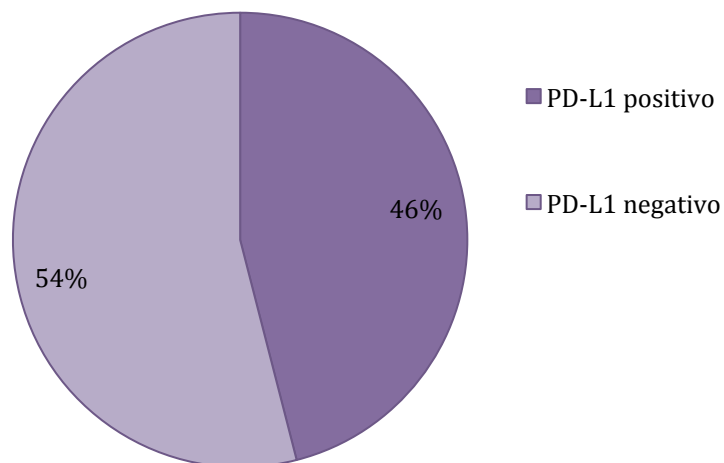
**Figura 38.** Tinción membranosa de PD-L1 en un CENS bien diferenciado (A), un CENS pobremente diferenciado (B), un ITAC de tipo papilar (C), un ITAC de tipo colónico (D), un ITAC de tipo sólido (E) y un ITAC de tipo mucinoso (F). Tinción nuclear de PD-L1 en un ITAC de tipo papilar (G) y en un ITAC de tipo colónico (H).

### 5.3.1. En los ITAC



**Figura 39.** Expresión de PD-L1 en las células tumorales de los ITAC.

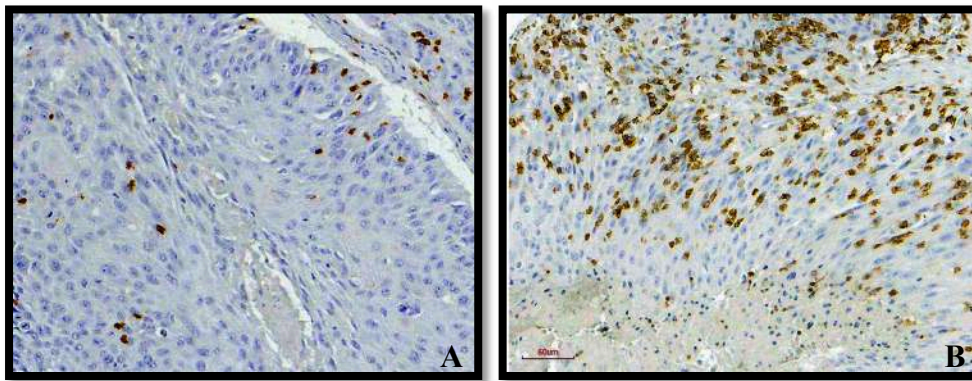
### 5.3.2. En los CENS



**Figura 40.** Expresión de PD-L1 en las células tumorales de los CENS.

## 5.4. Valoración de la presencia de linfocitos CD8+ en el microambiente tumoral

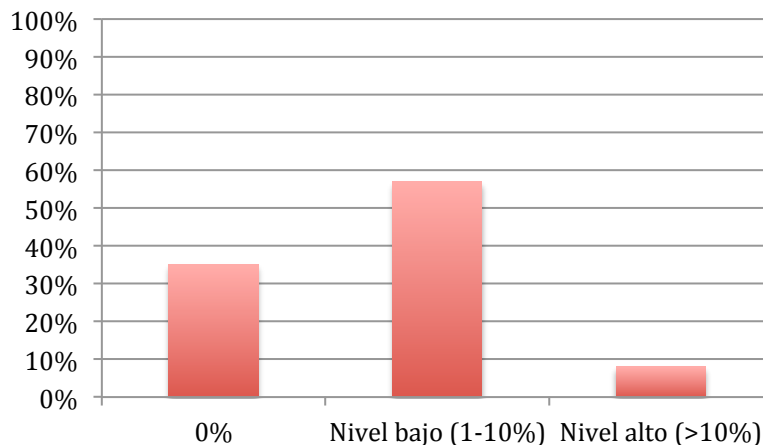
Observamos la presencia de TILs CD8+ intratumorales y estromales (*Figura 41*), pero centramos nuestro estudio en los TILs CD8+ intratumorales dado que observamos que todos los casos con TILs CD8+ intratumorales también presentaban positividad para CD8+ estromal.



**Figura 41.** Nivel bajo (A) y nivel alto (B) de TILs CD8+ en un CENS.

### 5.4.1. En los ITAC

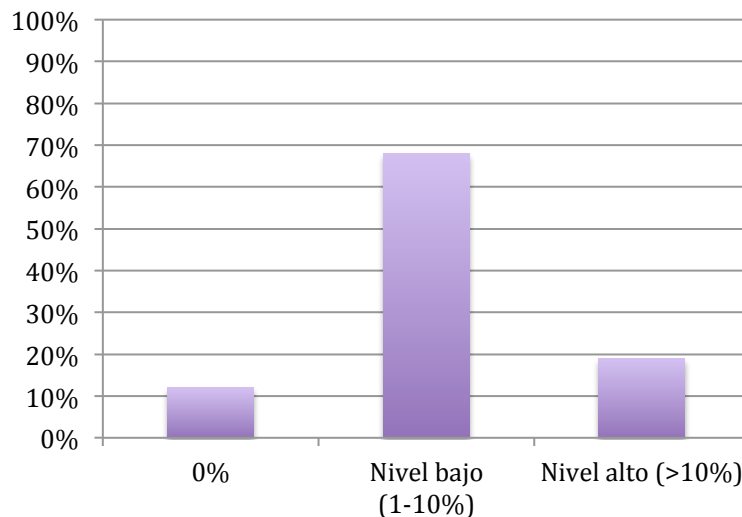
Observamos linfocitos CD8+ intratumorales en el 65% (86/133) de los ITAC; el 57% (76/133) presentaban un nivel bajo de linfocitos CD8+ y el 8% (10/133) un nivel alto (*Figura 42*).



**Figura 42.** Nivel de linfocitos CD8+ en el microambiente tumoral de los ITAC.

### 5.4.2. En los CENS

En los CENS observamos un mayor número de linfocitos CD8+ intratumorales que en los ITAC (88%; 50/57). El 69% (39/57) presentaban niveles bajos de linfocitos CD8+ y el 19% (11/57) presentaban niveles altos (*Figura 43*).



**Figura 43.** Nivel de linfocitos CD8+ en el microambiente tumoral de los CENS.

## 5.5. Significado clínico-patológico de la expresión de PD-L1

### 5.5.1. En los ITAC

La correlación entre la expresión tumoral de PD-L1 en los ITAC y el estadio tumoral, el subtipo histológico, la presencia de recidiva, el desarrollo de metástasis a distancia, la invasión intracraneal y la afectación orbitaria se muestra en la *Tabla 10*.

Observamos una correlación estadísticamente significativa entre la ausencia de expresión tumoral de PD-L1 y la aparición de recidivas tumorales ( $p=0,028$ ), mientras que el resto de variables clínico-patológicas estudiadas no se relacionaron de forma estadísticamente significativa con la expresión tumoral de PD-L1.

**Tabla 10.** Relación entre la expresión de PD-L1 y las variables clínico-patológicas estudiadas.

Variables	N° de casos (%)	Expresión tumoral de PD-L1		P
		Negativa	Positiva	
<b>Género</b>				
Mujer	2 (2)	2 (2)	0 (0)	0,394
Hombre	131 (98)	96 (98)	35 (100)	
<b>Estadio</b>				
I	30 (23)	21 (21)	9 (26)	0,736 <sup>a</sup>
II	17 (13)	13 (13)	4 (11)	
III	45 (34)	33 (34)	12 (34)	
IVa	16 (12)	10 (10)	6 (17)	
IVb	25 (19)	21 (21)	4 (11)	
<b>Subtipo histológico</b>				
Papilar	13 (10)	8 (8)	5 (14)	0,278 <sup>b</sup>
Colónico	80 (60)	58 (59)	22 (63)	
Sólido	10 (8)	5 (5)	5 (14)	
Mucinoso	30 (23)	27 (28)	3 (9)	
<b>Recidiva</b>				
No	70 (53)	46 (47)	24 (69)	0,028
Si	63 (47)	52 (53)	11 (31)	
<b>Metástasis</b>				
No	120 (90)	86 (88)	34 (97)	0,108
Si	13 (10)	12 (12)	1 (3)	
<b>Invasión Intracraneal</b>				
No	118 (89)	84 (86)	34 (97)	0,067
Si	15 (11)	14 (14)	1 (3)	
<b>Afectación Orbitaria</b>				
No	129 (97)	94 (96)	35 (100)	0,225
Si	4 (3)	4 (4)	0 (0)	

a: Chi<sup>2</sup> comparando los estadios tumorales I-III con IVa-IVb

b: Chi<sup>2</sup> comparando los subtipos histológicos papilar-colónico con sólido-mucinoso

### 5.5.2. En los CENS

En la *Tabla 11* se representa la correlación entre la expresión tumoral de PD-L1 en los CENS y las variables clínico-patológicas estudiadas. Como se puede apreciar, no hemos observado diferencias estadísticamente significativas en la expresión tumoral de PD-L1 según el sexo, el estadio tumoral, la localización tumoral, el grado histológico, la aparición de recidiva, la presencia de metástasis a distancia, la invasión intracraneal ni la afectación orbitaria. Sin embargo, observamos que aquellos pacientes con expresión tumoral de PD-L1 tenían tendencia a presentar más recidivas que los pacientes sin expresión tumoral de PD-L1 (p=0,063), al contrario que en los ITAC.

**Tabla 11.** Relación entre la expresión de PD-L1 y las variables clínico-patológicas estudiadas.

Variables	Nº de casos (%)	Expresión tumoral de PD-L1		P
		Negativa	Positiva	
<b>Género</b>				
Mujer	20 (35)	9 (29)	11 (42)	0,296
Hombre	37 (65)	22 (71)	15 (58)	
<b>Estadio</b>				
I	1 (2)	1 (3)	0 (0)	0,155 <sup>a</sup>
II	3 (5)	3 (10)	0 (0)	
III	17 (30)	10 (32)	7 (27)	
IVa	25 (44)	11 (36)	14 (54)	
IVb	11 (19)	6 (19)	5 (19)	
<b>Localización tumoral</b>				
Maxilar	49 (86)	25 (80)	24 (92)	0,207
Etmoidal	8 (14)	6 (19)	2 (8)	
<b>Grado histológico</b>				
Bien diferenciado	22 (39)	11 (36)	11 (42)	0,266 <sup>b</sup>
Moderadamente diferenciado	13 (23)	6 (19)	7 (27)	
Pobrementemente diferenciado	22 (39)	14 (45)	8 (31)	
<b>Recidiva</b>				
No	13 (23)	10 (32)	3 (12)	0,063
Si	44 (77)	21 (68)	23 (89)	
<b>Metástasis</b>				
No	50 (88)	28 (90)	22 (85)	0,513
Si	7 (12)	3 (10)	4 (15)	
<b>Invasión Intracraneal</b>				
No	46 (82)	26 (87)	20 (77)	0,342
Si	10 (18)	4 (13)	6 (23)	
<b>Afectación Orbitaria</b>				
No	30 (54)	18 (60)	12 (46)	0,300
Si	26 (46)	12 (40)	14 (54)	

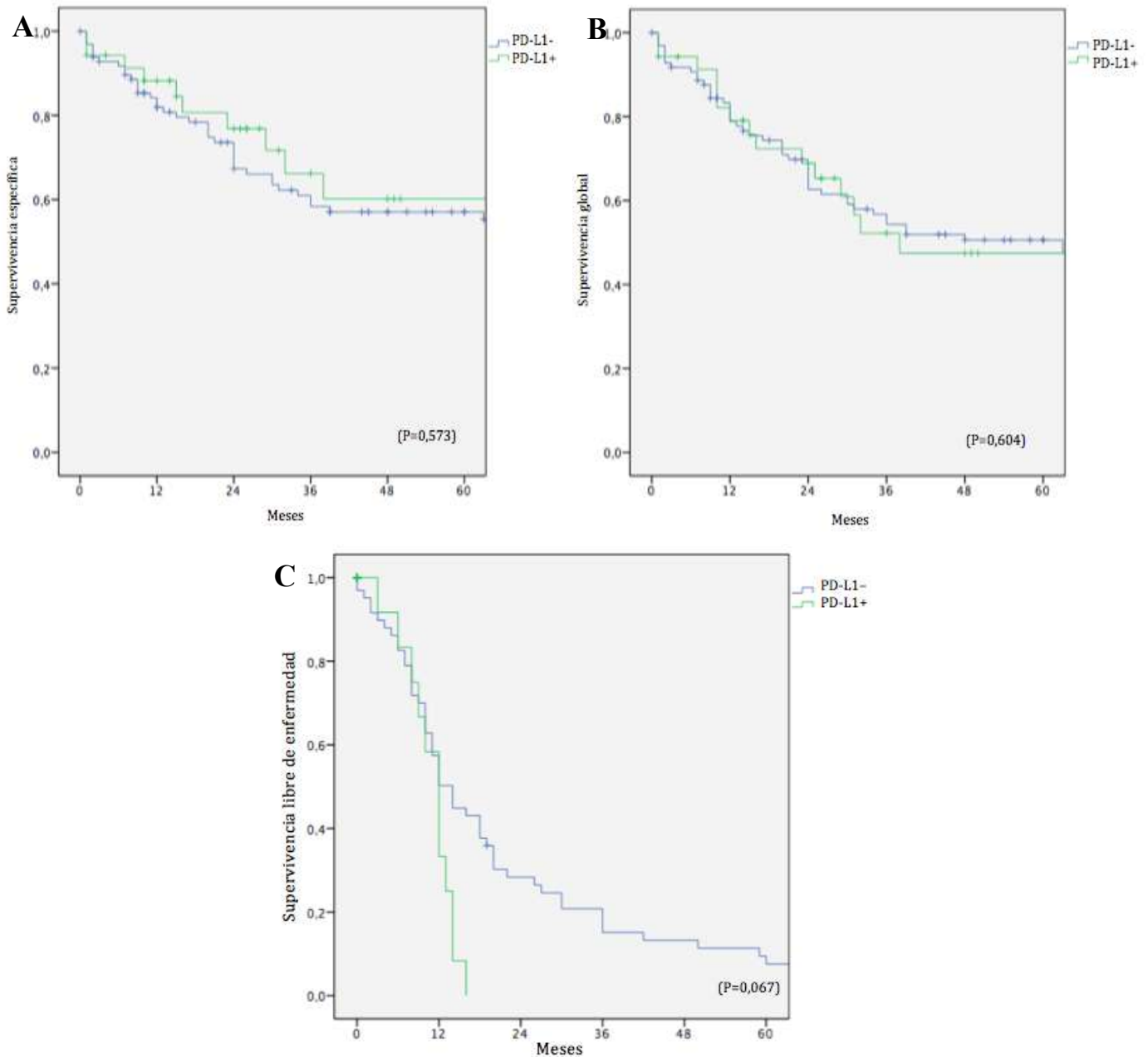
a: Chi<sup>2</sup> comparando los estadios tumorales I-III con IVa-IVb

b: Chi<sup>2</sup> comparando los grados histológicos bien y moderadamente diferenciados con los pobrementemente diferenciados

## 5.6. Relación entre la expresión de PD-L1 y el curso de la enfermedad

### 5.6.1. En los ITAC

Al analizar la relación entre la supervivencia y la expresión tumoral de PD-L1, no observamos diferencias estadísticamente significativas en la SE (log-rank 0,317;  $p=0,573$ ), en la SG (log-rank 0,268;  $p=0,604$ ) ni en la SLE (log-rank 3,353;  $p=0,067$ ) (Figura 44).

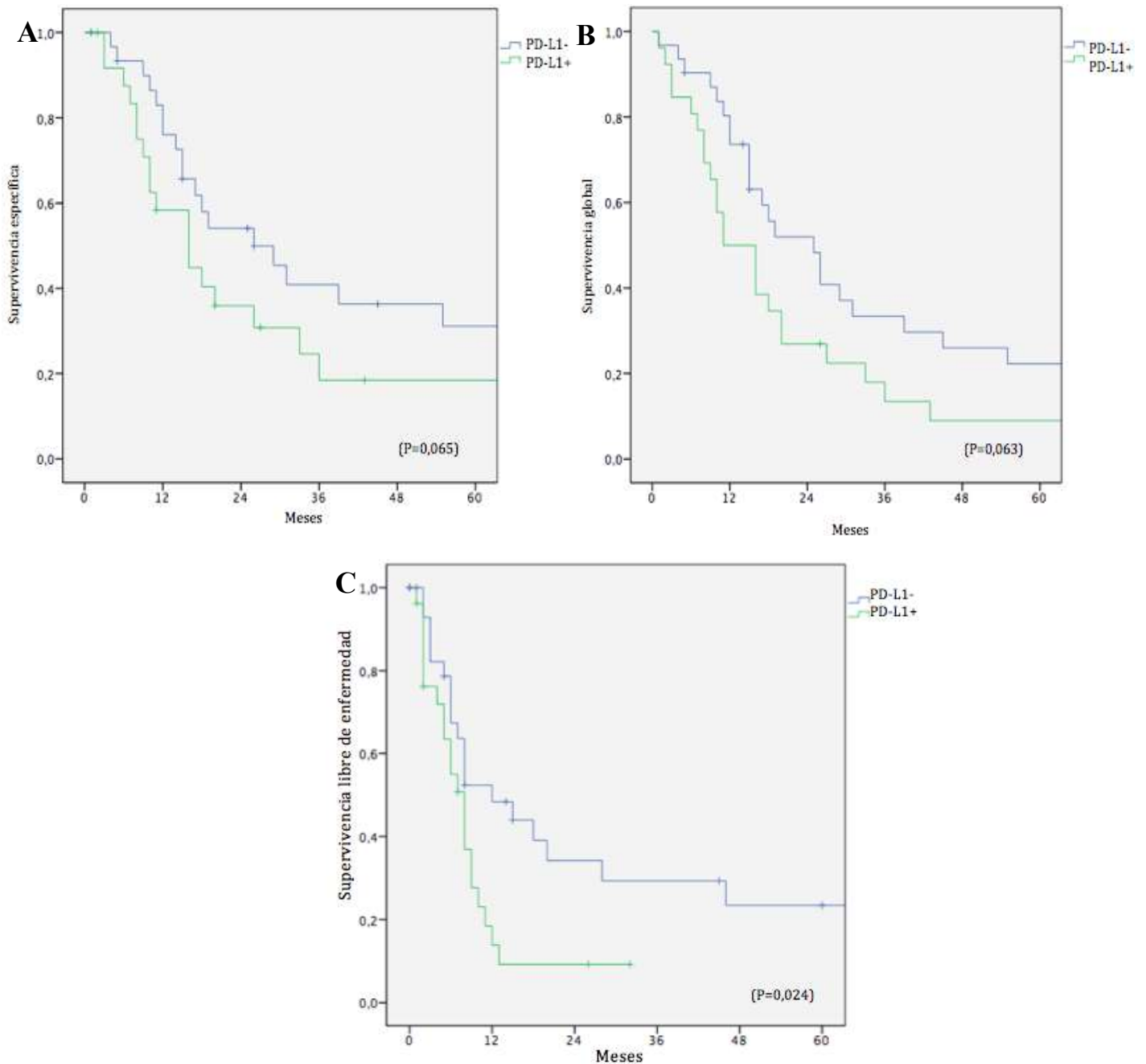


**Figura 44.** A) Relación entre la SE en los ITAC y la expresión tumoral de PD-L1. B) Relación entre la SG en los ITAC y la expresión tumoral de PD-L1. C) Relación entre la SLE en los ITAC y la expresión tumoral de PD-L1.



### 5.6.2. En los CENS

En el caso de los CENS tampoco observamos una asociación estadísticamente significativa entre la expresión tumoral de PD-L1 y la SE (log-rank 3,412;  $p=0,065$ ) y SG (log-rank 3,453;  $p=0,063$ ), pero sí una mejor SLE en los tumores PD-L1- (log-rank 5,077;  $p=0,024$ ), así como una tendencia hacia una disminución de la SG y SE en los tumores PD-L1+ (Figura 45).



**Figura 45.** A) Relación entre la SE en los CENS y la expresión tumoral de PD-L1. B) Relación entre la SG en los CENS y la expresión tumoral de PD-L1. C) Relación entre la SLE en los CENS y la expresión tumoral de PD-L1.

## 5.7. Significado clínico-patológico del nivel de TILs CD8+

### 5.7.1. En los ITAC

Representamos en la *Tabla 12* la correlación entre el nivel de TILs CD8+ en los ITAC y las variables clínico-patológicas estudiadas. Aunque no existe ninguna relación estadísticamente significativa, los tumores con niveles altos de TILs CD8+ presentaron menos recidivas ( $p=0,165$ ) y menos metástasis a distancia ( $p=0,249$ ).

**Tabla 12.** Relación entre el número de TILs CD8+ y las variables clínico-patológicas estudiadas.

Variables	Nº de casos (%)	Nivel de TILs CD8+			P
		0%	Bajo (1-10%)	Alto (>10%)	
<b>Género</b>					
Mujer	2 (2)	0 (0)	2 (3)	0 (0)	0,467
Hombre	131 (98)	47 (100)	74 (98)	10 (100)	
<b>Estadio</b>					
I	30 (23)	12 (26)	18 (24)	0 (0)	0,696 <sup>a</sup>
II	17 (13)	5 (11)	8 (11)	4 (40)	
III	45 (34)	16 (34)	25 (33)	4 (40)	
IVa	16 (12)	8 (17)	6 (8)	2 (20)	
IVb	25 (19)	6 (13)	19 (25)	0 (0)	
<b>Subtipo histológico</b>					
Papilar	13 (10)	3 (6)	9 (12)	1 (10)	0,007 <sup>b</sup>
Colónico	80 (60)	23 (49)	48 (63)	9 (90)	
Sólido	10 (8)	3 (6)	7 (9)	0 (0)	
Mucinoso	30 (23)	18 (38)	12 (16)	0 (0)	
<b>Recidiva</b>					
No	70 (53)	20 (43)	43 (57)	7 (70)	0,165
Si	63 (47)	27 (57)	33 (43)	3 (30)	
<b>Metástasis</b>					
No	120 (90)	40 (85)	70 (92)	10 (100)	0,249
Si	13 (10)	7 (15)	6 (8)	0 (0)	
<b>Invasión Intracraneal</b>					0,459
No	118 (89)	42 (89)	66 (87)	10 (100)	
Si	15 (11)	5 (11)	10 (13)	0 (0)	
<b>Afectación Orbitaria</b>					
No	129 (97)	46 (98)	73 (96)	10 (100)	0,717
Si	4 (3)	1 (2)	3 (4)	0 (0)	

a: Chi<sup>2</sup> comparando los estadios tumorales I-III con IVa-IVb

b: Chi<sup>2</sup> comparando los subtipos histológicos papilar-colónico con sólido-mucinoso

### 5.7.2. En los CENS

En la *Tabla 13* se presenta la relación entre el nivel de TILs CD8+ en los CENS y las variables clínico-patológicas estudiadas. No se observaron relaciones estadísticamente significativas, sin embargo de los 11 casos con niveles altos de TILs CD8+, todos presentaron recidivas ( $p=0,084$ ) y el 82% eran tumores en estadio IV ( $p=0,231$ ).

**Tabla 13.** Relación entre el número de TILs CD8+ y las variables clínico-patológicas.

Variables	Nº de casos (%)	Nivel de TILs CD8+			P
		0%	Bajo (1-10%)	Alto (>10%)	
<b>Género</b>					
Mujer	20 (35)	4 (57)	11 (28)	5 (46)	0,244
Hombre	37 (65)	3 (43)	28 (72)	6 (55)	
<b>Estadio</b>					
I	1 (2)	0 (0)	1 (3)	0 (0)	0,231 <sup>a</sup>
II	3 (5)	0 (0)	3 (8)	0 (0)	
III	17 (30)	4 (57)	11 (28)	2 (18)	
IVa	25 (44)	3 (43)	15 (39)	7 (64)	
IVb	11 (19)	0 (0)	9 (23)	2 (18)	
<b>Localización tumoral</b>					
Maxilar	49 (86)	7 (100)	31 (80)	11 (100)	0,117
Etmoidal	8 (14)	0 (0)	8 (20)	0 (0)	
<b>Grado histológico</b>					
Bien diferenciado	22 (39)	2 (29)	15 (39)	5 (46)	0,560 <sup>b</sup>
Moderadamente diferenciado	13 (23)	1 (14)	10 (26)	2 (18)	
Pobremente diferenciado	22 (39)	4 (57)	14 (36)	4 (36)	
<b>Recidiva</b>					
No	13 (23)	1 (14)	12 (31)	0 (0)	0,084
Si	44 (77)	6 (86)	27 (69)	11 (100)	
<b>Metástasis</b>					
No	50 (88)	5 (71)	35 (90)	10 (91)	0,372
Si	7 (12)	2 (29)	4 (10)	1 (9)	
<b>Invasión Intracraneal</b>					
No	47 (82)	7 (100)	30 (77)	10 (91)	0,226
Si	10 (18)	0 (0)	9 (23)	1 (9)	
<b>Afectación Orbitaria</b>					
No	31 (54)	3 (43)	23 (59)	5 (46)	0,638
Si	26 (46)	4 (57)	16 (41)	6 (54)	

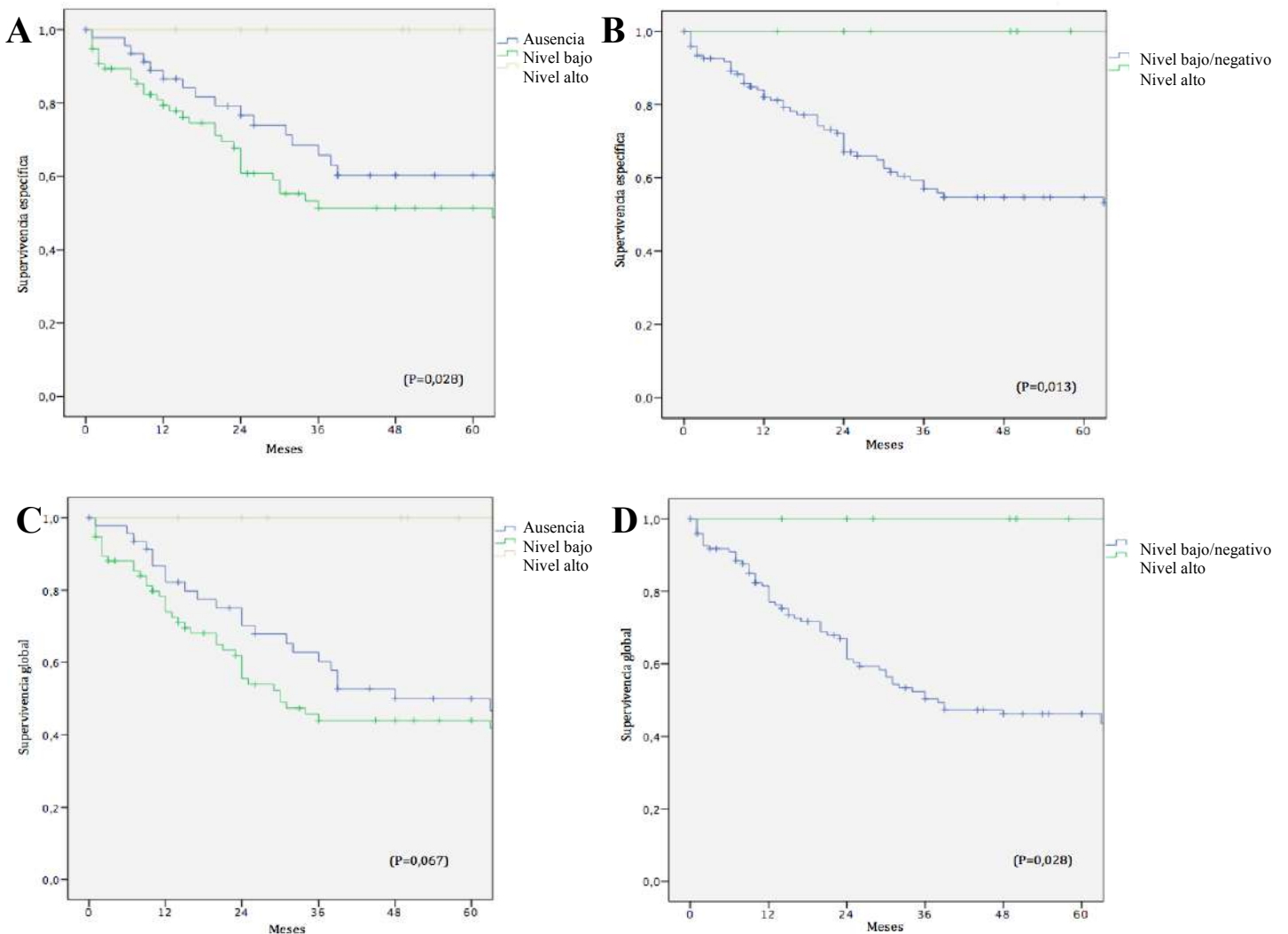
a: Chi<sup>2</sup> comparando los estadios tumorales I-III con IVa-IVb

b: Chi<sup>2</sup> comparando los grados histológicos bien y moderadamente diferenciados con los pobremente diferenciados

## 5.8. Relación entre el nivel de TILs CD8+ y el curso de la enfermedad

### 5.8.1. En los ITAC

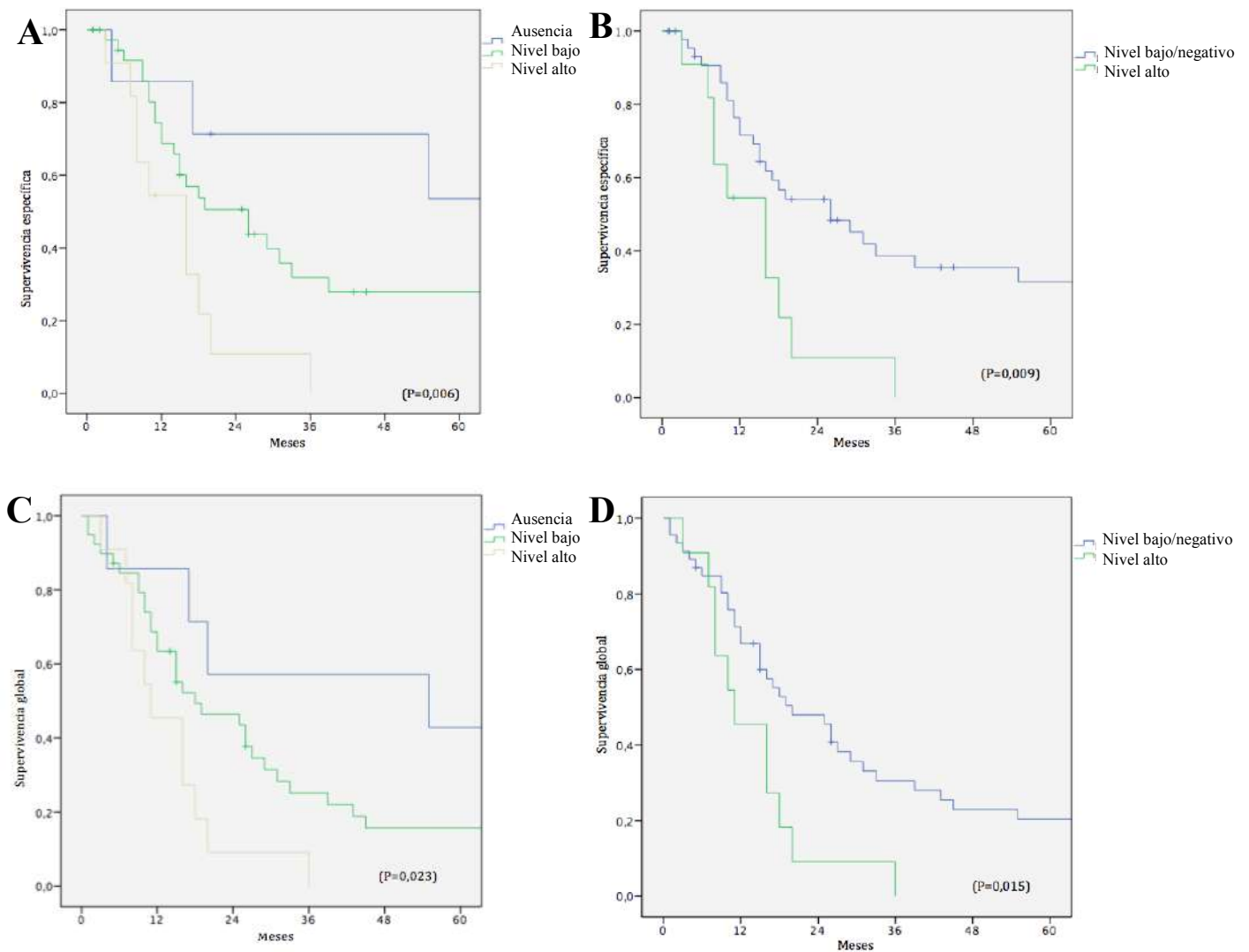
Al relacionar la SE a los 5 años con el nivel de TILs CD8+, observamos un aumento en la supervivencia en los casos con niveles altos de TILs CD8+ comparado con los casos con niveles bajos/ausencia de TILs CD8+; 100% frente al 55%, respectivamente (log-rank 6,161;  $p=0,013$ ) (Figura 46B). Asimismo, la SG a los 5 años fue superior en los casos con niveles altos de TILs CD8+ comparado con los casos con niveles bajos/ausencia de TILs CD8+, 100% frente al 46%, respectivamente (log-rank 4,829;  $p=0,028$ ) (Figura 46D).



**Figura 46.** A) Relación entre la SE en los ITAC y el nivel de TILs CD8+. B) SE en los ITAC con niveles altos de TILs CD8+ comparado con los niveles bajos/ausencia. C) Relación entre la SG en los ITAC y el nivel de linfocitos CD8+. D) SG en los ITAC con niveles altos de TILs CD8+ comparado con los niveles bajos/ausencia.

### 5.8.2. En los CENS

Al contrario que en los ITAC, en los CENS observamos una relación inversa entre el nivel de TILs CD8+ y la SE y SG (Figuras 47A y C). Observamos un empeoramiento en la SE (log-rank 6,903;  $p=0,009$ ) y en la SG (log-rank 5,958;  $p=0,015$ ) en los casos con niveles altos de TILs CD8+ comparado con los casos con niveles bajos/ausencia de TILs CD8+ (Figuras 47B y D).



**Figura 47.** A) Relación entre la SE en los CENS y el nivel de linfocitos CD8+. B) SE en los CENS con niveles altos de TILs CD8+ comparado con los niveles bajos/ausencia. C) Relación entre la SG en los CENS y el nivel de linfocitos CD8+. D) SG en los CENS con niveles altos de TILs CD8+ comparado con los niveles bajos/ausencia.

## 5.9. Significado clínico-patológico del tipo de microambiente tumoral

### 5.9.1. En los ITAC

Exponemos en las *Tablas 14 y 15* la correlación ente el tipo de microambiente tumoral y las variables clínico-patológicas estudiadas en los ITAC y CENS, respectivamente.

**Tabla 14.** Relación entre el tipo de microambiente tumoral y las variables clínico-patológicas estudiadas.

Variables	N° de casos (%)	Tipo de microambiente tumoral				P
		I (CD8 <sup>alto</sup> / PD-L1 <sup>+</sup> )	II (CD8 <sup>bajo</sup> / PD-L1 <sup>-</sup> )	III (CD8 <sup>bajo</sup> / PD-L1 <sup>+</sup> )	IV (CD8 <sup>alto</sup> / PD-L1 <sup>-</sup> )	
<b>Género</b>						
Mujer	2 (2)	0 (0)	2 (2)	0 (0)	0 (0)	0,854
Hombre	131 (98)	8 (100)	94 (98)	27 (100)	2 (100)	
<b>Estadio</b>						
I	30 (23)	0 (0)	21 (22)	9 (33)	0 (0)	0,769 <sup>a</sup>
II	17 (13)	4 (50)	13 (14)	0 (0)	0 (0)	
III	45 (34)	2 (25)	31 (32)	10 (37)	2 (100)	
IVa	16 (12)	2 (25)	10 (10)	4 (15)	0 (0)	
IVb	25 (19)	0 (0)	21 (22)	4 (15)	0 (0)	
<b>Subtipo histológico</b>						
Papilar	13 (10)	1 (12)	8 (8)	4 (15)	0 (0)	0,188 <sup>b</sup>
Colónico	80 (60)	7 (88)	56 (58)	15 (56)	2 (100)	
Sólido	10 (8)	0 (0)	5 (5)	5 (19)	0 (0)	
Mucinoso	30 (23)	0 (0)	27 (28)	3 (11)	0 (0)	
<b>Recidiva</b>						
No	70 (53)	6 (75)	45 (47)	18 (67)	1 (50)	0,170
Si	63 (47)	2 (25)	51 (53)	9 (33)	1 (50)	
<b>Metástasis</b>						
No	120 (90)	8 (100)	84 (88)	26 (96)	2 (100)	0,389
Si	13 (10)	0 (0)	12 (12)	1 (4)	0 (0)	
<b>Invasión Intracraneal</b>						
No	118 (89)	8 (100)	82 (85)	26 (96)	2 (100)	0,276
Si	15 (11)	0 (0)	14 (15)	1 (4)	0 (0)	
<b>Afectación Orbitaria</b>						
No	129 (97)	8 (100)	92 (96)	27 (100)	2 (100)	0,662
Si	4 (3)	0 (0)	4 (4)	0 (0)	0 (0)	

a: Chi<sup>2</sup> comparando los estadios tumorales I-III con IVa-IVb

b: Chi<sup>2</sup> comparando los subtipos histológicos papilar-colónico con sólido-mucinoso

### 5.9.2. En los CENS

**Tabla 15.** Relación entre el tipo de microambiente tumoral y las variables clínico-patológicas estudiadas.

Variables	Nº de casos (%)	Tipo de microambiente tumoral				P
		I (CD8 <sup>alto</sup> / PD-L1 <sup>+</sup> )	II (CD8 <sup>bajo</sup> / PD-L1 <sup>-</sup> )	III (CD8 <sup>bajo</sup> / PD-L1 <sup>+</sup> )	IV (CD8 <sup>alto</sup> / PD-L1 <sup>-</sup> )	
<b>Género</b>						
Mujer	20 (35)	5 (45)	9 (29)	6 (40)	0 (0)	0,555
Hombre	37 (65)	6 (55)	22 (71)	9 (60)	0 (0)	
<b>Estadio</b>						
I	1 (2)	0 (0)	1 (3)	0 (0)	0 (0)	0,266 <sup>a</sup>
II	3 (5)	0 (0)	3 (10)	0 (0)	0 (0)	
III	17 (30)	2 (18)	10 (32)	5 (33)	0 (0)	
IVa	25 (44)	7 (64)	11 (36)	7 (47)	0 (0)	
IVb	11 (19)	2 (18)	6 (19)	3 (20)	0 (0)	
<b>Localización tumoral</b>						
Maxilar	49 (86)	11 (100)	25 (81)	13 (87)	0 (0)	0,282
Etmoidal	8 (14)	0 (0)	6 (19)	2 (13)	0 (0)	
<b>Grado histológico</b>						
Bien diferenciado	22 (39)	4 (36)	14 (45)	4 (27)	0 (0)	0,475 <sup>b</sup>
Moderadamente diferenciado	13 (23)	2 (18)	6 (19)	5 (33)	0 (0)	
Pobrementemente diferenciado	22 (39)	5 (46)	11 (36)	6 (40)	0 (0)	
<b>Recidiva</b>						
No	1 (14)	0 (0)	10 (32)	3 (20)	0 (0)	0,087
Si	6 (86)	11 (100)	21 (68)	12 (80)	0 (0)	
<b>Metástasis</b>						
No	5 (71)	10 (91)	28 (90)	12 (80)	0 (0)	0,569
Si	2 (29)	1 (9)	3 (10)	3 (20)	0 (0)	
<b>Invasión Intracraneal</b>						
No	7 (100)	10 (91)	26 (87)	10 (67)	0 (0)	0,179
Si	0 (0)	1 (9)	4 (13)	5 (33)	0 (0)	
<b>Afectación Orbitaria</b>						
No	3 (43)	5 (45)	18 (60)	7 (47)	0 (0)	0,584
Si	4 (57)	6 (55)	12 (40)	8 (53)	0 (0)	

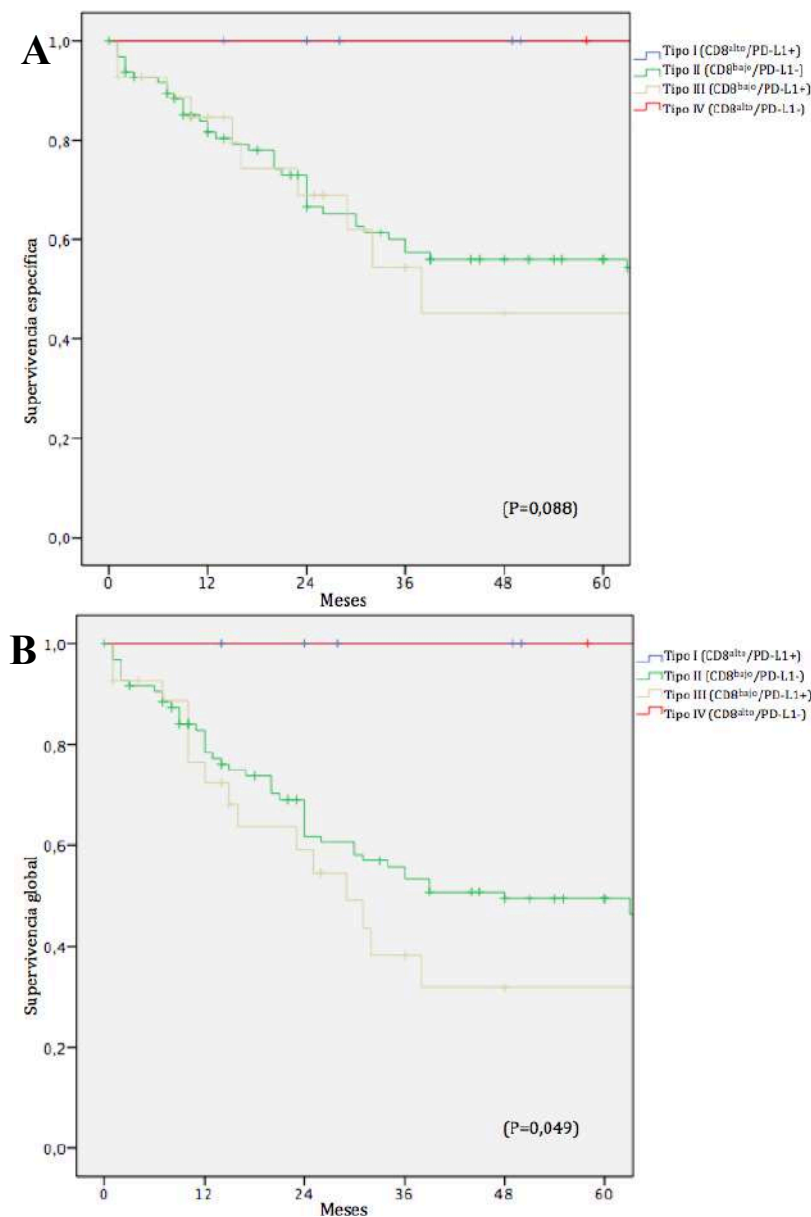
a: Chi<sup>2</sup> comparando los estadios tumorales I-III con IVa-IVb

b: Chi<sup>2</sup> comparando los grados histológicos bien y moderadamente diferenciados con los pobrementemente diferenciados

## 5.10. Relación entre el tipo de microambiente tumoral y el curso de la enfermedad

### 5.10.1. En los ITAC

Al relacionar el tipo de microambiente tumoral con la supervivencia en los ITAC, observamos una mejor SG en los casos con un microambiente tumoral de tipo I ( $CD8^{\text{alto}}/PD-L1^+$ ) y IV ( $CD8^{\text{alto}}/PD-L1^-$ ) (log-rank 7,868;  $p=0,049$ ). En estos casos la SG a los 5 años fue del 100% comparado con el 49% y 32% en los microambientes tumorales de tipo II y III, respectivamente (*Figura 48B*). Asimismo la SE fue superior en los microambientes tumorales de tipo I y IV aunque sin alcanzar la significación estadística ( $p=0,088$ ) (*Figura 48A*).

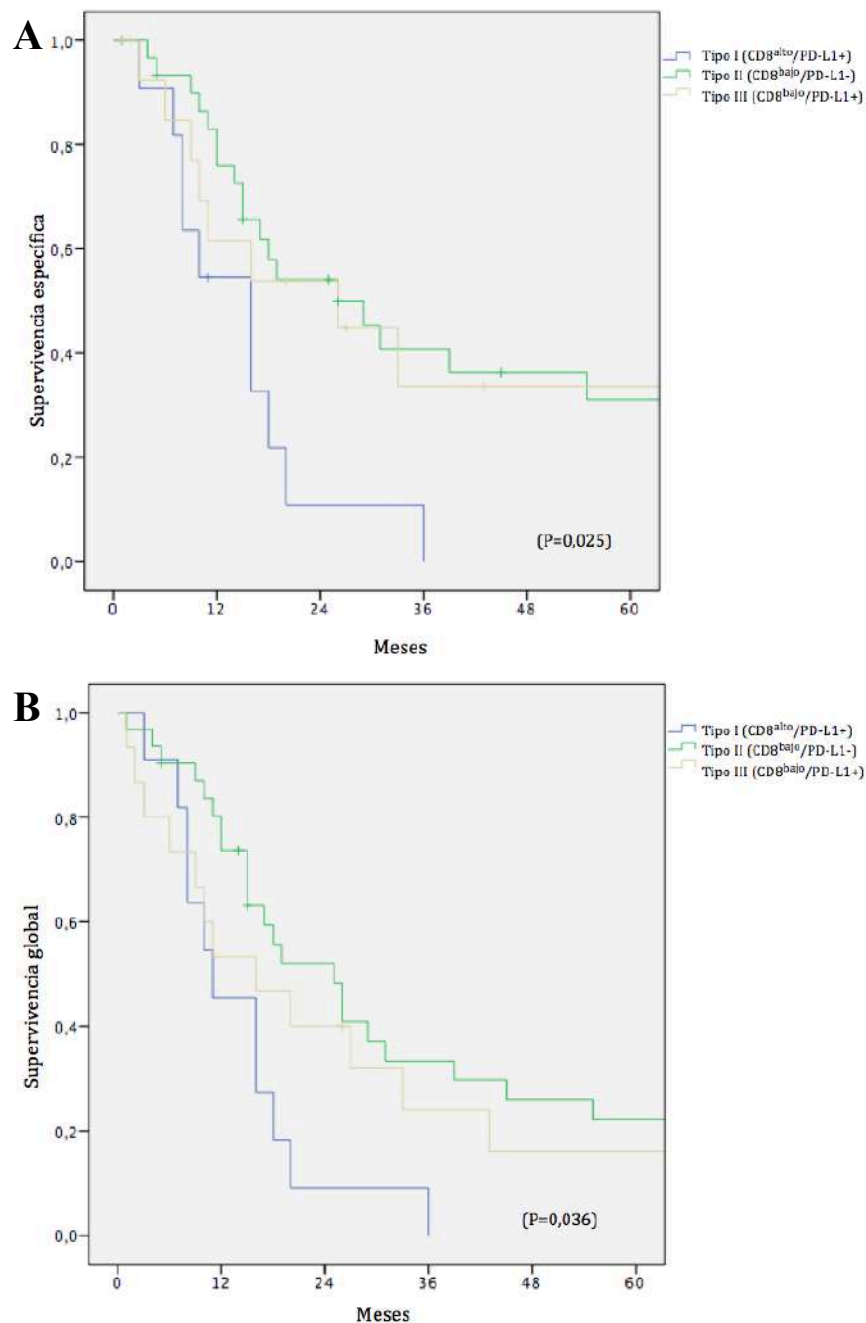


**Figura 48.** A) Relación entre la SE en los ITAC y el tipo de microambiente tumoral. B) Relación entre la SG en los ITAC y el tipo de microambiente tumoral.



### 5.10.2. En los CENS

En el caso de los CENS observamos que el microambiente tumoral de tipo I se relaciona con una peor SE (log-rank 7,365;  $p=0,025$ ) (Figura 49A) y SG (log-rank 6,628;  $p=0,036$ ) (Figura 49B). En todo caso, la supervivencia en los CENS fue muy inferior a la de los ITAC. En los casos con microambiente tumoral de tipo I la SG a los 5 años fue del 0% comparado con el 22% y 16% en los microambientes tumorales de tipo II y III, respectivamente (Figura 49B).



**Figura 49.** A) Relación entre la SE en los CENS y el tipo de microambiente tumoral. B) Relación entre la SG en los CENS y el tipo de microambiente tumoral.

## 5.11. Relación entre la cantidad de linfocitos CD8+ y la expresión de PD-L1

### 5.11.1. En los ITAC

En la *Tabla 16* se muestra la relación entre el nivel de TILs CD8+ y la expresión de PD-L1 en las células tumorales y en los macrófagos de los ITAC.

**Tabla 16.** Correlación entre la cantidad de linfocitos CD8+ en el microambiente tumoral y la expresión de PD-L1 en las células tumorales y en los macrófagos.

CD8+ TILs	Expresión de PD-L1 tumoral			Expresión de PD-L1 en macrófagos		
	Negativo	Positivo	P	Negativo	Positivo	P
0%	40 (41%)	7 (20%)		45 (41%)	2 (9%)	
1-10%	56 (57%)	20 (57%)	P=0,000	60 (55%)	16 (70%)	P=0,001
>10%	2 (2%)	8 (23%)		5 (5%)	5 (22%)	

### 5.11.2. En los CENS

En el caso de los CENS, a diferencia de los ITAC, no observamos tinción inmunohistoquímica de PD-L1 en los macrófagos. La correlación entre el nivel de linfocitos CD8+ en el microambiente tumoral y la expresión tumoral de PD-L1 en los CENS queda reflejada en la *Tabla 17*.

**Tabla 17.** Correlación entre la cantidad de linfocitos CD8+ en el microambiente tumoral y la expresión de PD-L1 en las células tumorales.

CD8+ TILs	Expresión de PD-L1 tumoral		
	Negativo	Positivo	P
0%	6 (19%)	1 (4%)	
1-10%	25 (81%)	14 (54%)	P= 0,000
>10%	0 (0%)	11 (42%)	

## 5.12. Análisis multivariante

### 5.12.1. En los ITAC

Se presenta en la *Tabla 18* las variables que se relacionaron con la supervivencia global en el análisis univariante y su relación independiente tras el análisis multivariante.

**Tabla 18.** Análisis de supervivencia global mediante el Modelo de Regresión de Cox para el estadio tumoral, el subtipo histológico y el nivel de linfocitos CD8+.

	Univariante		Multivariante	
	Log-rank	P	HR (95% IC)	P
<b>Estadio (I-III vs IVa-IVb)</b>	45,482	0,000	5,16 (3,06-8,69)	0,000
<b>Histología (papilar-colónico vs sólido-mucinoso)</b>	8,114	0,004	1,21 (0,73-2,03)	0,461
<b>CD8+ (0/bajo vs alto)</b>	4,829	0,028	0,16 (0,04-0,67)	0,012

HR: Razón de riesgos; IC: Intervalo de confianza.

### 5.12.2. En los CENS

En el caso de los CENS realizamos un modelo de riesgos proporcionales de Cox multivariante con el estadio tumoral y el nivel de TILs CD8+ para determinar el efecto de cada variable sobre la supervivencia global.

**Tabla 19.** Análisis de supervivencia global mediante el Modelo de Regresión de Cox para el estadio tumoral y el nivel de linfocitos CD8+.

	Univariante		Multivariante	
	Log-rank	P	HR (95% IC)	P
<b>Estadio (I-III vs IVa-IVb)</b>	2,373	0,123	1,37 (0,74-2,52)	0,314
<b>CD8+ (0/bajo vs alto)</b>	5,958	0,015	2,07 (1,00-4,31)	0,051



# 6. **Discusión**



## 6.1. Justificación

Los carcinomas nasosinuales constituyen un grupo de tumores agresivos y muy poco frecuentes, representando menos del 5% de las neoplasias de cabeza y cuello <sup>1</sup>. Son tumores que presentan recidivas locales con mucha frecuencia (50-80%), siendo la principal causa de mortalidad <sup>1,8,26</sup>. El tratamiento de elección tanto inicialmente como en las recidivas es la resección quirúrgica, sin embargo, en los estadios metastásicos o localmente avanzados inoperables las opciones terapéuticas son escasas. La baja incidencia de estos tumores dificulta que se pueda acumular experiencia sobre nuevas opciones terapéuticas.

En los últimos años se ha avanzado mucho en el campo de la RT y la QT, sin embargo, el pronóstico de estos tumores continúa siendo malo en estadios avanzados, con una escasa respuesta a la QT. La inmunoterapia, que actualmente se está utilizando en varios tipos tumorales, es una opción terapéutica aún no aprobada para los carcinomas nasosinuales.

Actualmente la inmunoterapia está enfocada en los puntos de control inmunológico, siendo la vía PD-1/PD-L1 una diana terapéutica utilizada en varios tipos tumorales con unas tasas de respuesta significativas. Los anticuerpos monoclonales anti-PD-1 Pembrolizumab y Nivolumab han sido aprobados para una gran variedad de tumores incluyendo los CECC que han progresado durante o después de la quimioterapia con platino <sup>105,106</sup>.

Al igual que se están utilizando varios marcadores moleculares para ayudar a predecir la respuesta a la QT en casos seleccionados, se están buscando biomarcadores para la inmunoterapia que ayuden a seleccionar a los pacientes que con mayor probabilidad se van a beneficiar de estos tratamientos. En el caso de los anticuerpos anti-PD-1, varios estudios han demostrado la utilidad de la valoración inmunohistoquímica de PD-L1 en las células tumorales <sup>108,117,125</sup>. Asimismo, se están estudiando varias células del microambiente tumoral, como los linfocitos T CD8+ y los macrófagos, como posibles biomarcadores en varios tipos tumorales y se han observado relaciones significativas <sup>138</sup>.

Nuestro grupo tiene abiertas varias líneas de investigación con los carcinomas nasosinuales dada la necesidad de encontrar nuevas opciones terapéuticas para los estadios metastásicos y localmente avanzados inoperables. Teniendo en cuenta la baja incidencia de estos tumores, consideramos que nuestra serie constituye una serie valiosa como punto de partida para continuar investigando en este campo. Hasta la fecha, no existen estudios publicados sobre el papel de PD-L1 y los linfocitos CD8+ en los carcinomas nasosinuales, por lo que en ocasiones no hemos podido contrastar nuestros resultados.

## 6.2. Aspectos clínico-patológicos

Las variables clínicas y patológicas estudiadas en nuestra serie de 57 CENS y 133 ITAC se ajustan, en general, a las características descritas para estos tumores en series más amplias publicadas <sup>2,4,148</sup>. El perfil de la serie también se asemeja a la distribución de los tumores nasosinuales en Europa, donde es más frecuente el ITAC que el CENS en la mayoría de las series publicadas. En el resto del mundo la incidencia suele invertirse, siendo el CENS hasta 4 veces más frecuente que el ITAC <sup>4</sup>.

Observamos que la mayoría de los pacientes eran varones, tanto en los ITAC (98%) como en los CENS (65%), entre la sexta y séptima décadas de la vida, lo cual concuerda con lo descrito en la literatura <sup>1,29</sup>.

En el caso de los ITAC el subtipo histológico más frecuente fue el colónico (60%), seguido del mucinoso, papilar y sólido, al igual que en otras series publicadas <sup>34</sup>. El antecedente de exposición laboral a la madera fue registrado en la gran mayoría de los pacientes con ITAC (89%), similar a lo descrito en la literatura, ya que se ha demostrado que la exposición al polvo de la madera aumenta hasta 500-900 veces el riesgo de desarrollar un ITAC <sup>1</sup>.

En cuanto al grado histológico de los CENS observamos el mismo porcentaje de tumores pobremente diferenciados que bien diferenciados (38,5%), lo cual difiere ligeramente a lo descrito en la literatura, siendo más frecuente un predominio de tumores pobremente diferenciados <sup>149</sup>. La localización anatómica más frecuentemente afectada por estos tumores fue el seno maxilar (86%), seguido del etmoides (12%), al igual que en la mayoría de las series publicadas <sup>34,149</sup>.

La mayoría de los casos se diagnosticaron en estadios avanzados (III-IV), tanto en los ITAC (65%) como en los CENS (93%), similar a la mayoría de las series publicadas <sup>1,34,150</sup>, lo cual se explica por la inespecificidad de los síntomas en los estadios iniciales. Durante el seguimiento la mayoría de los pacientes de nuestra serie presentaron recidivas locales, tanto los casos de ITAC (53%) como los CENS (77%), siendo la principal causa de mortalidad. El desarrollo de metástasis a distancia se observó en el 10% de los ITAC y en el 12% de los CENS, hallazgos similares a otras series publicadas <sup>151</sup>. En cuanto a las metástasis ganglionares, no se observaron en los casos de los ITAC, mientras que el 17,5% de los pacientes con CENS las presentaron, asimismo similar a lo publicado en otras series <sup>152-154</sup>. En la mayoría de los casos se administró RT complementaria, tanto en los ITAC (57%) como



en los CENS (72%), lo cual se debe a que la mayoría de los casos se diagnosticaron en estadios avanzados.

La SE de los ITAC fue del 57% a los 5 años, similar a la publicada en otras series<sup>59,155,156</sup>. Se observó un empeoramiento de la supervivencia estadísticamente significativo para los tumores en estadios avanzados, los subtipos sólido y mucinoso, los casos con invasión intracraneal, los casos con recidivas locorregionales y los casos con metástasis a distancia.

La SE de los CENS fue del 22% a los 5 años, inferior a la publicada en otras series<sup>56,154,157</sup>. Esta supervivencia inferior descrita en nuestra serie se puede deber a que en otras series se incluyen carcinomas maxilares con diferentes histologías y en todos los estadios, mientras que en nuestra serie sólo se incluyeron los carcinomas epidermoides y la gran mayoría (93%) en estadios avanzados (III-IV). Por otro lado, dado que nuestro servicio es considerado centro de referencia nacional para el tratamiento de los tumores de base de cráneo, nuestra serie incluye casos complejos en estadios avanzados derivados de otros centros, lo cual también podría influir en la supervivencia inferior descrita.

Los factores que se relacionaron con una peor supervivencia en los CENS, pero sin llegar a ser estadísticamente significativos, fueron el estadio tumoral, la invasión intracraneal, las recidivas locorregionales y las metástasis a distancia, coincidiendo con la mayoría de las series publicadas<sup>34,54,55,155</sup>.

Por otro lado, observamos una peor SLE en los ITAC que en los CENS (6% vs 11% a los 5 años), y esta gran diferencia entre la SE y la SLE en los ITAC (57% vs 6% a los 5 años) se debe a que una buena parte de las recidivas locales se rescatan quirúrgicamente. Esto raramente sucede en los CENS, ya que las recidivas en la mayoría de los casos no se pueden rescatar quirúrgicamente debido a sus características histopatológicas y anatómicas.

En general consideramos que nuestra serie es representativa, sin embargo sería aconsejable contar con un mayor número de casos de CENS para realizar estudios comparativos con mayor significación estadística.

### **6.3. Expresión de PD-L1**

En nuestra serie el porcentaje de casos en los que observamos una tinción inmunohistoquímica de PD-L1 en >5% de las células tumorales fue del 26% en los ITAC y del 46% en los CENS. Al comparar nuestros resultados con otras series publicadas observamos que en el estudio de Quan *et al.*<sup>146</sup>, realizado con 96 casos de CENS, se detectó positividad para PD-L1 en un 30% de los pacientes, cifra ligeramente inferior a nuestra serie.

En los CECC la incidencia de expresión tumoral de PD-L1 varía entre el 19-45% según diferentes estudios <sup>158-161</sup>, y en los CPCNP, incluyendo los adenocarcinomas y los carcinomas epidermoides, se han publicado frecuencias del 14-50%, generalmente con mayor expresión en los carcinomas epidermoides <sup>162-164</sup>. La gran variabilidad de expresión tumoral de PD-L1 en los diferentes estudios se puede deber, entre otros factores, al tipo de clon PD-L1 utilizado en el estudio inmunohistoquímico, al tratamiento recibido, al tipo de Kit de diagnóstico utilizado, o al amplio rango en el punto de corte TPS (*tumor proportion score*) utilizado, que oscila entre  $\geq 1\%$ ,  $\geq 5\%$ ,  $\geq 10\%$  y  $\geq 50\%$  según los diferentes estudios <sup>142-144</sup>.

En nuestro estudio observamos una relación estadísticamente significativa entre la expresión tumoral de PD-L1 y los niveles altos de linfocitos T CD8+, tanto en los ITAC ( $p=0,000$ ) como en los CENS ( $p=0,000$ ) (*Tablas 16-17*), de forma similar a la mayoría de los tumores. Al comprar nuestros resultados con otros estudios de tumores de cabeza y cuello, observamos que en el estudio de Quan *et al.* <sup>146</sup> la expresión tumoral de PD-L1 en los CENS también se correlacionó de forma significativa con niveles altos de linfocitos T CD8+, así como en algunos estudios con carcinomas de laringe <sup>89</sup>. Los mecanismos exactos por los cuales las células neoplásicas expresan PD-L1 no están aún claramente dilucidados, pero se han descrito 2 mecanismos de regulación: un mecanismo extrínseco inducido por los linfocitos T CD8+ y otras células inmunes del microambiente tumoral, y un mecanismo intrínseco mediante una activación oncogénica <sup>165-167</sup>. Por tanto, la relación entre la expresión tumoral de PD-L1 y los niveles altos de TILs CD8+ observada en nuestro estudio se podría explicar por el mecanismo extrínseco, ya que se ha demostrado en estudios que los TILs CD8+ en el microambiente tumoral inducen la expresión tumoral de PD-L1 mediante la liberación de IFN- $\gamma$  <sup>135</sup>.

En cuanto a la asociación entre la expresión tumoral de PD-L1 y el pronóstico, no observamos una relación estadísticamente significativa entre la expresión tumoral de PD-L1 y la supervivencia global y específica en ninguno de los dos tipos tumorales (*Figuras 44-45*). Sin embargo, en los CENS observamos una tendencia hacia una disminución de la SG y SE, así como una peor SLE, en los tumores PD-L1+ (*Figura 45*), lo cual se podría explicar por la supresión de la respuesta inmune antitumoral inducida por PD-L1. Al comparar nuestros resultados con otros estudios, observamos que en el estudio de Quan *et al.* <sup>146</sup> la expresión tumoral de PD-L1 en los CENS no mostró tener un valor pronóstico, y hasta la fecha no existen otros estudios sobre la expresión tumoral de PD-L1 en los carcinomas nasosinuales por lo que son necesarios más estudios para aclarar si tiene relación con el pronóstico.

Por otro lado, en el estudio de Taube *et al.*<sup>134</sup> se detectó positividad para PD-L1 únicamente en el estroma tumoral y no en las células neoplásicas de una muestra de melanomas, carcinomas renales y CPCNP, y observaron que la positividad para PD-L1 en las células inmunes del microambiente tumoral también tiene un valor predictivo de respuesta a las terapias anti-PD-1. Por este motivo se desarrolló el CPS (*combined positive score*), que se define como el número de células neoplásicas, linfocitos y macrófagos que expresan PD-L1, respecto al total de células neoplásicas (X100 y expresado como número absoluto). En algunos estudios se ha incluido el  $CPS \geq 1$  como método principal de puntuación y punto de corte de expresión de PD-L1.

En nuestro estudio observamos una tinción inmunohistoquímica de PD-L1 en >5% de las células inmunes del estroma tumoral en el 49% (65/133) de los ITAC y el 54% (31/57) de los CENS, y en ambos casos la expresión de PD-L1 en las células inmunes se correlacionó con la expresión tumoral de PD-L1 ( $p=0,000$ ). Al analizar la expresión de PD-L1 en los macrófagos, en los ITAC se observó en un 17% de los casos, y se correlacionó con niveles altos de linfocitos T CD8+ ( $p=0,001$ ) al igual que la expresión tumoral de PD-L1. Sin embargo, en los CENS no observamos tinción inmunohistoquímica de PD-L1 en los macrófagos, predominando en los linfocitos.

Al relacionar la expresión tumoral de PD-L1 en los ITAC con las características clínico-patológicas observamos una relación inversa entre la expresión tumoral de PD-L1 y la aparición de recidivas ( $p=0,028$ ). El resto de las variables no se relacionaron de forma estadísticamente significativa con la expresión tumoral de PD-L1 (*Tabla 10*).

En los CENS ninguna de las variables clínico-patológicas estudiadas se correlacionó de forma estadísticamente significativa con la expresión tumoral de PD-L1 (*Tabla 11*). Observamos una tendencia a la asociación entre la expresión tumoral de PD-L1 y la aparición de recidivas, al contrario que en los ITAC, sin embargo esta asociación no fue estadísticamente significativa ( $p=0,063$ ).

Hasta la fecha no existen estudios publicados sobre la expresión de PD-L1 en el cáncer nasosinusal, salvo el estudio de Quan *et al.*<sup>146</sup>, pero se han publicado varios artículos sobre la expresión de PD-L1 en otros tipos tumorales demostrando resultados muy contradictorios en cuanto a su relación con el pronóstico. Mientras que en algunos estudios se ha demostrado una asociación significativa entre la expresión tumoral de PD-L1 y un mejor pronóstico en pacientes con CPCNP, carcinoma colorrectal, carcinoma de mama, melanoma maligno y CECC<sup>119,168-171</sup>, en otros estudios se ha demostrado asociación con un peor pronóstico en

pacientes con CPCNP, hepatocarcinoma y carcinoma de páncreas, esófago, estómago, ovario y riñón<sup>172-175</sup>.

La utilidad de la expresión tumoral de PD-L1 como biomarcador para seleccionar a pacientes con mayor probabilidad de beneficiarse de la inmunoterapia anti-PD-1 se ha demostrado en diversos tipos tumorales. En pacientes con CPCNP avanzado se ha observado una mejoría en la SG y en la SLE a los 6 meses con Pembrolizumab como primera línea de tratamiento, comparado con quimioterapia convencional, en los casos con una expresión tumoral de PD-L1  $\geq 50\%$  (80,2% vs 72,4% y 62,1% vs 50,3%, respectivamente)<sup>126</sup>. Asimismo, en la primera fase del ensayo clínico con Nivolumab, que incluía pacientes con varios tipos tumorales (CPCNP, melanomas, carcinomas colorrectales, renales y de próstata), el 60% de los casos (25/42) fueron PD-L1+ y de estos el 36% (9/25) mostraron una respuesta objetiva parcial o completa (según los criterios de la OMS), mientras que ninguno de los casos PD-L1- mostraron una respuesta objetiva a la terapia con Nivolumab<sup>117</sup>. En los CECC recurrentes o metastásicos, Pembrolizumab fue aprobado en base a los resultados del ensayo clínico KEYNOTE-040 de fase 3, en el cual se mostró la superioridad de Pembrolizumab en la población con expresión altamente positiva de PD-L1 (TPS  $\geq 50\%$ ) frente a la terapia estándar. En este ensayo clínico, el 26% de los pacientes (129/495) tenían tumores que expresaban PD-L1 con una TPS  $\geq 50\%$ , y la indicación finalmente aprobada para Pembrolizumab en CECC recurrentes o metastásicos selecciona los pacientes por su expresión de PD-L1.

A pesar de que algunos ensayos clínicos han demostrado que los pacientes con ausencia de expresión de PD-L1 no obtienen beneficio de la inmunoterapia anti-PD-1<sup>117</sup>, en otros ensayos clínicos se han observado respuestas significativas a estas terapias en pacientes sin expresión tumoral de PD-L1 en el estudio inmunohistoquímico<sup>125,176</sup>. Sin embargo, estas respuestas son en general bajas; en el estudio de Taube *et al.*<sup>125</sup>, que incluía melanomas, CPCNP y carcinomas colorrectales, el 6% (1/18) de los tumores PD-L1- presentaron respuestas objetivas a la terapia anti-PD-1 comparado con el 39% (9/23) de los tumores PD-L1+, y en el estudio de Wolchok *et al.*<sup>176</sup>, realizado con melanomas avanzados, el 8% (1/13) de los tumores PD-L1- presentaron respuestas objetivas comparado con el 50% (4/8) de los tumores PD-L1+. Por tanto, esto indica que la ausencia de expresión de PD-L1 no es un indicador absoluto de carencia total de respuesta a las terapias anti-PD-1, aunque la expresión de PD-L1 parece potenciar el efecto en respondedores al tratamiento<sup>177</sup>, y en el momento actual parece ser el mejor biomarcador de respuesta a la inmunoterapia anti-PD-1/PD-L1<sup>125</sup>.

Por otro lado, es posible que existan otros puntos de control que regulen la respuesta a la terapia anti-PD-1/PD-L1 y tengan valor como biomarcadores, lo cual podría explicar por qué algunos pacientes PD-L1 negativos responden a las terapias anti-PD-1/PD-L1. Algunos de los que actualmente se están estudiando son el PD-L2, el IFN $\gamma$  y las mutaciones somáticas de EGFR<sup>178-180</sup>.

Por otro lado, en algunos estudios se han utilizado técnicas de cuantificación de expresión génica basadas en mRNA para la detección de PD-L1, obteniendo resultados más sensibles que los tests inmunohistoquímicos<sup>141</sup>, lo cual se podría deber a la heterogeneidad de los tumores, ya que los tissue arrays utilizados para el estudio inmunohistoquímico pueden tener limitada su representatividad. Por último, en algunos estudios se han detectado biomarcadores en sangre<sup>181</sup>, y en la actualidad se están buscando tests no invasivos en muestras sanguíneas (biopsia líquida), que incluirían la determinación de PD-L1 en células tumorales circulantes y en el plasma<sup>182,183</sup>.

#### **6.4. Linfocitos T CD8+ en el microambiente tumoral**

En nuestra serie el 65% (86/133) de los ITAC y el 88% (50/57) de los CENS presentaron linfocitos T CD8+ intratumorales en diferentes niveles. Los linfocitos T CD8+ estromales se observaron en el 95% (126/133) de los ITAC y en el 98% (56/57) de los CENS, y todos los casos que presentaban linfocitos T CD8+ intratumorales también presentaban linfocitos T CD8+ estromales en ambos tipos tumorales.

En los ITAC con niveles altos de TILs CD8+, todos los casos pertenecían a los subtipos histológicos colónico (90%) y papilar (10%), que corresponden a los subtipos más frecuentes, mientras que en los casos con niveles bajos y ausencia de TILs CD8+ los subtipos histológicos más frecuentes fueron el colónico (58%) seguido del mucinoso (24%). Al analizar la correlación entre el nivel de TILs CD8+ en los ITAC y las variables clínico-patológicas estudiadas, no observamos relaciones estadísticamente significativas, sin embargo observamos que los casos con niveles altos de TILs CD8+ presentaban estadios tumorales más bajos, menos recidivas, menos metástasis, menos invasión intracraneal y menos afectación orbitaria, en comparación con los casos con niveles bajos y ausencia de TILs CD8+ (*Tabla 12*).

El análisis de supervivencia de Kaplan-Meier mostró una mejor SG ( $p=0,028$ ) y SE ( $p=0,013$ ) en los ITAC con niveles altos de TILs CD8+ comparado con los casos con niveles bajos y ausencia de TILs CD8+ (*Figuras 46B y 46D*). En el análisis multivariante, el nivel de

TILs CD8+ resultó ser un factor pronóstico favorable para la SG ( $p=0,012$ ), independiente del estadio tumoral y el subtipo histológico, mientras que el subtipo histológico perdió su valor pronóstico debido a su interrelación con los TILs CD8+ (*Tabla 18*). La asociación entre el nivel alto de TILs CD8+ y mejor pronóstico observada en nuestro estudio demuestra la importancia de los linfocitos T CD8+ en la inmunidad antitumoral, lo cual también se ha demostrado en múltiples estudios.

Al comparar nuestros resultados de los ITAC con otras series publicadas sobre adenocarcinomas, observamos que en el estudio de Knief *et al.*<sup>184</sup>, realizado con adenocarcinomas de la unión gastroesofágica, el nivel alto de TILs CD8+ también resultó ser un factor pronóstico positivo independiente. Asimismo, en el estudio de Gao *et al.*<sup>185</sup>, realizado con adenocarcinomas gástricos, se observó una mejor SG y SLE en los casos con niveles altos de TILs CD8+ en comparación con los casos con niveles bajos. De forma similar, en múltiples estudios realizados con CPCNP se ha demostrado que el nivel alto de TILs CD8+ es un factor pronóstico favorable independiente<sup>186-188</sup>.

En el caso de los CENS de nuestro estudio, tampoco observamos relaciones estadísticamente significativas entre las variables clínico-patológicas estudiadas y el nivel de los TILs CD8+, sin embargo observamos que los casos con niveles altos de TILs CD8+ presentaban estadios tumorales más altos y más recidivas que los casos con niveles bajos y ausencia de TILs CD8+ (*Tabla 13*), al contrario que en los ITAC. Asimismo, el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier mostró una menor SG ( $p=0,015$ ) y SE ( $p=0,009$ ) en los CENS con niveles altos de TILs CD8+ comparado con los casos con niveles bajos y ausencia de TILs CD8+ (*Figuras 47B y 47D*).

La asociación entre el nivel alto de TILs CD8+ y peor pronóstico observada en nuestro estudio se podría deber a que sólo se valora la cantidad y localización de los linfocitos T CD8+ sin analizar su función, que podría estar inhibida por factores presentes en el microambiente tumoral. Por otro lado, en el análisis multivariante el nivel de TILs CD8+ perdió su valor pronóstico ( $p=0,051$ ) (*Tabla 19*), por lo que sería necesario contar con un mayor número de casos de CENS para realizar estudios comparativos con mayor significación estadística.

Al comparar nuestros resultados de los CENS con otras series publicadas sobre carcinomas epidermoides observamos que en pacientes con CECC se ha demostrado una asociación entre un mayor número de TILs CD8+ en el microambiente tumoral y una mejor SG<sup>189</sup>, al contrario que en nuestro estudio. Asimismo, en el estudio de Quan *et al.*<sup>146</sup> el nivel alto de TILs CD8+ también resultó ser un factor pronóstico positivo independiente en los

CENS. Estos resultados son similares a nuestros resultados de los ITAC pero contrarios a los CENS, aunque en el análisis multivariante el nivel de TILs CD8+ únicamente resultó ser un factor pronóstico independiente en el caso de los ITAC, ya que en los CENS no se alcanzó la significación estadística (*Tablas 18 y 19*).

Se ha observado que los fármacos anti-PD-1/PD-L1 reactivan los TILs preexistentes en el microambiente tumoral, contribuyendo a la regresión tumoral <sup>136,137</sup>. En nuestro estudio observamos la presencia de TILs CD8+ en hasta el 65% de los ITAC y el 88% de los CENS, y la expresión tumoral de PD-L1 se relacionó con un microambiente inmunológico reactivo en ambos tumores, lo cual indica que la vía de PD-1/PD-L1 podría ser una diana inmunoterapéutica prometedora en estos tumores.

## 6.5. Tipos de microambiente tumoral

La clasificación de los tumores en base al estatus combinado de la expresión tumoral de PD-L1 y la cantidad de linfocitos T CD8+ en el microambiente tumoral ha sido propuesta por algunos autores por su utilidad para seleccionar a los pacientes con mayor probabilidad de responder a la inmunoterapia con anticuerpos anti-PD-1/PD-L1. Se han descrito 4 tipos de microambiente tumoral: tipo I (CD8<sup>alto</sup>/PD-L1<sup>+</sup>), tipo II (CD8<sup>bajo</sup>/PD-L1<sup>-</sup>), tipo III (CD8<sup>bajo</sup>/PD-L1<sup>+</sup>) y tipo IV (CD8<sup>alto</sup>/PD-L1<sup>-</sup>). Según esta clasificación, los tumores con microambientes tumorales de tipo I tienen una mayor probabilidad de responder a las terapias anti PD-1/PD-L1<sup>138</sup>. En nuestra serie los microambientes tumorales más frecuentes fueron el tipo II (CD8<sup>bajo</sup>/PD-L1<sup>-</sup>) y el tipo III (CD8<sup>bajo</sup>/PD-L1<sup>+</sup>), tanto en los ITAC como en los CENS. El tipo I representaba el 6% (8/133) de los ITAC y el 19% (11/57) de los CENS. Al comparar nuestros resultados con otros estudios observamos diferentes proporciones de los 4 tipos de microambiente tumoral (*Tabla 20*).

**Tabla 20.** Estudios comparando los diferentes tipos de microambiente tumoral.

Estudio	Tipo de tumor	N° de pacientes	Microambiente tumoral				Pronóstico
			Tipo I (CD8 <sup>alto</sup> /PD-L1 <sup>+</sup> )	Tipo II (CD8 <sup>bajo</sup> /PD-L1 <sup>-</sup> )	Tipo III (CD8 <sup>bajo</sup> /PD-L1 <sup>+</sup> )	Tipo IV (CD8 <sup>alto</sup> /PD-L1 <sup>-</sup> )	
Nuestro estudio	ITAC	133	8 (6)	96 (72)	27 (20)	2 (2)	↑SG en tipo I y IV ↓SG en tipo III

Nuestro estudio	CENS	57	11 (19)	31 (54)	15 (26)	0 (0)	↑SG en tipo II ↓SG en tipo I
Gennen <i>et al</i> <sup>190</sup>	CPCNP	31	10 (32)	5 (16)	5 (16)	7 (23)	↑SG en tipo II ↓SG en tipo III
Tokito <i>et al</i> <sup>167</sup>	CPCNP	74	29 (39)	13 (18)	26 (35)	6 (8)	↑SG en tipo IV ↓SG en tipo III
El Guindy <i>et al</i> <sup>191</sup>	CPCNP	55	12 (22)	5 (9)	24 (44)	14 (25)	↑SG en tipo IV ↓SG en tipo III
Yang <i>et al</i> <sup>192</sup>	CPCNP	178	44 (25)	77 (43)	27 (15)	30 (17)	↑SG en tipo I ↓SG en tipo III
Noh <i>et al</i> <sup>165</sup>	Adenocarcinoma gástrico	479	29 (6)	260 (54)	14 (3)	121 (25)	↑SG en tipo I ↓SG en tipo III
Wen <i>et al</i> <sup>166</sup>	Adenocarcinoma gástrico	166	35 (21)	68 (41)	29 (17)	34 (20)	↑SG en tipo I ↓SG en tipo II y IV

Al relacionar el tipo de microambiente tumoral con las características clínico-patológicas no observamos asociaciones estadísticamente significativas en ninguno de los dos tipos tumorales (*Tablas 14 y 15*). En los CENS todos los casos con microambientes tumorales de tipo I (CD8<sup>alto</sup>/PD-L1<sup>+</sup>) presentaron recidivas y estadios avanzados (III y IV), y no hubo ningún caso con un microambiente tumoral de tipo IV (CD8<sup>alto</sup>/PD-L1<sup>-</sup>), por lo que todos los casos con niveles altos de TILs CD8<sup>+</sup> eran PD-L1<sup>+</sup>. Esto también podría explicar la asociación entre el nivel alto de TILs CD8<sup>+</sup> y peor pronóstico observada en los CENS, ya que la expresión tumoral de PD-L1 inhibe la función antitumoral de los TILs CD8<sup>+</sup>, lo cual demuestra la importancia de analizar los tipos de microambiente tumoral y no sólo la expresión tumoral de PD-L1 o el nivel de TILs CD8<sup>+</sup> de forma aislada.

Nuestro estudio indica que en los CENS el microambiente tumoral de tipo I se relaciona con una peor SE (p=0,025) y SG (p=0,036) (*Figura 49*), lo cual coincide con el subgrupo de pacientes con mayor probabilidad de responder a las terapias anti-PD-1/PD-L1. Por otro lado en los ITAC se observó una peor SG (p=0,049) en los casos con microambientes tumorales



de tipo III ( $CD8^{\text{bajo}}/PD-L1^+$ ) (*Figura 48B*), de forma similar a otros estudios<sup>165,167,190-192</sup>, ya que en este subgrupo existe una reducción de la respuesta inmune antitumoral.

Al comparar nuestros resultados con otros estudios observamos resultados muy dispares (*Tabla 20*). En algunos estudios se observa una mejor SG en los tumores  $CD8^{\text{alto}}/PD-L1^+$  (tipo I)<sup>165,166,192</sup>, en otros se observa una mejor SG en los tumores  $CD8^{\text{alto}}/PD-L1^-$  (tipo IV)<sup>167,191</sup>, y en otros se observa una mejor SG en los tumores  $CD8^{\text{bajo}}/PD-L1^-$  (tipo II)<sup>190</sup>.

Nuestros resultados muestran que hasta un 19% de los pacientes con CENS presentan un microambiente tumoral favorable para la inmunoterapia ( $CD8^{\text{alto}}/PD-L1^+$ ) y se podrían beneficiar de los fármacos anti-PD-1, como el Pembrolizumab y Nivolumab, ya aprobados en los CECC. Es importante señalar que en nuestro estudio el 100% de estos pacientes presentaban estadios avanzados y recidivas, por lo que se trata de pacientes con escasas opciones terapéuticas en los cuales sería posible incluir una línea con estos fármacos.

En el caso de los ITAC, una menor proporción de pacientes (6%) presentaba microambientes tumorales favorables para la inmunoterapia ( $CD8^{\text{alto}}/PD-L1^+$ ), lo cual nos indica que los ITAC son tumores menos inmunogénicos que los CENS, aunque por lo general son tumores con mejor pronóstico (SG a los 5 años del 60-70% vs 30-50%). A pesar de ser tumores poco inmunogénicos, nuestros resultados muestran que un subgrupo de pacientes con ITAC en estadios avanzados o metastásicos también se podría beneficiar del tratamiento con fármacos anti-PD-1/PD-L1.

## 6.6. Otros biomarcadores en investigación

Otros biomarcadores que se están estudiando para seleccionar a los pacientes susceptibles de responder a la inmunoterapia anti-PD-1/PD-L1 incluyen la Inestabilidad de Microsatélites (MSI; del inglés Microsatellite Instability) y la Carga Mutacional Tumoral (TMB; del inglés Tumor Mutational Burden). Estos biomarcadores se suelen analizar mediante inmunohistoquímica y secuenciación de nueva generación, preferiblemente en tejido tumoral parafinado. La MSI se produce como consecuencia de la alteración de uno o más genes reparadores del DNA, siendo los genes más frecuentes el MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2. Su utilidad como biomarcador ha sido demostrada en varios estudios con diferentes tumores<sup>193,194</sup> y en el 2017 la FDA aprobó el Pembrolizumab para tumores metastásicos o irresecables con MSI alto, independientemente del origen del tumor. Por otro lado, el TMB se define como el número de mutaciones somáticas detectadas dentro de la región codificante

del genoma tumoral por Megabase de DNA tumoral (N° mutaciones/Mb), y la evidencia científica actual sugiere que los tumores con TMB alto son portadores de un gran número de neoantígenos tumorales que inducen la activación de las células T y una respuesta inmune contra las células tumorales. La cuantificación del TMB se suele realizar mediante un panel de secuenciación masiva que incluye sólo los genes somáticos, y la mayoría de los estudios han demostrado su utilidad como biomarcador, ya que se han observado mejores respuestas a las terapias anti-PD-1/PD-L1 en pacientes con un TMB alto<sup>195-198</sup>. En junio 2020 la FDA aprobó el Pembrolizumab para adultos y niños con tumores sólidos con un TMB alto ( $\geq 10$  mutaciones/Mb).

Por otro lado, se sabe que ciertas alteraciones genéticas pueden generar resistencias a los fármacos inhibidores de puntos de control inmunológico. Por ejemplo, en varios estudios con CPCNP no escamosos se ha demostrado que mutaciones en el gen STK11/LKB1 disminuye el número de TILs CD8+, creando resistencia al tratamiento con Pembrolizumab<sup>199-201</sup>. En estos estudios también se observó que los tumores con mutaciones en el gen STK11/LKB1 eran mayoritariamente PD-L1 negativos, aunque algunos pacientes PD-L1+ con mutaciones en el gen STK11/LKB1 no respondieron a la terapia con fármacos anti-PD-1/PD-L1. Asimismo, en los melanomas se ha observado que mutaciones en los genes B2M<sup>202</sup> y JAK1 o JAK2<sup>203,204</sup> parecen ser mecanismos de resistencia adquirida a la inmunoterapia anti-PD-1/PD-L1. Son necesarios más estudios similares a estos para entender mejor cómo los cambios genómicos modulan la inmunogenicidad tumoral.

La medicina de precisión tiene el objetivo de integrar los datos clínicos, anatomopatológicos y moleculares para seleccionar el tratamiento óptimo o más adaptado al perfil biológico del tumor, siendo necesarios unos biomarcadores predictivos robustos<sup>205</sup>. Con el avance en las técnicas de secuenciación de alta resolución, como por ejemplo la secuenciación del RNA de células únicas, la citometría de masa de alta dimensión (citometría por tiempo de vuelo, CyTOF), la inmunosecuenciación del repertorio de linfocitos T, y la secuenciación del exoma del DNA tumoral, en un futuro se conseguirá analizar mejor la respuesta inmune periférica y el microambiente tumoral, permitiéndonos aplicar mejor la medicina de precisión en la inmuno-oncología.

## **6.7. Posibles futuras opciones terapéuticas en el cáncer nasosinusal**

En esta tesis doctoral se ha estudiado la expresión tumoral de PD-L1 y los TILs CD8+ como posibles biomarcadores para el uso de fármacos anti-PD-1 en un grupo de ITAC y CENS, debido a la importancia de encontrar nuevas opciones terapéuticas para los estadios

avanzados de estos tumores. Nuestros resultados muestran que un subgrupo de pacientes con CENS e ITAC se podrían beneficiar de los fármacos anti-PD-1 como Pembrolizumab y Nivolumab, de forma similar a otros tumores.

La inmunoterapia esta demostrando ser una opción terapéutica prometedora para varios tumores, entre ellos los CECC. Antes de la aprobación de los inhibidores de puntos de control inmunológico, las opciones terapéuticas para los CECC recurrentes o metastásicos refractarios a la QT basada en Platino incluían el Cetuximab, los Taxanos o el Metotrexate, y con estos agentes las tasas de respuesta eran del 4-14% con una mediana de SLP de sólo 2-3 meses <sup>206</sup>. Con la aprobación de los fármacos anti-PD-1 Pembrolizumab y Nivolumab en el 2016, se ha conseguido mejorar la SG y la calidad de vida de estos pacientes. Varios anticuerpos monoclonales han sido evaluados en ensayos clínicos con pacientes con CECC recurrentes/metastásicos (*Tabla 21*), y son necesarios ensayos clínicos similares en pacientes con carcinomas nasosinuales avanzados, ya que es posible que una proporción de estos pacientes también se pueda beneficiar de este tipo de terapias.

Existen diversas estrategias de inmunoterapia que han demostrado eficacia en varios tumores sólidos y que se podrían investigar en los carcinomas nasosinuales avanzados. Los agentes más utilizados incluyen los anticuerpos monoclonales dirigidos frente a CTLA-4 (como Ipilimumab), PD-1 (como Pembrolizumab y Nivolumab) y PD-L1 (como Durvalumab y Atezolizumab), entre otros.

Es importante señalar que los resultados de la inmunoterapia con inhibidores de puntos de control inmunológico en ocasiones son similares a los obtenidos con el tratamiento estándar con QT, pero en cualquier caso con menor toxicidad (*Tabla 21*). El perfil de toxicidad de los inhibidores de puntos de control inmunológico incluye fundamentalmente procesos relacionados con la autoinmunidad como dermatitis o colitis, y se ha demostrado que un tratamiento con corticoides a dosis altas de forma precoz reduce significativamente los casos de toxicidad grado 3 y 4.

Otra vía de progreso en este campo es la combinación de varios de estos anticuerpos monoclonales con el fin de potenciar su eficacia. En este sentido, algunos anti-PD-1 se han combinado con anti-CTLA-4 en varios estudios con melanomas obteniendo buenos resultados, y actualmente se están llevando a cabo varios ensayos clínicos similares en CECC localmente avanzados (*Tabla 22*). Por último, varios ensayos clínicos están evaluando la combinación de inhibidores de puntos de control inmunológico con QT, ya que se cree que se podría producir una respuesta más rápida y duradera (*Figura 50*), así como con RT (*Tabla 22*).

En cuanto a las vacunas terapéuticas y la terapia celular adoptiva con linfocitos T, estas también podrían ser una posibilidad prometedora en el futuro, sin embargo su aplicación en las terapias contra el cáncer esta todavía lejos de ser incluida en la práctica clínica.

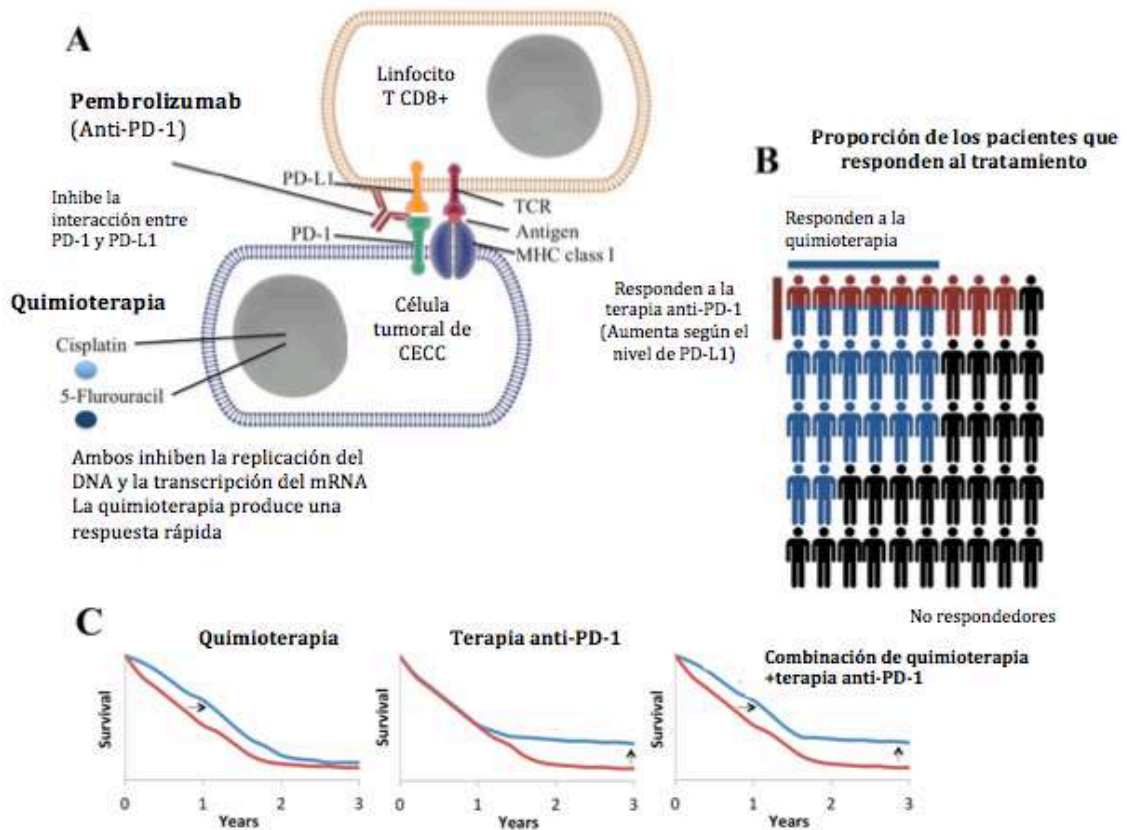
**Tabla 21.** Ensayos clínicos fase III realizados con inhibidores de puntos de control inmunológico en CECC recurrentes/metastásicos (Adaptado de Cramer, JD *et al.* <sup>206</sup>).

Estudio	Nº de pacientes	Tratamiento	Mediana de SG en meses	HR de SG (95% IC)	Efectos adversos grado 3-5
<b>1ª línea de tratamiento</b>					
KEYNOTE-048	882	Pembrolizumab vs QT esquema EXTREME (cetuximab+platino+5-FU)	CPS≥20: 14,8 (P) vs 10,7 (QT) CPS≥1: 12,3 (P) vs 10,3 (QT) Población global: 11,5 (P) vs 10,7 (QT)	CPS≥20: 0,58 (0,44-0,78) CPS≥1: 0,74 (0,61-0,90) Población global: 0,83 (0,70-0,99)	17% (P) vs 69% (QT)
<b>2ª línea de tratamiento</b>					
Ferris <i>et al</i> Checkmate 141	361	Nivolumab vs QT (a elección del investigador)	7,5 (N) vs 5,1 (QT)	0,70 (0,50-0,96) a favor de Nivolumab	13% (N) vs 35% (QT)
Cohen <i>et al</i> KEYNOTE-040	497	Pembrolizumab vs QT (a elección del investigador)	8,7 (P) vs 7,1 (QT)	0,80 (0,65-0,98) a favor de Pembrolizumab	13% (P) vs 36% (QT)
EAGLE	736	Durvalumab vs Durvalumab+Tremelimumab vs QT (a elección del investigador)	7,6 (D) vs 6,5 (D+T) vs 8,3 (QT)	0,88 (0,72-1,08) Durvalumab vs 1,04 (0,85-1,26) Durvalumab+Tremelimumab	10% (D) vs 16% (D+T) vs 24% (QT)

**Tabla 22.** Ensayos clínicos fase III en desarrollo en CECC localmente avanzados (Adaptado de Cramer, JD *et al.* <sup>206</sup>).

Estudio	Pacientes incluidos	Tratamiento	Nº de pacientes planeado
KEYNOTE-689 (NCT03765918)	Ca de cavidad oral/laringe/hipofaringe estadios III-IVA y Ca de orofaringe HPV- o Ca de orofaringe HPV+ estadio III (8ª ed. AJCC)	Pembrolizumab neoadyuvante y Pembrolizumab adyuvante a cirugía y terapia adyuvante estándar vs cirugía y terapia adyuvante estándar	704
WO420242 (NCT03452137)	CECC que precisa terapia multimodal	Atezolizumab adyuvante vs placebo después de terapia local definitiva (cirugía o RT)	400
ECOG ACRIN EA3161 (NCT03811015)	Ca orofaringe HPV+ con riesgo intermedio (consumo de tabaco ≥10paq/año y estadio I o <10paq/año y estadios II-III de 8ª ed. AJCC)	Nivolumab+cisplatino/RT vs cisplatino/RT	744

JAVELIN (NCT02952586)	CECC HPV- estadios III-IVB o Ca orofaringe HPV+ T4 o N2c/N3 (7ª ed. AJCC)	Avelumab+cisplatino/RT vs cisplatino/RT	697
GORTEC 2017-01 (REACH) (NCT02999087)	CECC estadios III-IVB	Pacientes candidatos a cisplatino: Avelumab+cetuximab/RT vs cisplatino/RT Pacientes no candidatos a cisplatino: Avelumab+cetuximab/RT vs cetuximab/RT	688
NRG HN-004 (NCT03258554)	Ca cavidad oral/laringe/hipofaringe estadios III-IVB o Ca orofaringe HPV-, Ca orofaringe HPV+ estadios I-II con consumo >10paq/año o Ca orofaringe estadio III	Durvalumab/RT vs cetuximab/RT	523
NRG HN-005 (NCT03952585)	Ca orofaringe HPV+ no fumadores	Nivolumab/RT a dosis bajas (60 Gy) vs cisplatino/RT a dosis bajas (60 Gy) vs cisplatino/RT a dosis estándar (70 Gy)	711
(NCT03349710)	CECC localmente avanzados	Pacientes candidatos a cisplatino: Nivolumab+cisplatino/RT vs cisplatino/RT Pacientes no candidatos a cisplatino: Nivolumab/RT vs cetuximab/RT	1046
KEYNOTE-412 (NCT03040999)	CECC incluyendo los Ca de cavidad oral irresecables	Pembrolizumab+cisplatino/RT vs cisplatino/RT	780



**Figura 50.** Mecanismos de combinación de quimioterapia e inmunoterapia en CECC. A) Mecanismo de acción de la terapia anti-PD-1 y la quimioterapia. B) Tasas de respuesta a la terapia anti-PD-1 y a la quimioterapia. Cada persona representa aproximadamente el 2%, los de color rojo representan a los que responden a la terapia anti-PD-1 y los de color azul representan a los que responden a la quimioterapia. C) Curvas de SG observadas con inmunoterapia y quimioterapia en CECC. La terapia anti-PD-1 mejora significativamente la duración de la respuesta (Adaptado de Cramer, JD *et al.* <sup>206</sup>).

# 7. Conclusiones





1. Las variables clínicas y patológicas estudiadas en nuestra serie se ajustan, en general, a las características descritas en otras series de tumores nasosinuales.

2. Observamos una tinción inmunohistoquímica positiva para PD-L1 en las células tumorales en el 26% de los ITAC y el 46% de los CENS. En las células inmunes del estroma tumoral, este porcentaje asciende al 49% en los ITAC y el 54% en los CENS. La expresión tumoral de PD-L1 se asocia con la expresión de PD-L1 en las células inmunes, tanto en los ITAC como en los CENS.

3. La expresión tumoral de PD-L1 no se relacionó con la supervivencia, pero podría servir como biomarcador para seleccionar a pacientes con mayor probabilidad de beneficiarse de la inmunoterapia anti-PD-1, de forma similar a otros tipos tumorales.

4. Observamos la presencia de TILs CD8+ intratumorales en el 65% de los ITAC y el 88% de los CENS. En los ITAC el nivel alto de TILs CD8+ intratumorales resultó ser un factor pronóstico favorable, independientemente del estadio tumoral y el subtipo histológico.

5. La expresión tumoral de PD-L1 se asoció con niveles altos de TILs CD8+, tanto en los ITAC como en los CENS, lo cual indica que la vía de PD-1/PD-L1 puede ser una diana inmunoterapéutica.

6. Observamos que un 19% de los pacientes con CENS y un 6% de los pacientes con ITAC presentaban un microambiente tumoral favorable para las terapias anti PD-1/PD-L1 (CD8<sup>alto</sup>/PD-L1<sup>+</sup>). En los CENS este tipo de microambiente tumoral se asoció con una peor supervivencia.



# 8. Bibliografía



1. Llorente JL, López F, Suárez C, Hermsen MA. Sinonasal carcinoma: Clinical, pathological, genetic and therapeutic advances. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014;11(8):460-472. doi:10.1038/nrclinonc.2014.97
2. Ansa B, Goodman M, Ward K, et al. Paranasal sinus squamous cell carcinoma incidence and survival based on surveillance, epidemiology, and end results data, 1973 to 2009. *Cancer*. 2013;119(14):2602-2610. doi:10.1002/cncr.28108
3. Kuijpers JLP, Louwman MWJ, Peters R, Janssens GORJ, Burdorf A, Coebergh JWW. Trends in sinonasal cancer in the Netherlands: More squamous cell cancer, less adenocarcinoma: A population-based study 1973-2009. *Eur J Cancer*. 2012;48(15):2369-2374. doi:10.1016/j.ejca.2012.05.003
4. Youlten DR, Cramb SM, Peters S, et al. International comparisons of the incidence and mortality of sinonasal cancer. *Cancer Epidemiol*. 2013;37(6):770-779. doi:10.1016/j.canep.2013.09.014
5. Sanghvi S, Khan MN, Patel NR, Yeldandi S, Baredes S, Eloy JA. Epidemiology of sinonasal squamous cell carcinoma: A comprehensive analysis of 4994 patients. *Laryngoscope*. 2014;124(1):76-83. doi:10.1002/lary.24264
6. Hermsen MA, Riobello C, García-Marín R, et al. Translational genomics of sinonasal cancers. *Semin Cancer Biol*. 2020;61:101-109. doi:10.1016/j.semcancer.2019.09.016
7. Sarradin V, Siegfried A, Uro-Coste E, Delord JP. WHO classification of head and neck tumours 2017: Main novelties and update of diagnostic methods. *Bull Cancer*. 2018;105(6):596-602. doi:10.1016/j.bulcan.2018.04.004
8. Turner JH, Reh DD. Incidence and survival in patients with sinonasal cancer: A historical analysis of population-based data. *Head Neck*. 2012;34(6):877-885. doi:10.1002/hed.21830
9. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Arsenic, metals, fibres, and dusts. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 2012;100:11-465.
10. Götte K, Hörmann K. Sinonasal malignancy: What's new? *ORL*. 2004;66(2):85-97. doi:10.1159/000077801
11. Doescher J, Piontek G, Wirth M, et al. Epstein-Barr virus infection is strictly associated with the metastatic spread of sinonasal squamous-cell carcinomas. *Oral Oncol*. 2015;51(10):929-934. doi:10.1016/j.oraloncology.2015.07.008
12. Bishop JA, Guo TW, Smith DF, et al. Human papillomavirus-related carcinomas of the sinonasal tract. *Am J Surg Pathol*. 2013;37(2):185-192. doi:10.1097/PAS.0b013e3182698673
13. Isayeva T, Li Y, Maswahu D, Brandwein-Gensler M. Human papillomavirus in non-oropharyngeal head and neck cancers: a systematic literature review. *Head Neck Pathol*. 2012;6(1):104-120. doi:10.1007/s12105-012-0368-1
14. Batsakis JG, Suarez P. Schneiderian papillomas and carcinomas: A review. *Adv Anat Pathol*. 2001;8(2):53-64. doi:10.1097/00125480-200103000-00001
15. Sivalingam J, Sarawagi R, Raghuwanshi S, Yadav P. Sinonasal Neoplasia - Clinicopathological Profile And Importance of Computed Tomography. *J Clin Diagnostic Res*. 2015;9(6). doi:10.7860/JCDR/2015/13514.6026
16. Zheng W, McLaughlin JK, Chow WH, Chien HTC, Blot WJ. Risk factors for cancers of the nasal cavity and paranasal sinuses among white men in the United States. *Am J Epidemiol*. 1993;138(11):965-972. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a116816
17. Hayes RB, Kardaun JWPF, De Bruyn A. Tobacco use and sinonasal cancer: A case-control study. *Br J Cancer*. 1987;56(6):843-846. doi:10.1038/bjc.1987.303
18. Benninger MS. The impact of cigarette smoking and environmental tobacco smoke on nasal and sinus disease: A review of the literature. *Am J Rhinol*. 1999;13(6):435-438. doi:10.2500/105065899781329683

19. Albrecht C, Borm PJA, Unfried K. Signal transduction pathways relevant for neoplastic effects of fibrous and non-fibrous particles. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen*. 2004;553(1-2):23-35. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.06.015
20. Fubini B. Surface reactivity in the pathogenic response to particulates. *Environ Health Perspect*. 1997;105(5):1013-1020. doi:10.1289/ehp.97105s51013
21. Roessner A, Kuester D, Malfertheiner P, Schneider-Stock R. Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. *Pathol Res Pract*. 2008;204(7):511-524. doi:10.1016/j.prp.2008.04.011
22. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420(6917):860-867. doi:10.1038/nature01322
23. Crusz SM, Balkwill FR. Inflammation and cancer: Advances and new agents. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015;12(10):584-596. doi:10.1038/nrclinonc.2015.105
24. Suárez Nieto C. Tumores rinosinuales. En: Suárez Nieto C, Álvarez Álvarez I, Llorente Pendás JL, Sevilla García MA. *Tratado de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*. 2ª ed. Editorial Médica Panamericana; 2007:3126-3136.
25. Kleinsasser O, Schroeder HG. Adenocarcinomas of the inner nose after exposure to wood dust - Morphological findings and relationships between histopathology and clinical behavior in 79 cases. *Arch Otorhinolaryngol*. 1988;245(1):1-15. doi:10.1007/BF00463541
26. Barnes L. Intestinal-type adenocarcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Am J Surg Pathol*. 1986;10(3):192-202. doi:10.1097/00000478-198603000-00006
27. Stelow EB, Bishop JA. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Tumors of the Nasal Cavity, Paranasal Sinuses and Skull Base. *Head Neck Pathol*. 2017;11:3-15. doi:10.1007/s12105-017-0791-4
28. Ross M, Pawlina W. Aparato respiratorio. En: Ross M, Pawlina W. *Histología Texto y Atlas Color Con Biología Celular y Molecular*. 5a ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2007:666.
29. Haerle SK, Gullane PJ, Witterick IJ, Zweifel C, Gentili F. Sinonasal Carcinomas. Epidemiology, Pathology, and Management. *Neurosurg Clin N Am*. 2013;24(1):39-49. doi:10.1016/j.nec.2012.08.004
30. López F, Grau JJ, Medina JA, Alobid I. Consenso español para el tratamiento de los tumores nasosinuales. *Acta Otorrinolaringol*. 2017;68(4):226-234. doi:10.1016/j.otorri.2016.07.001
31. Batra PS, Citardi MJ. Endoscopic management of sinonasal malignancy. *Otolaryngol Clin North Am*. 2006;39(3):619-637, x-xi. doi:10.1016/j.otc.2006.01.012
32. Iannetti G, Valentini V, Rinna C, Ventucci E, Marianetti TM. Ethmoido-orbital tumors: Our experience. *J Craniofac Surg*. 2005;16(6):1085-1091. doi:10.1097/01.SCS.0000164332.81428.BA
33. Weymuller EA. Malignancies of the paranasal sinuses. In: Flint P, Haughey B, Robbins K, et al. *Cummings Otolaryngology - Head and Neck Surgery*. 6th ed. St. Louis: Saunders; 2015:1121-1132.
34. Dulguerov P, Allal AS. Nasal and paranasal sinus carcinoma: how can we continue to make progress? *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006;14(2):67-72. doi:10.1097/01.moo.0000193177.62074.fd
35. Unsal AA, Dubal PM, Patel TD, et al. Squamous cell carcinoma of the nasal cavity: A population-based analysis. *Laryngoscope*. 2016;126(3):560-565. doi:10.1002/lary.25531
36. Sen S, Chandra A, Mukhopadhyay S, Ghosh P. Sinonasal Tumors: Computed Tomography and MR Imaging Features. *Neuroimaging Clin N Am*. 2015;25(4):595-

618. doi:10.1016/j.nic.2015.07.006
37. Koeller KK. Radiologic Features of Sinonasal Tumors. *Head Neck Pathol.* 2016;10(1):1-12. doi:10.1007/s12105-016-0686-9
  38. Lund VJ, Howard DJ, Lloyd GAS. CT evaluation of paranasal sinus tumours for cranio-facial resection. *Br J Radiol.* 1983;56(667):439-446. doi:10.1259/0007-1285-56-667-439
  39. Becker C, Kayser G, Pfeiffer J. Squamous cell cancer of the nasal cavity: New insights and implications for diagnosis and treatment. *Head Neck.* 2016;38(Suppl 1):E2112-7. doi:10.1002/hed.24391
  40. Lamarre ED, Batra PS, Lorenz RR, et al. Role of positron emission tomography in management of sinonasal neoplasms - A single institution's experience. *Am J Otolaryngol - Head Neck Med Surg.* 2012;33(3):289-295. doi:10.1016/j.amjoto.2011.08.001
  41. Kutler DI, Wong RJ, Schoder H, Kraus DH. The current status of positron-emission tomography scanning in the evaluation and follow-up of patients with head and neck cancer. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006;14(2):73-81. doi:10.1097/01.moo.0000193182.92568.8d
  42. Head and Neck Cancer Study Group (HNCSG), Monden N, Asakage T, et al. A review of head and neck cancer staging system in the TNM classification of malignant tumors (eighth edition). *Jpn J Clin Oncol.* 2019;49(7):589-595. doi:10.1093/jjco/hyz052
  43. Robin TP, Jones BL, Gordon OM, et al. A comprehensive comparative analysis of treatment modalities for sinonasal malignancies. *Cancer.* 2017;123(16):3040-3049. doi:10.1002/cncr.30686
  44. Bossi P, Farina D, Gatta G, Lombardi D, Nicolai P, Orlandi E. Paranasal sinus cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016;98:45-61. doi:10.1016/j.critrevonc.2015.09.009
  45. Spratt D, Cabanillas R, Lee NY. The Paranasal Sinuses. In: *Target Volume Delineation and Field Setup.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013:45-48. doi:10.1007/978-3-642-28860-9\_6
  46. Raza SM, Garzon-Muvdi T, Gallia GL, Tamargo RJ. Craniofacial resection of midline anterior skull base malignancies: a reassessment of outcomes in the modern era. *World Neurosurg.* 2012;78(1-2):128-136. doi:10.1016/j.wneu.2011.09.014
  47. Castelnuovo P, Battaglia P, Turri-Zanoni M, et al. Endoscopic endonasal surgery for malignancies of the anterior cranial base. *World Neurosurg.* 2014;82(Suppl 6):S22-31. doi:10.1016/j.wneu.2014.07.021
  48. Nicolai P, Castelnuovo P, Villaret AB. Endoscopic resection of sinonasal malignancies. *Curr Oncol Rep.* 2011;13(2):138-144. doi:10.1007/s11912-011-0151-6
  49. Lund VJ, Stammberger H, Nicolai P, et al. European position paper on endoscopic management of tumours of the nose, paranasal sinuses and skull base. *Rhinol Suppl.* 2010;(22):1-143.
  50. Hanna EY, Cardenas AD, DeMonte F, et al. Induction chemotherapy for advanced squamous cell carcinoma of the paranasal sinuses. *Arch Otolaryngol - Head Neck Surg.* 2011;137(1):78-81. doi:10.1001/archoto.2010.231
  51. Bossi P, Perrone F, Miceli R, et al. Tp53 status as guide for the management of ethmoid sinus intestinal-type adenocarcinoma. *Oral Oncol.* 2013;49(5):413-419. doi:10.1016/j.oraloncology.2012.12.011
  52. Choi IJ, Kim D-W, Kim D-Y, Lee CH, Rhee C-S. Predictive markers for neoadjuvant chemotherapy in advanced squamous cell carcinoma of maxillary sinus: Preliminary report. *Acta Otolaryngol.* 2013;133(3):291-296. doi:10.3109/00016489.2012.734928
  53. Holmila R, Bornholdt J, Heikkilä P, et al. Mutations in TP53 tumor suppressor gene in

- wood dust-related sinonasal cancer. *Int J cancer*. 2010;127(3):578-588. doi:10.1002/ijc.25064
54. Robbins KT, Ferlito A, Silver CE, et al. Contemporary management of sinonasal cancer. *Head Neck*. 2011;33(9):1352-1365. doi:10.1002/hed.21515
  55. Ganly I, Patel SG, Singh B, et al. Craniofacial resection for malignant paranasal sinus tumors: Report of an International Collaborative Study. *Head Neck*. 2005;27(7):575-584. doi:10.1002/hed.20165
  56. Kang JH, Cho SH, Kim JP, et al. Treatment outcomes between concurrent chemoradiotherapy and combination of surgery, radiotherapy, and/or chemotherapy in stage III and IV maxillary sinus cancer: multi-institutional retrospective analysis. *J Oral Maxillofac Surg*. 2012;70(7):1717-1723. doi:10.1016/j.joms.2011.06.221
  57. Camp S, Van Gerven L, Poorten V Vander, et al. Long-term follow-up of 123 patients with adenocarcinoma of the sinonasal tract treated with endoscopic resection and postoperative radiation therapy. *Head Neck*. 2016;38(2):294-300. doi:10.1002/hed.23900
  58. Vergez S, du Mayne MD, Coste A, et al. Multicenter study to assess endoscopic resection of 159 sinonasal adenocarcinomas. *Ann Surg Oncol*. 2014;21(4):1384-1390. doi:10.1245/s10434-013-3385-8
  59. Nicolai P, Schreiber A, Bolzoni Villaret A, et al. Intestinal type adenocarcinoma of the ethmoid: Outcomes of a treatment regimen based on endoscopic surgery with or without radiotherapy. *Head Neck*. 2016;38:E996-E1003. doi:10.1002/hed.24144
  60. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology & Genetics. Head and Neck Tumours. International Agency for Research on Cancer (IARC).*; 2005.
  61. Aerts JG, Hegmans JP. Tumor-specific cytotoxic t cells are crucial for efficacy of immunomodulatory antibodies in patients with lung cancer. *Cancer Res*. 2013;73(8):2381-2388. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3932
  62. Muenst S, Läubli H, Soysal SD, Zippelius A, Tzankov A, Hoeller S. The immune system and cancer evasion strategies: Therapeutic concepts. *J Intern Med*. 2016;279(6):541-562. doi:10.1111/joim.12470
  63. Wei S, Kryczek I, Zou W. Regulatory T-cell compartmentalization and trafficking. *Blood*. 2006;108(2):426-431. doi:10.1182/blood-2006-01-0177
  64. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, et al. Regulatory CD4+CD25+ T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res*. 2001;61(12):4766-4772.
  65. Okita R, Saeki T, Takashima S, Yamaguchi Y, Toge T. CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with breast cancer and non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*. 2005;14(5):1269-1273. doi:10.3892/or.14.5.1269
  66. Curiel TJ. Regulatory T cells and treatment of cancer. *Curr Opin Immunol*. 2008;20(2):241-246. doi:10.1016/j.coi.2008.04.008
  67. Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(4):295-307. doi:10.1038/nri1806
  68. Huang Y, Liao H, Zhang Y, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ T cells in gastrointestinal cancers: A meta analysis. *PLoS One*. 2014;9(5). doi:10.1371/journal.pone.0094376
  69. Tzankov A, Meier C, Hirschmann P, Went P, Pileri SA, Dirnhofer S. Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*. 2008;93(2):193-200. doi:10.3324/haematol.11702



70. Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Immunol Res.* 2017;5(1):3-8. doi:10.1158/2326-6066.CIR-16-0297
71. Almand B, Carbone DP. Biological considerations in lung cancer. *Cancer Treat Res.* 2001;105:1-30. doi:10.1007/978-1-4615-1589-0\_1
72. Zhang S, Ma X, Zhu C, Liu L, Wang G, Yuan X. The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Patients with Solid Tumors: A Meta-Analysis. *PLoS One.* 2016;11(10). doi:10.1371/journal.pone.0164514
73. Lu T, Ramakrishnan R, Altiok S, et al. Tumor-infiltrating myeloid cells induce tumor cell resistance to cytotoxic T cells in mice. *J Clin Invest.* 2011;121(10):4015-4029. doi:10.1172/JCI45862
74. Hoechst B, Ormandy LA, Ballmaier M, et al. A New Population of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Hepatocellular Carcinoma Patients Induces CD4+CD25+Foxp3+ T Cells. *Gastroenterology.* 2008;135(1):234-243. doi:10.1053/j.gastro.2008.03.020
75. Pan P-Y, Ma G, Weber KJ, et al. Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Cancer Res.* 2010;70(1):99-108. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1882
76. Cheng P, Corzo CA, Luetsteke N, et al. Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *J Exp Med.* 2008;205(10):2235-2249. doi:10.1084/jem.20080132
77. Finke J, Ko J, Rini B, Rayman P, Ireland J, Cohen P. MDSC as a mechanism of tumor escape from sunitinib mediated anti-angiogenic therapy. *Int Immunopharmacol.* 2011;11(7):856-861. doi:10.1016/j.intimp.2011.01.030
78. Feng P-H, Lee K-Y, Chang Y-L, et al. CD14(+)/S100A9(+) monocytic myeloid-derived suppressor cells and their clinical relevance in non-small cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;186(10):1025-1036. doi:10.1164/rccm.201204-0636OC
79. Vetsika E-K, Koinis F, Gioulbasani M, et al. A circulating subpopulation of monocytic myeloid-derived suppressor cells as an independent prognostic/predictive factor in untreated non-small lung cancer patients. *J Immunol Res.* 2014;2014:659294. doi:10.1155/2014/659294
80. Liu CY, Wang YM, Wang CL, et al. Population alterations of l-arginase- and inducible nitric oxide synthase-expressed CD11b+/CD14-/CD15+/CD33 + myeloid-derived suppressor cells and CD8+ T lymphocytes in patients with advanced-stage non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010;136(1):35-45. doi:10.1007/s00432-009-0634-0
81. Ramachandran IR, Condamine T, Lin C, et al. Bone marrow PMN-MDSCs and neutrophils are functionally similar in protection of multiple myeloma from chemotherapy. *Cancer Lett.* 2016;371(1):117-124. doi:10.1016/j.canlet.2015.10.040
82. Abusamra AJ, Zhong Z, Zheng X, et al. Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8+ T-cell apoptosis. *Blood Cells, Mol Dis.* 2005;35(2):169-173. doi:10.1016/j.bcmd.2005.07.001
83. Fridman WH, Remark R, Goc J, et al. The immune microenvironment: A major player in human cancers. *Int Arch Allergy Immunol.* 2014;164(1):13-26. doi:10.1159/000362332
84. Bachmayr-Heyda A, Aust S, Heinze G, et al. Prognostic impact of tumor infiltrating CD8+ T cells in association with cell proliferation in ovarian cancer patients - a study of the OVCAD consortium. *BMC Cancer.* 2013;13. doi:10.1186/1471-2407-13-422
85. Hu X, Li YQ, Li QG, Ma YL, Peng JJ, Cai SJ. ITGAE Defines CD8+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes Predicting a better Prognostic Survival in Colorectal Cancer. *EBioMedicine.* 2018;35:178-188. doi:10.1016/j.ebiom.2018.08.003

86. Fu Q, Chen N, Ge C, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Oncoimmunology*. 2019;8(7). doi:10.1080/2162402X.2019.1593806
87. Vihervuori H, Autere TA, Repo H, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and CD8+ T cells predict survival of triple-negative breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2019;145(12):3105-3114. doi:10.1007/s00432-019-03036-5
88. Zeng DQ, Yu YF, Ou QY, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes for clinical therapeutic research in patients with non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2016;7(12):13765-13781. doi:10.18632/oncotarget.7282
89. Vassilakopoulou M, Avgeris M, Velcheti V, et al. Evaluation of PD-L1 Expression and Associated Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2016;22(3):704-713. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-1543
90. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *J Immunol*. 2000;164(12):6166-6173. doi:10.4049/jimmunol.164.12.6166
91. Robert A Harris CDM. Macrophage Polarization: Decisions That Affect Health. *J Clin Cell Immunol*. 2015;06(05). doi:10.4172/2155-9899.1000364
92. Ruffell B, Coussens LM. Macrophages and therapeutic resistance in cancer. *Cancer Cell*. 2015;27(4):462-472. doi:10.1016/j.ccell.2015.02.015
93. Mills CD. Anatomy of a discovery: m1 and m2 macrophages. *Front Immunol*. 2015;6:212. doi:10.3389/fimmu.2015.00212
94. White JR, Harris RA, Lee SR, et al. Genetic amplification of the transcriptional response to hypoxia as a novel means of identifying regulators of angiogenesis. *Genomics*. 2004;83(1):1-8. doi:10.1016/S0888-7543(03)00215-5
95. Noy R, Pollard JW. Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. *Immunity*. 2014;41(1):49-61. doi:10.1016/j.immuni.2014.06.010
96. Biswas SK, Allavena P, Mantovani A. Tumor-associated macrophages: Functional diversity, clinical significance, and open questions. *Semin Immunopathol*. 2013;35(5):585-600. doi:10.1007/s00281-013-0367-7
97. Muenst S, Läubli H, Soysal SD, Zippelius A, Tzankov A, Hoeller S. The immune system and cancer evasion strategies: therapeutic concepts. *J Intern Med*. 2016;279(6):541-562. doi:10.1111/joim.12470
98. Ferris RL. Immunology and immunotherapy of head and neck cancer. *J Clin Oncol*. 2015;33(29):3293-3304. doi:10.1200/JCO.2015.61.1509
99. Whiteside TL. Head and neck carcinoma immunotherapy: Facts and hopes. *Clin Cancer Res*. 2018;24(1):6-13. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-1261
100. Lesterhuis WJ, Punt CJA, Hato S V, et al. Platinum-based drugs disrupt STAT6-mediated suppression of immune responses against cancer in humans and mice. *J Clin Invest*. 2011;121(8):3100-3108. doi:10.1172/JCI43656
101. Jie H-B, Gildener-Leapman N, Li J, et al. Intratumoral regulatory T cells upregulate immunosuppressive molecules in head and neck cancer patients. *Br J Cancer*. 2013;109(10):2629-2635. doi:10.1038/bjc.2013.645
102. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, et al. Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2010;363(5):411-422. doi:10.1056/nejmoa1001294
103. Sukari A, Nagasaka M, Al-Hadidi A, Lum LG. Cancer immunology and immunotherapy. *Anticancer Res*. 2016;36(11):5593-5606. doi:10.21873/anticancer.11144
104. Bauman JE, Ferris RL. Integrating novel therapeutic monoclonal antibodies into the

- management of head and neck cancer. *Cancer*. 2014;120(5):624-632. doi:10.1002/cncr.28380
105. Seiwert TY, Burtneß B, Mehra R, et al. Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(7):956-965. doi:10.1016/S1470-2045(16)30066-3
  106. Ferris RL, Blumenschein G, Fayette J, et al. Nivolumab for recurrent squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2016;375(19):1856-1867. doi:10.1056/NEJMoa1602252
  107. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008;26(1):677-704. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331
  108. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQM, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(26):2455-2465. doi:10.1056/NEJMoa1200694
  109. Ishii H, Azuma K, Kawahara A, et al. Significance of programmed cell death-ligand 1 expression and its association with survival in patients with small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2015;10(3):426-430. doi:10.1097/JTO.0000000000000414
  110. Sundar R, Soong R, Cho BC, Brahmer JR, Soo RA. Immunotherapy in the treatment of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2014;85(2):101-109. doi:10.1016/j.lungcan.2014.05.005
  111. Dong H, Strome SE, Salomao DR, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*. 2002;8(8):793-800. doi:10.1038/nm730
  112. Curiel TJ, Wei S, Dong H, et al. Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat Med*. 2003;9(5):562-567. doi:10.1038/nm863
  113. Wu C, Zhu Y, Jiang J, Zhao J, Zhang XG, Xu N. Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance. *Acta Histochem*. 2006;108(1):19-24. doi:10.1016/j.acthis.2006.01.003
  114. Nomi T, Sho M, Akahori T, et al. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13(7):2151-2157. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-2746
  115. Berger R, Rotem-Yehudar R, Slama G, et al. Phase I safety and pharmacokinetic study of CT-011, a humanized antibody interacting with PD-1, in patients with advanced hematologic malignancies. *Clin Cancer Res*. 2008;14(10):3044-3051. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4079
  116. Brahmer JR. Harnessing the immune system for the treatment of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2013;31(8):1021-1028. doi:10.1200/JCO.2012.45.8703
  117. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(26):2443-2454. doi:10.1056/NEJMoa1200690
  118. Pardoll DM. Immunology beats cancer: A blueprint for successful translation. *Nat Immunol*. 2012;13(12):1129-1132. doi:10.1038/ni.2392
  119. Yang CY, Lin MW, Chang YL, Wu CT, Yang PC. Programmed cell death-ligand 1 expression in surgically resected stage I pulmonary adenocarcinoma and its correlation with driver mutations and clinical outcomes. *Eur J Cancer*. 2014;50(7):1361-1369. doi:10.1016/j.ejca.2014.01.018
  120. Wang A, Wang HY, Liu Y, et al. The prognostic value of PD-L1 expression for non-small cell lung cancer patients: A meta-analysis. *Eur J Surg Oncol*. 2015;41(4):450-456. doi:10.1016/j.ejso.2015.01.020

121. Borczuk AC, Allen TC. PD-L1 and lung cancer: The era of precision-ish medicine? *Arch Pathol Lab Med.* 2016;140(4):351-354. doi:10.5858/arpa.2015-0509-SA
122. Taube JM, Anders RA, Young GD, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-H1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med.* 2012;4(127). doi:10.1126/scitranslmed.3003689
123. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 pathways similarities, differences, and implications of their inhibition. *Am J Clin Oncol Cancer Clin Trials.* 2016;39(1):98-106. doi:10.1097/COC.0000000000000239
124. Lee H, Lee S, Heo Y. Molecular interactions of antibody drugs targeting PD-1, PD-L1, and CTLA-4 in immuno-oncology. *Molecules.* 2019. doi:10.3390/molecules24061190
125. Taube JM, Klein A, Brahmer JR, et al. Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin Cancer Res.* 2014;20(19):5064-5074. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-3271
126. Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2016;375(19):1823-1833. doi:10.1056/NEJMoa1606774
127. Herbst RS, Baas P, Kim DW, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): A randomised controlled trial. *Lancet.* 2016;387(10027):1540-1550. doi:10.1016/S0140-6736(15)01281-7
128. Paré L, Pascual T, Seguí E, et al. Association between PD1 mRNA and response to anti-PD1 monotherapy across multiple cancer types. *Ann Oncol.* 2018;29(10):2121-2128. doi:10.1093/annonc/mdy335
129. Schultheis AM, Scheel AH, Ozretić L, et al. PD-L1 expression in small cell neuroendocrine carcinomas. *Eur J Cancer.* 2015;51(3):421-426. doi:10.1016/j.ejca.2014.12.006
130. Taube JM, Anders RA, Young GD, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-H1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med.* 2012;4(127). doi:10.1126/scitranslmed.3003689
131. Tsai TF, Lin JF, Lin YC, et al. Cisplatin contributes to programmed death-ligand 1 expression in bladder cancer through ERK1/2-AP-1 signaling pathway. *Biosci Rep.* 2019;39(9). doi:10.1042/BSR20190362
132. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev.* 2010;236(1):219-242. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00923.x
133. Qin X, Liu C, Zhou Y, Wang G. Cisplatin induces programmed death-1-ligand 1(PD-L1) over-expression in hepatoma H22 cells via Erk/Mapk signaling pathway. *Cell Mol Biol.* 2010;56(Suppl. 1). doi:10.1170/156
134. Taube JM, Klein A, Brahmer JR, et al. Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin Cancer Res.* 2014;20(19):5064-5074. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-3271
135. Xing X, Guo J, Wen X, et al. Analysis of PD1, PDL1, PDL2 expression and T cells infiltration in 1014 gastric cancer patients. *Oncoimmunology.* 2018;7(3). doi:10.1080/2162402X.2017.1356144
136. Yagi T, Baba Y, Ishimoto T, et al. PD-L1 Expression, Tumor-infiltrating Lymphocytes, and Clinical Outcome in Patients with Surgically Resected Esophageal Cancer. *Ann Surg.* 2019;269(3):471-478. doi:10.1097/SLA.0000000000002616
137. Tomioka N, Azuma M, Ikarashi M, et al. The therapeutic candidate for immune

- checkpoint inhibitors elucidated by the status of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and programmed death ligand 1 (PD-L1) expression in triple negative breast cancer (TNBC). *Breast Cancer*. 2018;25(1):34-42. doi:10.1007/s12282-017-0781-0
138. Teng MWL, Ngiew SF, Ribas A, Smyth MJ. Classifying cancers based on T-cell infiltration and PD-L1. *Cancer Res*. 2015;75(11):2139-2145. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-0255
  139. Sholl LM, Aisner DL, Allen TC, et al. Programmed death ligand-1 immunohistochemistry-A new challenge for pathologists: A perspective from members of the pulmonary pathology society. *Arch Pathol Lab Med*. 2016;140(4):341-344. doi:10.5858/arpa.2015-0506-SA
  140. Kerr KM, Hirsch FR. Programmed death ligand-1 immunohistochemistry: Friend or foe? *Arch Pathol Lab Med*. 2016;140(4):326-331. doi:10.5858/arpa.2015-0522-SA
  141. Schultheis AM, Scheel AH, Ozretić L, et al. PD-L1 expression in small cell neuroendocrine carcinomas. *Eur J Cancer*. 2015;51(3):421-426. doi:10.1016/j.ejca.2014.12.006
  142. Bauml J, Seiwert TY, Pfister DG, et al. Pembrolizumab for platinum- and cetuximab-refractory head and neck cancer: Results from a single-arm, phase II study. *J Clin Oncol*. 2017;35(14):1542-1549. doi:10.1200/JCO.2016.70.1524
  143. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, et al. Overall survival with durvalumab after chemoradiotherapy in stage III NSCLC. *N Engl J Med*. 2018;379(24):2342-2350. doi:10.1056/NEJMoa1809697
  144. Herbst RS, Soria JC, Kowanzetz M, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*. 2014;515(7528):563-567. doi:10.1038/nature14011
  145. Riobello C, Vivanco B, Reda S, et al. Programmed death ligand-1 expression as immunotherapeutic target in sinonasal cancer. *Head Neck*. 2018;40(4):818-827. doi:10.1002/hed.25067
  146. Quan H, Yan L, Wang S, Wang S. Clinical relevance and significance of programmed death-ligand 1 expression, tumor-infiltrating lymphocytes, and p16 status in sinonasal squamous cell carcinoma. *Cancer Manag Res*. 2019;11:4335-4345. doi:10.2147/CMAR.S201568
  147. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998;4(7):844-847. doi:10.1038/nm0798-844
  148. Harvey RJ, Dalgorf DM. Chapter 10: Sinonasal malignancies. *Am J Rhinol Allergy*. 2013;27 Suppl 1(c):35-38. doi:10.2500/ajra.2013.27.3894
  149. Hoppe BS, Stegman LD, Zelefsky MJ, et al. Treatment of nasal cavity and paranasal sinus cancer with modern radiotherapy techniques in the postoperative setting-the MSKCC experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007;67(3):691-702. doi:10.1016/j.ijrobp.2006.09.023
  150. Bussi M, Gervasio CF, Riontino E, et al. Study of ethmoidal mucosa in a population at occupational high risk of sinonasal adenocarcinoma. *Acta Otolaryngol*. 2002;122(2):197-201. doi:10.1080/00016480252814225
  151. Suarez C, Llorente JL, De Leon RF, Maseda E, Lopez A. Prognostic factors in sinonasal tumors involving the anterior skull base. *Head Neck*. 2004;26(2):136-144. doi:10.1002/hed.10358
  152. Paulino A, Fisher S, Marks J. Is prophylactic neck irradiation indicated in patients with squamous cell carcinoma of the maxillary sinus? *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1997;39(Suppl. 2):283-289. doi:10.1016/S0360-3016(97)00293-9
  153. Kim GE, Chung EJ, Lim JJ, et al. Clinical significance of neck node metastasis in

- squamous cell carcinoma of the maxillary antrum. *Am J Otolaryngol - Head Neck Med Surg.* 1999;20(6):383-390. doi:10.1016/S0196-0709(99)90078-9
154. Hayashi T, Nonaka S, Bando N, Kobayashi Y, Imada M, Harabuchi Y. Treatment Outcome of Maxillary Sinus Squamous Cell Carcinoma. *Cancer.* 2001;92(6):1495–1503. doi:10.1002/1097-0142(20010915)92:6<1495::AID-CNCR1474>3.0.CO;2-P
  155. Dulguerov P, Jacobsen M, Allal A, Lehmann W, Calcaterra T. Nasal and Paranasal Sinus Carcinoma: Are We Making Progress? A Series of 220 Patients and a Systematic Review. *Cancer.* 2001;92(12):3012–3029. doi:10.1002/1097-0142(20011215)92:12<3012::AID-CNCR10131>3.0.CO;2-E
  156. Kılıç S, Samarraı R, Kılıç SS, Mikhael M, Baredes S, Eloy JA. Incidence and survival of sinonasal adenocarcinoma by site and histologic subtype\*. *Acta Otolaryngol.* 2018;138(4):415-421. doi:10.1080/00016489.2017.1401229
  157. Blanch JL, Ruiz AM, Alos L, Traserra-Coderch J, Bernal-Sprekelsen M. Treatment of 125 sinonasal tumors: Prognostic factors, outcome, and follow-up. *Otolaryngol - Head Neck Surg.* 2004;131(6):973-976. doi:10.1016/j.otohns.2004.08.001
  158. Kim HR, Ha SJ, Hong MH, et al. PD-L1 expression on immune cells, but not on tumor cells, is a favorable prognostic factor for head and neck cancer patients. *Sci Rep.* 2016;6. doi:10.1038/srep36956
  159. Straub M, Drecoll E, Pfarr N, et al. CD274/PD-L1 gene amplification and PD-L1 protein expression are common events in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oncotarget.* 2016;7(11):12024-12034. doi:10.18632/oncotarget.7593
  160. Lin YM, Sung WW, Hsieh MJ, et al. High PD-L1 expression correlates with metastasis and poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *PLoS One.* 2015;10(11). doi:10.1371/journal.pone.0142656
  161. Karpathiou G, Casteillo F, Giroult JB, et al. Prognostic impact of immune microenvironment in laryngeal and pharyngeal squamous cell carcinoma: Immune cell subtypes, immuno-suppressive pathways and clinicopathologic characteristics. *Oncotarget.* 2017;8(12):19310-19322. doi:10.18632/oncotarget.14242
  162. Parra ER, Behrens C, Rodriguez-Canales J, et al. Image analysis-based assessment of PD-L1 and tumor-associated immune cells density supports distinct intratumoral microenvironment groups in non-small cell lung carcinoma patients. *Clin Cancer Res.* 2016;22(24):6278-6289. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2443
  163. Azuma K, Ota K, Kawahara A, et al. Association of PD-L1 overexpression with activating EGFR mutations in surgically resected nonsmall-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2014;25(10):1935-1940. doi:10.1093/annonc/mdu242
  164. Wu S, Shi X, Sun J, et al. The significance of programmed cell death ligand 1 expression in resected lung adenocarcinoma. *Oncotarget.* 2017;8(10):16421-16429. doi:10.18632/oncotarget.14851
  165. Noh BJ, Kim JH, Eom DW. Prognostic significance of categorizing gastric carcinoma by PD-L1 expression and tumor infiltrating lymphocytes. *Ann Clin Lab Sci.* 2018;48(6):695-706.
  166. Wen T, Wang Z, Li Y, et al. A four-factor immunoscore system that predicts clinical outcome for stage II/III gastric cancer. *Cancer Immunol Res.* 2017;5(7):524-534. doi:10.1158/2326-6066.CIR-16-0381
  167. Tokito T, Azuma K, Kawahara A, et al. Predictive relevance of PD-L1 expression combined with CD8+ TIL density in stage III non-small cell lung cancer patients receiving concurrent chemoradiotherapy. *Eur J Cancer.* 2016;55:7-14. doi:10.1016/j.ejca.2015.11.020
  168. Droeser RA, Hirt C, Viehl CT, et al. Clinical impact of programmed cell death ligand 1 expression in colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2013;49(9):2233-2242.

- doi:10.1016/j.ejca.2013.02.015
169. Schalper KA, Velcheti V, Carvajal D, et al. In situ tumor PD-L1 mRNA expression is associated with increased tils and better outcome in breast carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2014;20(10):2773-2782. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-2702
  170. Velcheti V, Schalper KA, Carvajal DE, et al. Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. *Lab Investig.* 2014;94(1):107-116. doi:10.1038/labinvest.2013.130
  171. Chen SW, Li SH, Shi DB, et al. Expression of PD-1/PD-L1 in head and neck squamous cell carcinoma and its clinical significance. *Int J Biol Markers.* 2019;34(4):398-405. doi:10.1177/1724600819884722
  172. Thompson RH, Dong H, Kwon ED. Implications of B7-H1 expression in clear cell carcinoma of the kidney for prognostication and therapy. *Clin Cancer Res.* 2007;13(2). doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1868
  173. Gao Q, Wang XY, Qiu SJ, et al. Overexpression of PD-L1 significantly associates with tumor aggressiveness and postoperative recurrence in human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2009;15(3):971-979. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1608
  174. Chen Y Bin, Mu CY, Huang JA. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 expression in patients with non-small cell lung cancer: A 5-year-follow-up study. *Tumori.* 2012;98(6):751-755. doi:10.1700/1217.13499
  175. Jiang X, Zhou J, Giobbie-Hurder A, Wargo J, Hodi FS. The activation of MAPK in melanoma cells resistant to BRAF inhibition promotes PD-L1 expression that is reversible by MEK and PI3K inhibition. *Clin Cancer Res.* 2013;19(3):598-609. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2731
  176. Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, et al. Nivolumab plus Ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med.* 2013;369(2):122-133. doi:10.1056/NEJMoa1302369
  177. Sholl LM, Aisner DL, Allen TC, et al. Programmed death ligand-1 immunohistochemistry-A new challenge for pathologists: A perspective from members of the pulmonary pathology society. *Arch Pathol Lab Med.* 2016;140(4):341-344. doi:10.5858/arpa.2015-0506-SA
  178. Yearley JH, Gibson C, Yu N, et al. PD-L2 expression in human tumors: Relevance to anti-PD-1 therapy in cancer. *Clin Cancer Res.* 2017;23(12):3158-3167. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-1761
  179. Akbay EA, Koyama S, Carretero J, et al. Activation of the PD-1 pathway contributes to immune escape in EGFR-driven lung tumors. *Cancer Discov.* 2013;3(12):1355-1363. doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0310
  180. Ji M, Liu Y, Li Q, et al. PD-1/PD-L1 pathway in non-small-cell lung cancer and its relation with EGFR mutation. *J Transl Med.* 2015;13(1). doi:10.1186/s12967-014-0373-0
  181. Karachaliou N, Mayo-de-las-Casas C, Molina-Vila MA, Rosell R. Real-time liquid biopsies become a reality in cancer treatment. *Ann Transl Med.* 2015;3(3). doi:10.3978/j.issn.2305-5839.2015.01.16
  182. Pailler E, Adam J, Barthélémy A, et al. Detection of circulating tumor cells harboring a unique ALK rearrangement in ALK-positive non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2013;31(18):2273-2281. doi:10.1200/JCO.2012.44.5932
  183. Thierry AR, Mouliere F, El Messaoudi S, et al. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat Med.* 2014;20(4):430-435. doi:10.1038/nm.3511
  184. Knief J, Lazar-Karsten P, Wellner U, Hummel R, Thorns C. Density of CD8-positive tumor-infiltrating t-lymphocytes is an independent prognostic factor in

- adenocarcinoma of the esophagogastric junction. *Histol Histopathol.* 2019;34(10):1121-1129. doi:10.14670/HH-18-109
185. Gao Y, Li S, Xu D, et al. Prognostic value of programmed death-1, programmed death-ligand 1, programmed death-ligand 2 expression, and CD8(+) T cell density in primary tumors and metastatic lymph nodes from patients with stage T1-4N+M0 gastric adenocarcinoma. *Chin J Cancer.* 2017;36(1). doi:10.1186/s40880-017-0226-3
  186. Rashed HE, Abdelrahman AE, Abdelgawad M, Balata S, Shabrawy M El. Prognostic significance of programmed cell death ligand 1 (PD-L1), CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and p53 in non-small cell lung Cancer: An immunohistochemical study. *Turk Patoloji Derg.* 2017;33(3):211-222. doi:10.5146/tjpath.2017.01398
  187. Kim SH, Go S Il, Song DH, et al. Prognostic impact of CD8 and programmed death-ligand 1 expression in patients with resectable non-small cell lung cancer. *Br J Cancer.* 2019;120(5):547-554. doi:10.1038/s41416-019-0398-5
  188. Soo RA, Chen Z, Yan Teng RS, et al. Prognostic significance of immune cells in non-small cell lung cancer: Meta-analysis. *Oncotarget.* 2018;9(37):24801-24820. doi:10.18632/oncotarget.24835
  189. Solomon B, Young RJ, Bressel M, et al. Prognostic significance of PD-L1 $\beta$  and CD8 $\beta$  immune cells in HPV $\beta$  Oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Res.* 2018;6(3):295-304. doi:10.1158/2326-6066.CIR-17-0299
  190. Gennen K, Käsmann L, Taugner J, et al. Prognostic value of PD-L1 expression on tumor cells combined with CD8+ TIL density in patients with locally advanced non-small cell lung cancer treated with concurrent chemoradiotherapy. *Radiat Oncol.* 2020;15(1). doi:10.1186/s13014-019-1453-3
  191. El-Guindy DM, Helal DS, Sabry NM, Abo El-Nasr M. Programmed cell death ligand-1 (PD-L1) expression combined with CD8 tumor infiltrating lymphocytes density in non-small cell lung cancer patients. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2018;30(4):125-131. doi:10.1016/j.jnci.2018.08.003
  192. Yang H, Shi J, Lin D, et al. Prognostic value of PD-L1 expression in combination with CD8+ TILs density in patients with surgically resected non-small cell lung cancer. *Cancer Med.* 2018;7(1):32-45. doi:10.1002/cam4.1243
  193. Le DT, Uram JN, Wang H, et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med.* 2015;372(26):2509-2520. doi:10.1056/NEJMoa1500596
  194. Marabelle A, Le DT, Ascierto PA, et al. Efficacy of pembrolizumab in patients with noncolorectal high microsatellite instability/ mismatch repair-deficient cancer: Results from the phase II KEYNOTE-158 study. *J Clin Oncol.* 2020;38(1):1-10. doi:10.1200/JCO.19.02105
  195. Wu Y, Xu J, Du C, et al. The Predictive Value of Tumor Mutation Burden on Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitors in Cancers: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Oncol.* 2019;9. doi:10.3389/fonc.2019.01161
  196. Califano R, Lal R, Lewanski C, et al. Patient selection for anti-PD-1/PD-L1 therapy in advanced non-small-cell lung cancer: Implications for clinical practice. *Futur Oncol.* 2018;14(23):2415-2431. doi:10.2217/fon-2018-0330
  197. Willis C, Fiander M, Tran D, et al. Tumor mutational burden in lung cancer: A systematic literature review. *Oncotarget.* 2019;10(61):6604-6622. doi:10.18632/oncotarget.27287
  198. Cao D, Xu H, Xu X, Guo T, Ge W. High tumor mutation burden predicts better efficacy of immunotherapy: a pooled analysis of 103078 cancer patients. *Oncoimmunology.* 2019;8(9). doi:10.1080/2162402X.2019.1629258
  199. Koyama S, Akbay EA, Li YY, et al. STK11/LKB1 deficiency promotes neutrophil recruitment and proinflammatory cytokine production to suppress T-cell activity in the



- lung tumor microenvironment. *Cancer Res.* 2016;76(5):999-1008. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-1439
200. Kadara H, Choi M, Zhang J, et al. Whole-exome sequencing and immune profiling of early-stage lung adenocarcinoma with fully annotated clinical follow-up. *Ann Oncol.* 2017;28(1):75-82. doi:10.1093/annonc/mdw436
  201. Skoulidis F, Goldberg ME, Greenawalt DM, et al. STK11/LKB1 mutations and PD-1 inhibitor resistance in KRAS-mutant lung adenocarcinoma. *Cancer Discov.* 2018;8(7):822-835. doi:10.1158/2159-8290.CD-18-0099
  202. Restifo NP, Marincola FM, Kawakami Y, Taubenberger J, Yannelli JR, Rosenberg SA. Loss of functional beta2-microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88(2):100-108. doi:10.1093/jnci/88.2.100
  203. Zaretsky JM, Garcia-Diaz A, Shin DS, et al. Mutations associated with acquired resistance to PD-1 blockade in melanoma. *N Engl J Med.* 2016;375(9):819-829. doi:10.1056/NEJMoa1604958
  204. Shin DS, Zaretsky JM, Escuin-Ordinas H, et al. Primary resistance to PD-1 blockade mediated by JAK1/2 mutations. *Cancer Discov.* 2017;7(2):188-201. doi:10.1158/2159-8290.CD-16-1223
  205. Hegde PS, Chen DS. Top 10 Challenges in Cancer Immunotherapy. *Immunity.* 2020;52(1):17-35. doi:10.1016/j.immuni.2019.12.011
  206. Cramer JD, Burtneß B, Ferris RL. Immunotherapy for head and neck cancer: Recent advances and future directions. *Oral Oncol.* 2019;99:104460. doi:10.1016/j.oraloncology.2019.104460



# 9. Anexo



## 9.1. Comunicaciones a congresos



1. **Título:** La expresión de PD-L1 como diana terapéutica en el cáncer nasosinusal  
**Autores:** Sara Reda, Blanca Vivanco, Cristina Riobello, Alejandro López-Hernández, Cristina García-Inclán, Sira Potes-Ares, Virginia Naves Cabal, Fernando López, Mario Hermsen, José Luis Llorente  
**Congreso:** 68 Congreso Nacional de la Sociedad Española de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello (Forum de investigación)  
**Lugar y fecha:** Madrid, Noviembre de 2017
2. **Título:** PD-L1 expression and infiltrating CD8+ lymphocytes as immunotherapeutic targets in sinonasal cancer  
**Autores:** Sara Reda, Fernando López, Rocio García-Marín, Virginia Naves-Cabal, Cristina Riobello, Mario Hermsen, José Luis Llorente  
**Congreso:** 5º Congreso Europeo de ORL  
**Lugar y fecha:** Bruselas, Junio de 2019

## 9.2. Publicaciones en revistas científicas

1. Riobello C, Vivanco B, **Reda S**, López-Hernández A, García-Inclán C, Potes-Ares S, Cabal VN, López F, Llorente JL, Hermsen MA. Programmed death ligand-1 expression as immunotherapeutic target in sinonasal cancer. *Head Neck*. 2018;40(4):818-827. doi:10.1002/hed.25067
2. **Reda S\***, García-Marín R\*, Riobello C, Cabal VN, Suárez-Fernández L, Vivanco B, López F, Llorente JL, Hermsen MA (\*Contributed equally). CD8+ Tumour-Infiltrating Lymphocytes and Tumour Microenvironment Immune Types as Biomarkers for Immunotherapy in Sinonasal Intestinal-Type Adenocarcinoma. *Vaccines*. 2020;8(2):202. doi:10.3390/vaccines8020202



## Programmed death ligand-1 expression as immunotherapeutic target in sinonasal cancer

Cristina Riobello MSc<sup>1</sup> | Blanca Vivanco MD, PhD<sup>2</sup> | Sara Reda MD<sup>1</sup> |  
Alejandro López-Hernández MSc<sup>1</sup> | Cristina García-Inclán PhD<sup>1</sup> |  
Sira Potes-Ares BSc<sup>1</sup> | Virginia N. Cabal BSc<sup>1</sup> | Fernando López MD, PhD<sup>1</sup>  |  
José Luis Llorente MD, PhD<sup>1</sup> | Mario A. Hermsen PhD<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Department of Otolaryngology, Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA), Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain

<sup>2</sup>Department of Pathology, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain

### Correspondence

Mario A. Hermsen, Department of Otorrinolaringología, Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA), Edificio FINBA, Laboratory ORL, Hospital Universitario Central de Asturias, Avenida de Roma s/n, 33011 Oviedo, Spain.  
Email: mhermsen@hca.es

### Funding information

This study was funded by grants PI13-646 and PI15-1629 from the Fondos de Investigación Sanitaria (FIS), grant RD12/0036/0015 from the Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC), and from the Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC) grant CB16/12/00390, Spain. Plan Nacional de I+D+I 2008-2011 of the Plan Estatal de I+D+I 2013-2016, cofinanced by the FEDER Funding Program from the European Union.

### Abstract

**Background:** Sinonasal cancer carries a poor prognosis, especially in recurrent stages, and it is a disease with very limited treatment options.

**Methods:** The expression of programmed death ligand-1 (PD-L1) as a marker for immunotherapy was evaluated in 53 sinonasal squamous cell carcinoma (SCC) and 126 intestinal-type adenocarcinoma (ITAC) samples. Results were correlated to clinicopathological characteristics and follow-up data.

**Results:** Membranous PD-L1 staining of tumor cells was observed in 34% (18/53) of the sinonasal SCC samples and in 17% (22/126) of the ITAC samples. The PD-L1 positivity on infiltrating immune cells occurred in 45% (24/53) of the sinonasal SCC samples and in 33% (41/126) of the ITAC samples. Expression of PD-L1 showed no correlation to clinicopathological parameters and was not an independent risk factor for survival.

**Conclusion:** The PD-L1 positivity does not seem to have prognostic value. However, a proportion of patients with sinonasal SCC and ITAC may benefit from therapy with immune checkpoint inhibitors that recently have been approved for clinical application in head and neck cancer.

### KEYWORDS

adenocarcinoma, immunotherapy, programmed death ligand-1 (PD-L1), sinonasal cancer, squamous cell carcinoma

## 1 | INTRODUCTION

Tumors in the sinonasal cavities represent 5% of all head and neck cancers with an incidence of approximately 0.5 of 100 000 inhabitants.<sup>1,2</sup> Squamous cell carcinoma (SCC) and intestinal-type adenocarcinoma (ITAC) represent approximately 70%-80% of sinonasal cancer, the remainder include

a miscellany of neuroendocrine carcinomas, neuroectodermal neoplasms, salivary gland tumors, and undifferentiated carcinomas. Sinonasal SCC and ITAC have been etiologically related to occupational exposures, including wood and leather dust, nickel, and chromium.<sup>3</sup> There are also indications that human papillomavirus (HPV) and Epstein-Barr virus play a role in the development of a subset of sinonasal

cancer.<sup>4,5</sup> Diagnosis of these tumors is often late due to unspecific symptoms similar to inflammatory processes.

Despite improvements in the field of surgery and radiotherapy, the prognosis is still poor with a 5-year overall survival of 30%-50%.<sup>1,2,6,7</sup> Typically, all sinonasal tumors frequently develop local recurrences (50%-80%), the main cause of death. Lymph node or distant metastasis occur in 10%-20% of cases.<sup>1,2,6,7</sup> For locally advanced sinonasal tumors, treatment usually is surgery combined with radiotherapy, and, in some cases, a multimodal approach, including chemotherapy.<sup>1,8</sup> However, there is a clear need for new therapeutic options.

Molecular genetic studies may guide the application of modern anticancer drugs that target specific signaling pathways. Immunotherapy may be an option for treatment of sinonasal cancer. Specific monoclonal antibodies can inhibit the programmed death-1 (PD-1)/programmed death ligand-1 (PD-L1) immune checkpoint pathway and enhance the anti-tumor activity of the immune system. In clinical trials with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) and non-small cell lung cancer (NSCLC), two tumors with histological similarity to sinonasal SCC and ITAC, immunotherapy has shown significant response rates.<sup>9-14</sup> In 2016, the Food and Drug Administration (FDA) approved the use of pembrolizumab and nivolumab for recurrent and metastatic HNSCC. Although this is still subject to further investigation, membranous PD-L1 protein expression on tumors and infiltrating immune cells is a means to predict clinical efficacy of immunotherapy. The purpose of this study was to evaluate the prevalence of PD-L1 expression in a series of 179 patients with sinonasal SCC and ITAC.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Patients and clinical variables

Primary tumor samples were obtained from previously untreated patients, 53 with sinonasal SCC who were seen between 1989 and 2009 and 126 with ITAC seen between 1978 and 2014 at the Department of Otolaryngology at the Hospital Universitario Central de Asturias (Oviedo, Spain). Written informed consent for the collection, storage, and analysis of specimens was obtained from all patients. The study had received prior approval from our institutional ethical committee. Details on the clinical features are presented in Table 1. The disease stage is according to the TNM system for tumor classification.<sup>15</sup> The ITAC subtypes were histologically evaluated by an experienced pathologist (B.V.) according to the World Health Organization histological classification.<sup>2</sup> Eleven were papillary type or papillary tubular cylinder cell I (PTCC-I), 79 colonic (PTCC-II), 9 solid (PTCC-III) and 27 mucinous type. Cases showing more than 1 type were classified according to the worst histology. A

history of wood dust exposure was recorded for 106 of 121 patients (88%) with ITAC. Craniofacial resection was performed in the majority of cases; 26 cases of ITAC and 2 cases of sinonasal SCC were treated with endoscopy surgery. Neck dissection was performed in 2 patients with ITAC and 5 patients with sinonasal SCC. After radical surgery, 42 of 53 patients (79%) with sinonasal SCC and 75 of 121 patients (62%) with ITAC received radiotherapy with 60 to 70 Gy using 3D image-based treatment planning. The median follow-up was 18 months (range 1-312 months) for the patients with sinonasal SCC and 30 months (range 1-460 months) for the patients with ITAC.

### 2.2 | Immunohistochemistry

Tissue microarray blocks were prepared from formalin-fixed paraffin-embedded tumor tissues using the Beecher Tissue Microarrayer (Beecher Instruments, Silver Spring, MD). In total, 7 tissue microarray blocks were constructed, containing three 1-mm cores from different areas of 179 sinonasal tumors. Each block included normal sinonasal mucosa samples as internal controls. Three micrometer sections were stained with hematoxylin-eosin and reviewed by 1 pathologist to determine whether the samples contained a good representation of the original tumor blocks. Immunohistochemistry was performed on an automatic staining workstation (Dako Autostainer Plus; DakoCytomation) using a 1:100 dilution of the monoclonal rabbit anti-PD-L1 clone E1L3N (Cell Signaling Technology, Cambridge, UK) and antigen retrieval by EnVision FLEX + Mouse (LINKER), high pH (DakoCytomation) during 20 minutes. The slides were evaluated in a double-blind manner by 3 observers (C.R., B.V., and M.A.H.) and discrepancies between observers were solved afterward by looking together using a multihead microscope. Tumors were scored in 5 classes: 0%; 1%-5%; 5%-25%; 25%-50%, and 50%-100% membranous staining and then dichotomized into negative (5% or lower) or positive (5%-100%). The PD-L1 staining of immune cells was evaluated in the same manner. The 5% cutoff was chosen in accordance with most studies in the field, including clinical immunotherapy trials.<sup>9,10,13,16,17</sup>

### 2.3 | Statistical analysis

Correlations between the immunohistochemistry results and clinicopathological variables were analyzed by SPSS version 15.0 software for Windows (SPSS, Chicago, IL), using the Pearson chi-square and Fischer Exact tests. Kaplan-Meier analysis was performed for estimation of overall and disease-free survival, comparing distributions through the Mantel-Cox log-rank test. Multivariate Cox regression analysis was performed for factors possibly related to survival. Values of  $P < .05$  were considered significant.



**TABLE 1** Patient and tumor characteristics

	Sinonasal SCC: no. of patients (%)				ITAC: no. of patients (%)			
	53 total	18 PD-L1-positive	35 PD-L1-negative	<i>P</i> value	126 total	22 PD-L1-positive	104 PD-L1-negative	<i>P</i> value
<b>Sex</b>								
Female	16 (30)	8 (50)	8 (50)	.125	2 (2)	1 (50)	1 (50)	.320
Male	37 (70)	10 (27)	27 (73)		124 (98)	21 (17)	103 (83)	
<b>Tumor site</b>								
Maxillary sinus	42 (79)	14 (33)	28 (67)	.999	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA
Ethmoid sinus	11 (22)	4 (36)	7 (64)		126 (100)	22 (17)	104 (83)	
<b>Disease stage</b>								
I	0 (0)	0 (0)	0 (0)	.550	25 (20)	3 (12)	22 (88)	.819
II	4 (7)	0 (0)	4 (100)		14 (11)	3 (21)	11 (79)	
III	18 (34)	6 (33)	12 (67)		43 (34)	7 (16)	36 (84)	
IVa	22 (42)	10 (45)	12 (55)		16 (13)	4 (25)	12 (75)	
IVb	9 (17)	2 (22)	7 (78)		23 (18)	5 (22)	18 (78)	
Missing	0 (0)	0 (0)	0 (0)		5 (4)	0 (0)	5 (100)	
<b>Histological differentiation</b>								
Well	17 (32)	5 (29)	12 (71)	.655	NA	NA	NA	NA
Moderate	11 (21)	5 (45)	6 (55)		NA	NA	NA	
Poor	25 (47)	8 (32)	17 (68)		NA	NA	NA	
<b>Histological subtype</b>								
Papillary (PTCC-I)	NA	NA	NA	NA	11 (9)	1 (9)	10 (91)	.153
Colonic (PTCC-II)	NA	NA	NA		79 (63)	13 (16)	66 (84)	
Solid (PTCC-III)	NA	NA	NA		9 (7)	4 (44)	5 (56)	
Mucinous	NA	NA	NA		27 (21)	4 (15)	23 (85)	
<b>Recurrence</b>								
No	9 (17)	2 (22)	7 (78)	.701	61 (48)	13 (21)	48 (79)	.481
Yes	44 (83)	16 (36)	28 (64)		60 (48)	9 (15)	51 (85)	
Missing	0 (0)	0 (0)	0 (0)		5 (4)	0 (0)	5 (100)	
<b>Metastasis</b>								
No	48 (91)	16 (33)	32 (67)	.999	109 (87)	21 (19)	88 (81)	.693
Yes	5 (9)	2 (22)	3 (78)		12 (9)	1 (8)	11 (92)	
Missing	0 (0)	0 (0)	0 (0)		5 (4)	0 (0)	5 (100)	
<b>Patient status</b>								
Alive	5 (10)	1 (20)	4 (80)	.348	51 (40)	10 (20)	41 (80)	.925
Died of disease	41 (77)	16 (39)	25 (61)		54 (43)	9 (17)	45 (83)	
Died of other causes	7 (13)	1 (14)	6 (86)		16 (13)	3 (19)	13 (81)	
Missing	0 (0)	0 (0)	0 (0)		5 (4)	0 (0)	5 (100)	

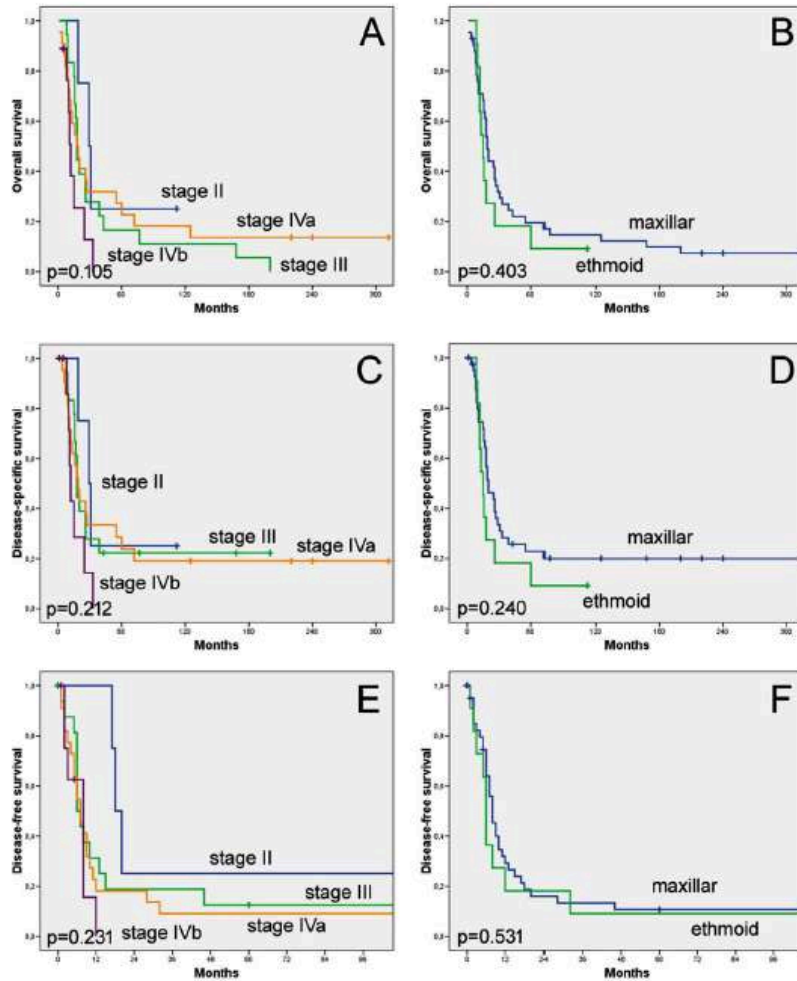
Abbreviations: ITAC, intestinal-type adenocarcinoma; NA, not applicable; PD-L1, programmed death ligand-1; PTCC, papillary tubular cylinder cell; SCC, squamous cell carcinoma.

### 3 | RESULTS

#### 3.1 | Follow-up

During the course of follow-up of the 53 patients with sinonasal SCC, 44 developed local recurrences (83%), 5 of whom also developed distant metastases (9%). At the time of the current report, a total of 9 patients remained disease free

(17%; Table 1). The overall survival, disease-specific survival, and disease-free survival in relation to disease stage and localization is presented in Figure 1. The main causes of death were local recurrences and distant metastases. Seven patients died during the postoperative period or because of intercurrent causes. Survival was not significantly related to clinical variables as disease stage, histological grade, or localization.



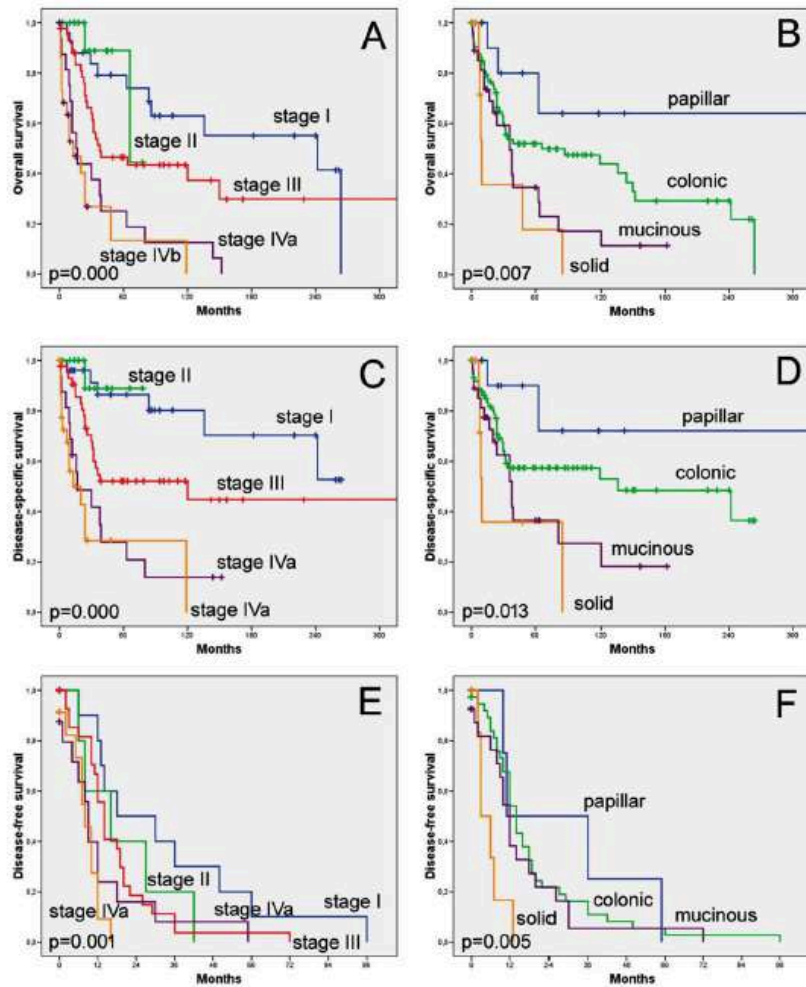
**FIGURE 1** Kaplan-Meier survival analysis of 53 patients with sinonasal squamous cell carcinoma. Overall survival according to disease stage A, and tumor localization B. Disease-specific survival according to disease stage C, and tumor localization D. Disease-free survival according to disease stage E, and tumor localization F [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

Follow-up data was available for 121 of the 126 patients with ITAC. Sixty patients developed local recurrence (48%), 12 patients developed distant metastases (9%; Table 1), and 54 patients (43%) remained disease free. The overall survival, disease-specific survival, and disease-free survival rates in relation to disease stage and histological subtype are given in Figure 2. The main cause of death was local recurrence and intracranial invasion. Survival was significantly related to disease stage (log-rank 40.879;  $P = .001$ ), to

intracranial invasion (log-rank 27.037;  $P = .001$ ), and to histological subtype (log-rank 12.206;  $P = .007$ ) but not to the type of surgery (log-rank 0.198;  $P = .656$ ).

### 3.2 | Programmed death ligand-1 and correlation with clinicopathological data

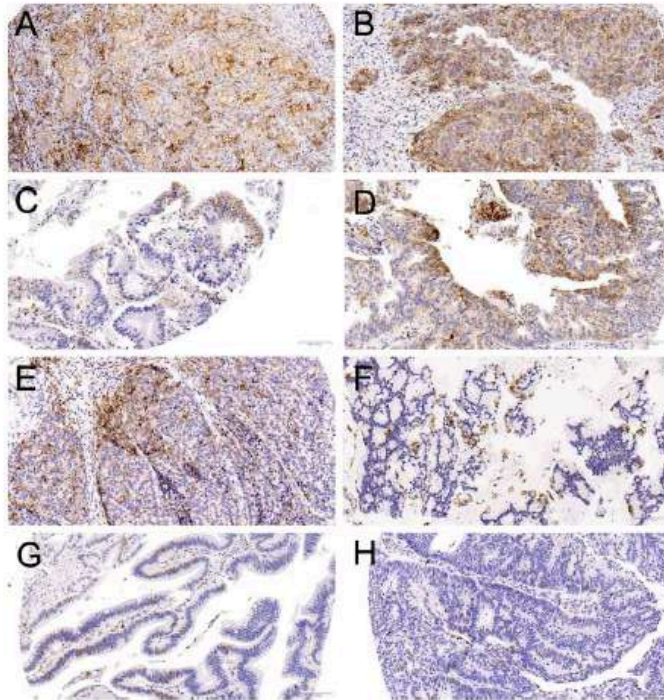
Membranous PD-L1 staining in > 5% of tumor cells was observed in 34% cases (18/53) of sinonasal SCC and in 17%



**FIGURE 2** Kaplan–Meier survival analysis of 121 patients with intestinal-type adenocarcinoma. Overall survival according to disease stage A, and histological subtype B. Disease-specific survival according to disease stage C, and histological subtype D. Disease-free survival according to disease stage E, and histological subtype F [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

cases (22/126) of ITAC (see Figure 3). Expression in > 50% of tumor cells occurred in 78% cases (14/18) of sinonasal SCC and in 23% cases (5/22) of ITAC with PD-L1 positivity. The staining pattern was diffuse in sinonasal SCC, whereas ITAC more frequently demonstrated focal expression. Nuclear expression of PD-L1 was observed in 11 of 179 tumors, all of which were papillary or colonic-type ITAC (see Figure 3). In neither sinonasal SCC nor ITAC, positive PD-L1 staining correlated with clinicopathological

parameters, including localization, histological grade, disease stage, or the development of recurrences or metastases (Table 1). Solid-type ITAC showed a significantly ( $P = .049$ ) higher PD-L1 positivity than papillary, colonic, and mucinous subtypes: 44% (4/9) versus 15% (18/117). In addition, the patients with ITACs with exposure to wood dust had less PD-L1 positivity than those without, 16% (17/106) versus 33% (5/15); however, this difference was not statistically significant.



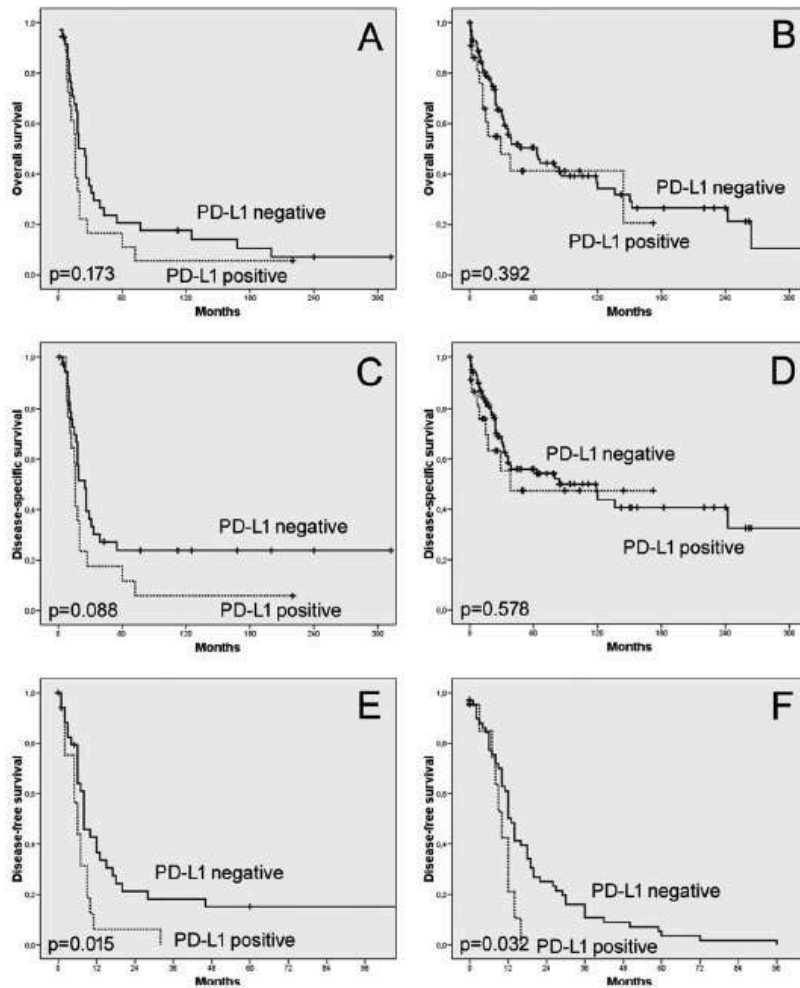
**FIGURE 3** Representative membranous immunostaining of programmed death ligand-1 (PD-L1) in a well-differentiated sinonasal squamous cell carcinoma (SCC) A, a poorly differentiated sinonasal SCC B, a papillary-type intestinal-type adenocarcinoma (ITAC) C, a colonic-type ITAC D, a solid-type ITAC E, and a mucinous-type ITAC F. Representative nuclear immunostaining of PD-L1 in a papillary-type ITAC G, and a colonic-type ITAC H. Original magnification all images: 15× [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

The PD-L1 staining in > 5% of tumor-infiltrating immune cells were observed in 45% cases (24/53) of sinonasal SCC and in 33% cases (41/126) of ITAC. In both tumors, this was significantly correlated ( $P = .001$ ) with PD-L1 expression on the tumor cells. The presence of PD-L1-positive immune cells showed no correlation to clinicopathological parameters, disease stage, localization, histological grade, or the development of recurrences or metastases (Table 1). Mucinous-type ITAC showed a significantly ( $P = .010$ ) lower PD-L1 positivity on immune cells than papillary, colonic, and solid subtypes: 11% (3/27) versus 38% (38/99).

### 3.3 | Programmed death ligand-1 and correlation with follow-up data

Neither sinonasal SCC nor ITAC demonstrated a significant difference in overall or disease-specific survival according to

PD-L1 positivity on the tumors (see Figure 4) or infiltrating immune cells. However, disease-free survival was significantly worse in cases with PD-L1 staining on the tumor cells (see Figure 4). The 1-year disease-free survival was 43% in PD-L1-negative cases versus 6% in PD-L1-positive sinonasal SCC cases, and 61% in PD-L1-negative cases versus 42% in PD-L1-positive ITAC cases (log-rank 5.872;  $P = .015$  for sinonasal SCC and log-rank 4.592;  $P = .032$  for ITAC; see Figure 4). Using multivariate analysis of disease-free survival in relation to PD-L1 status and radiotherapy, we found that PD-L1 maintained its significance in sinonasal SCC ( $P = .014$ ) and showed a strong tendency in ITAC ( $P = .052$ ). Multivariate Cox regression analysis of PD-L1 status, disease stage, and localization in sinonasal SCC showed that PD-L1 did not remain statistically significant with disease-free survival, although the tendency is still there. In ITAC, multivariate analysis of PD-L1 status, disease stage, and histological subtype showed that only stage maintained its statistical significance with survival (Table 2).



**FIGURE 4** Kaplan-Meier survival analysis. Overall survival according to programmed death ligand-1 (PD-L1) immunostaining of 53 patients with sinonasal squamous cell carcinoma (SCC) A, and 121 patients with intestinal-type adenocarcinoma (ITAC) B. Disease-specific survival according to PD-L1 immunostaining of 53 patients with sinonasal SCC C, and 121 patients with ITAC D. Disease-free survival according to PD-L1 immunostaining of 53 patients with sinonasal SCC E, and 121 patients with ITAC F

#### 4 | DISCUSSION

Patients with sinonasal cancer have a poor prognosis, especially in recurrent stages, and it is a disease with very limited treatment options. In this study, the expression of PD-L1 as a marker for immunotherapy was evaluated in 179 cases of sinonasal tumors. In addition, we investigated its possible role as a prognostic factor. Results showed that 34% cases of

sinonasal SCC and 17% cases of ITAC expressing membranous PD-L1 in >5% of tumor cells. Expression in >50% of tumor cells was frequent in sinonasal SCC (14/53; 26%) in contrast to ITAC (4/126; 3%).

To the best of our knowledge, this is the first report on PD-L1 concerning sinonasal cancer, therefore, there are no other data for comparison. However, tumors with similar histology, such as HNSCC and NSCLC have been shown to

**TABLE 2** Multivariate Cox regression survival analysis of 53 patients with sinonasal squamous cell carcinoma according to disease stage, localization, and programmed death ligand-1 status, and of 126 patients with intestinal-type adenocarcinoma according to disease stage, histological subtype, and programmed death ligand-1 status

	Overall survival		Disease-specific survival		Disease-free survival	
	Hazard ratio (95% CI)	P value	Hazard ratio (95% CI)	P value	Hazard ratio (95% CI)	P value
<b>Sinonasal SCC</b>						
Stage	1.276 (0.870-1.872)	.212	1.318 (0.875-1.984)	.186	1.357 (0.923-1.994)	.120
Localization	1.329 (0.651-2.712)	.435	1.478 (0.716-3.048)	.291	1.127 (0.546-2.327)	.746
PD-L1	1.355 (0.739-2.486)	.326	1.513 (0.798-2.872)	.205	1.834 (0.955-3.521)	.068
<b>ITAC</b>						
Stage	1.683 (1.370-2.068)	.001	1.837 (1.447-2.332)	.001	1.458 (1.169-1.817)	.001
Histological subtype	1.271 (0.998-1.620)	.052	1.276 (0.970-1.677)	.081	1.107 (0.876-1.399)	.394
PD-L1	1.135 (0.606-2.129)	.692	1.039 (0.505-2.136)	.918	1.706 (0.831-3.505)	.146

Abbreviations: CI, confidence interval; ITAC, intestinal-type adenocarcinoma; PD-L1, programmed death ligand-1; SCC, squamous cell carcinoma.

express PD-L1 in the same range of frequency. In HNSCC, the incidence varies between 19% and 45%, whereas HPV-positive tumors seem to have higher PD-L1 positivity.<sup>16-19</sup> In NSCLC, including both SCC and adenocarcinoma, frequencies of 14%-50% have been reported, with SCC generally showing higher positivity.<sup>20-23</sup> Among cases of adenocarcinoma-type NSCLC, those with solid histology showed the highest PD-L1 positivity, which is in agreement with the findings in ITAC in this article.<sup>20</sup> A limitation in our study may be that only 1 pathologist (B.V.) performed the ITAC subtyping, however, we are confident in the evaluation. The variability between the studies may be explained by geographic, technical, (sampling, choice of antibody, flow cytometry, and quantitative polymerase chain reaction), and interpretation (positivity on cell membrane/cytoplasm, cutoff points) differences.

A surprising result was the finding of nuclear expression of PD-L1 exclusively observed in papillary/colonic-type ITAC, either as the sole type of positivity (in 7 of 11 cases) or in combination with membranous staining (in 4 of 11 cases; see Figure 3). Nuclear PD-L1 has been reported in circulating prostate and colorectal adenocarcinoma cells.<sup>24</sup> In addition, nuclear expression of B7-H3, a protein of the same family as PD-L1, has been detected by immunohistochemistry in 30% of 277 cases of colorectal adenocarcinomas.<sup>25</sup> In both studies, nuclear staining was associated with poor prognosis. Being a transmembrane protein, it is not clear what could be the biological role of nuclear trafficking of PD-L1, although it has been described for epidermal growth factor receptor and other membrane proteins.<sup>26</sup>

By expressing PD-L1, tumor cells create an immunosuppressive microenvironment and so may avoid cytotoxicity by activated T cells. This may explain the relation to poor prognosis demonstrated in most reports. In this study, both sinonasal SCC and ITAC with >5% PD-L1 expression had a

significantly worse disease-free survival (see Figure 4), although, in multivariate analysis with clinicopathological parameters, it lost statistical significance (Table 2). We found no significant correlation with overall or disease-specific survival. Worse survival in relation to PD-L1 expression has been found in HNSCC, including oral, laryngeal, pharyngeal, oropharyngeal, and nasopharyngeal subsites,<sup>17-19,27</sup> as well as in SCC and adenocarcinoma NSCLC.<sup>20,21,28</sup> On the other hand, some studies reported PD-L1 to have no prognostic value in NSCLC,<sup>23</sup> or to be associated with better clinical outcome in HNSCC<sup>29,30</sup> or NSCLC.<sup>31</sup>

Although this is still subject to further investigation, PD-L1 protein expression on tumor cells is a means to predict clinical efficacy of immunotherapy with specific monoclonal antibodies that target the PD-1/PD-L1 immune checkpoint pathway and enhance the antitumor activity of the immune system. Indeed, most clinical trials on HNSCC and NSCLC have shown a stronger response to inhibitors of PD-1 (pembrolizumab and nivolumab) and PD-L1 (atezolizumab and durvalumab) in patients positive for PD-L1 expression,<sup>10,11,13,32</sup> although there are also studies that reported no relation to PD-L1 expression.<sup>9,12,14</sup> The PD-L1 protein expression alone may not be sufficient to predict responsiveness to immunotherapy. It has been shown that tumors with a high mutational load and exposure to mutagenic compounds respond better, whereas tumors with B-type Raf or Janus kinase 1/2 mutations or loss of phosphatase and tensin homolog expression respond worse to immune blockade therapy.<sup>33</sup> Recently, Ayers et al<sup>34</sup> proposed an assay based on the expression profile of 6 or 18 genes, including interferon-gamma as a clinical predictor of response. Finally, evaluation of the density of CD8T cell infiltrate as well as the proximity of PD-1 expressing immune cells to PD-L1 expressing tumor cells can enhance the predictive value of PD-L1 staining alone.<sup>35</sup>

In August and October 2016, the FDA approved the use of pembrolizumab and nivolumab for recurrent or metastatic HNSCC, based on a phase Ib and phase III clinical trial, respectively.<sup>9,10</sup> Chow et al<sup>10</sup> reported a 6-month progression-free survival of 23% in 132 patients treated with pembrolizumab. The PD-L1-positive cases (defined as >1%, either on the tumor cell only or on the tumor and immune cells) showed a significant better response, 22% versus 4% in PD-L1-negative patients. Moreover, the response was more pronounced in HPV-associated cases (assessed by p16 immunohistochemistry). Ferris et al<sup>9</sup> compared patients treated with nivolumab to standard single-agent therapy. The 6-month progression-free survival rates were 20% and 10%, respectively. No relation was found between the response and PD-L1 or HPV (assessed by p16 immunohistochemistry) status. Importantly, both studies demonstrated that immunotherapy was well tolerated.

In conclusion, a number of clinical trials with different immunotherapeutic agents are ongoing, in patients with HNSCC whose disease has progressed during or after chemotherapy, but also in a first-line setting.<sup>36,37</sup> Pembrolizumab and nivolumab have already received FDA approval for clinical application in recurrent or metastatic HNSCC and may also be considered for treatment of recurrent sinonasal SCC. Immunotherapy may also be effective in ITAC, as has been shown in lung adenocarcinoma. Patients with sinonasal SCC or ITAC have very limited treatment options available, especially those with recurrent disease (in the present study, 83% and 56% of cases, respectively). Therefore, although PD-L1 positivity does not seem to have prognostic value, a proportion of cases showed PD-L1 expression and might benefit from immunotherapy.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the technicians Laura Suárez Fernández and Aitana Vallina for their work on creating and processing the tissue microarrays.

#### ORCID

Mario A. Hermesen PhD  <http://orcid.org/0000-0002-5959-6289>

#### REFERENCES

- [1] Llorente JL, López F, Suárez C, Hermesen MA. Sinonasal carcinoma: clinical, pathological, genetic and therapeutic advances. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014;11:460-472.
- [2] Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, eds. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. 4th ed. Lyon, France, IARC Press, 2017.
- [3] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Arsenic, metals, fibres, and dusts. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 2012;100(Pt C):11-465.
- [4] Doescher J, Piontek G, Wirth M, et al. Epstein-Barr virus infection is strictly associated with the metastatic spread of sinonasal squamous-cell carcinomas. *Oral Oncol*. 2015;51:929-934.
- [5] Bishop JA, Guo TW, Smith DF, et al. Human papillomavirus-related carcinomas of the sinonasal tract. *Am J Surg Pathol*. 2013;37:185-192.
- [6] Tumer JH, Reh DD. Incidence and survival in patients with sinonasal cancer: a historical analysis of population-based data. *Head Neck*. 2012;34:877-885.
- [7] Youkden DR, Cramb SM, Peters S, et al. International comparisons of the incidence and mortality of sinonasal cancer. *Cancer Epidemiol*. 2013;37:770-779.
- [8] Lund VJ, Stammberger H, Nicolai P, et al. European position paper on endoscopic management of tumors of the nose, paranasal sinuses and skull base. *Rhinol Suppl*. 2010;22:1-143.
- [9] Ferris RL, Blumenschein G, Fayette J, et al. Nivolumab for recurrent squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2016;375:1856-1867.
- [10] Chow LQM, Haddad R, Gupta S, et al. Antitumor activity of pembrolizumab in biomarker-unselected patients with recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: results from the phase Ib KEYNOTE-012 Expansion Cohort. *J Clin Oncol*. 2016;34:3838-3845.
- [11] Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015;373:1627-1639.
- [12] Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015;373:123-135.
- [13] Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*. 2014;515:563-567.
- [14] Antonia S, Goldberg SB, Balmanoukian A, et al. Safety and antitumor activity of durvalumab plus tremelimumab in non-small cell lung cancer: a multicentre, phase Ib study. *Lancet Oncol*. 2016;17:299-308.
- [15] Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TNM classification of malignant tumors*. 7th ed. New York, NY, Wiley-Blackwell, 2009.
- [16] Kim HR, Ha SJ, Hong MH, et al. PD-L1 expression on immune cells, but not on tumor cells, is a favorable prognostic factor for head and neck cancer patients. *Sci Rep*. 2016;6:36956.
- [17] Straub M, Drecoll E, Pfarr N, et al. CD274/PD-L1 gene amplification and PD-L1 protein expression are common events in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oncotarget*. 2016;7:12024-12034.
- [18] Lin YM, Sung WW, Hsieh MJ, et al. High PD-L1 expression correlates with metastatic and poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2015;10:e0142656.
- [19] Kapanthiou G, Castello F, Giroult JB, et al. Prognostic impact of immune microenvironment in laryngeal and pharyngeal squamous cell carcinoma: immune cell subtypes, immuno-suppressive pathways and clinicopathologic characteristics. *Oncotarget*. 2017;8:19310-19322.
- [20] Parra ER, Behrens C, Rodriguez-Canales J, et al. Image analysis-based assessment of PD-L1 and tumor-associated

- immune cells density supports distinct intratumoral microenvironment groups in non-small cell lung carcinoma patients. *Clin Cancer Res.* 2016;22:6278-6289.
- [21] Azuma K, Ota K, Kawahara A, et al. Association of PD-L1 overexpression with activating EGFR mutations in surgically resected nonsmall-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2014;25:1935-1940.
- [22] Wu S, Shi X, Sun J, et al. The significance of programmed cell death ligand 1 expression in resected lung adenocarcinoma. *Oncotarget.* 2017;8:16421-16429.
- [23] Tsao MS, Le Teuff G, Shepherd FA, et al. PD-L1 protein expression assessed by immunohistochemistry is neither prognostic nor predictive of benefit from adjuvant chemotherapy in resected non-small cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2017;28:882-889.
- [24] Satelli A, Bath IS, Brownlee Z, et al. Potential role of nuclear PD-L1 expression in cell-surface vimentin positive circulating tumor cells as a prognostic marker in cancer patients. *Sci Rep.* 2016;6:28910.
- [25] Ingebrigtsen VA, Boye K, Nesland JM, Nesbakken A, Flatmark K, Fodstad Ø. B7-H3 expression in colorectal cancer: nuclear localization strongly predicts poor outcome in colon cancer. *Int J Cancer.* 2012;131:2528-2536.
- [26] Lee HH, Wang YN, Hung MC. Non-canonical signaling mode of the epidermal growth factor receptor family. *Am J Cancer Res.* 2015;5:2944-2958.
- [27] Hsu MC, Hsiao JR, Chang KC, et al. Increase of programmed death-1-expressing intratumoral CD8 T cells predicts a poor prognosis for nasopharyngeal carcinoma. *Mod Pathol.* 2010;23:1393-1403.
- [28] Mu CY, Huang JA, Chen Y, Chen C, Zhang XG. High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation. *Med Oncol.* 2010;28:682-688.
- [29] Ward MJ, Thirdborough SM, Mellows T, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes predict for outcome in HPV-positive oropharyngeal cancer. *Br J Cancer.* 2014;110:489-500.
- [30] Vassilakopoulou M, Avgeris M, Velcheti V, et al. Evaluation of PD-L1 expression and associated tumor-infiltrating lymphocytes in laryngeal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2016;22:704-713.
- [31] Velcheti V, Schalper KA, Carvajal DE, et al. Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. *Lab Invest.* 2014;94:107-116.
- [32] Fehrenbacher L, Spira A, Ballinger M, et al. Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *Lancet.* 2016;387:1837-1846.
- [33] Cogdill AP, Andrews MC, Wargo JA. Hallmarks of response to immune checkpoint blockade. *Br J Cancer.* 2017;117:1-7.
- [34] Ayers M, Luceford J, Nebozhyn M, et al. IFN- $\gamma$ -related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. *J Clin Invest.* 2017;127:2930-2940.
- [35] Tumeq PC, Harview CL, Yearley JH, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature.* 2014;515:568-571.
- [36] Economopoulou P, Agelaki S, Perisanidis C, Giotakis EI, Psyrri A. The promise of immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Oncol.* 2016;27:1675-1685.
- [37] Bauman JE, Cohen E, Ferris RL, et al. Immunotherapy of head and neck cancer: emerging clinical trials from a National Cancer Institute Head and Neck Cancer Steering Committee Planning Meeting. *Cancer.* 2017;123:1259-1271.

How to cite this article: Riobello C, Vivanco B, Reda S, et al. Programmed death ligand-1 expression as immunotherapeutic target in sinonasal cancer. *Head & Neck.* 2018;00:1–10. <https://doi.org/10.1002/hed.25067>



Article

# CD8<sup>+</sup> Tumour-Infiltrating Lymphocytes and Tumour Microenvironment Immune Types as Biomarkers for Immunotherapy in Sinonasal Intestinal-Type Adenocarcinoma

Rocío García-Marín <sup>1,†</sup>, Sara Reda <sup>2,†</sup>, Cristina Riobello <sup>1</sup>, Virginia N. Cabal <sup>1</sup>, Laura Suárez-Fernández <sup>1</sup>, Blanca Vivanco <sup>3</sup>, Fernando López <sup>2</sup>, José L. Llorente <sup>2</sup> and Mario A. Hermsen <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department Head and Neck Oncology, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias, 33011 Oviedo, Spain; rociogn220879@hotmail.com (R.G.-M.); cristinarisu15@gmail.com (C.R.); vircabal@hotmail.com (V.N.C.); laura\_quillo@hotmail.com (L.S.-F.)

<sup>2</sup> Department Otolaryngology, Hospital Universitario Central de Asturias, 33011 Oviedo, Spain; sara\_reda\_91@hotmail.com (S.R.); flopez\_1981@yahoo.es (F.L.); lorentependas@telefonica.net (J.L.L.)

<sup>3</sup> Department Pathology, Hospital Universitario Central de Asturias, 33011 Oviedo, Spain; vivancoblanca@gmail.com

\* Correspondence: mhermsen@hca.es or mariohermsen@gmail.com

† Contributed equally.

Received: 6 April 2020; Accepted: 26 April 2020; Published: 28 April 2020



**Abstract:** Background. Intestinal-type adenocarcinoma (ITAC) is a rare tumour occurring in the ethmoid sinus. Recent years have brought advances in endoscopic surgery and precision radiotherapy; however, five-year overall survival has not improved and remains at 35–80%, depending on tumour stage and histology. Therefore, there is a need for new therapeutic options. Methods. We evaluated CD8<sup>+</sup> tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) and tumour microenvironment immune type (TMIT, combining CD8<sup>+</sup> TILs and PD-L1) as predictive biomarkers for immunotherapy in a series of 133 ITAC. All results were correlated to clinical and follow-up data. Results. The presence of intratumoural CD8<sup>+</sup> TILs was low in 57% of cases and high in 8% of cases. Tumoural PD-L1 positivity was observed in 26% of cases. CD8<sup>+</sup> TILs and TMIT correlated with the histological subtype of ITAC and with better overall survival. The presence of stromal PD-L1-positive macrophages was related to intratumoural CD8<sup>+</sup> TILs. PD-L1 expression on tumour cells or macrophages did not show prognostic value. Conclusions. TMIT classification did not have additional prognostic value over CD8<sup>+</sup> TILs alone. The modest percentage of CD8<sup>high</sup>/PD-L1<sup>low</sup> cases indicates that ITAC is a lowly immunogenic tumour type. Nevertheless, a proportion of ITAC, especially the papillary and colonic subtypes, could benefit from therapy with immune checkpoint inhibitors.

**Keywords:** sinonasal cancer; intestinal-type adenocarcinoma; CD8<sup>+</sup> TILs; tumour microenvironment immune type; immunotherapy

## 1. Introduction

Intestinal-type adenocarcinoma (ITAC) is a rare tumour, with an approximate incidence of less than one case per 100,000 inhabitants annually, accounting for 10–20% of all tumours in the sinonasal area, although these proportions vary geographically [1–3]. ITAC is etiologically related to professional exposure to organic dust, mainly wood or leather [4–6]. Due to the lack of specific symptoms at early stages, patients are often diagnosed at advanced stages. ITAC can be classified into four subtypes, i.e., papillary, colonic, solid and mucinous, the latter two having a worse clinical behavior [7].

The main treatment modality is surgery with postoperative radiotherapy, and in some cases combined modalities including chemotherapy may be used. Surgical treatment has advanced due to the progressive application of transnasal endoscopic techniques for naso-ethmoidal malignancies [4,8–11]. However, patients with ITAC still face an unfavourable prognosis, with a five-year survival rate ranging from 35% for stage IV to 80% for stage I tumours [2,4,8–12]. Local recurrence often occurs within two years of follow-up and is the main contributor to sinonasal cancer mortality. Therefore, new treatment options for neoadjuvant, concomitant or adjuvant therapy are needed. Immunotherapy, especially immune checkpoint inhibitors, may be such an option.

Several monoclonal antibodies have been developed that interfere with signalling pathways used by tumours to evade the immune system. Programmed death-ligand 1 (PD-L1) is expressed on the cell surface of tumour cells, as well as B and T lymphocytes, macrophages, and dendritic cells. The interaction between PD-L1 on tumour cells and the programmed cell death protein 1 (PD-1) receptor on activated cytotoxic T cells inhibits the immune response mediated by interferon (IFN), reducing the cytotoxic activity of T cells, and protects from apoptosis [13]. The results of several clinical trials have led to the approval of anti-PD-1 agents, such as Pembrolizumab and Nivolumab, for a number of tumour types including head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) [14–16]. However, only a proportion of patients respond to the treatment, so there is a need to identify predictive biomarkers.

Most studies have concentrated on tumour PD-L1 expression and the presence of various tumour-infiltrating lymphocytes (TILs). In a previous study, our group reported 17% of tumours with PD-L1 expression in a series of 126 ITAC [17], indicating a subgroup of patients that may benefit from anti-PD-1 therapy. Although possibly a predictive marker for immunotherapy, PD-L1 positivity did not have prognostic value. We are not aware of published studies on ITAC similar to ours; however, there are reports on PD-L1- and CD8-positive TILs (CD8<sup>+</sup> TILs) in other sinonasal tumour types. Approximately 30–35% of sinonasal squamous cell carcinomas (SNSCC) expressed PD-L1 [17,18], while CD8<sup>+</sup> and CD4-FOXP3 TILs were detected in 50% of cases and correlated with better survival [18]. CD8<sup>+</sup> TILs were also related to better survival in olfactory neuroblastoma [19]. A classification based on both TILs and tumour PD-L1 expression, named tumour microenvironment immune type (TMIT), recognizes four immunotypes: type I (TIL<sup>high</sup>/PD-L1<sup>pos</sup>), type II (TIL<sup>low</sup>/PD-L1<sup>neg</sup>), type III (TIL<sup>low</sup>/PD-L1<sup>pos</sup>) and type IV (TIL<sup>high</sup>/PD-L1<sup>neg</sup>) [20]. Later, TILs evaluated in TMIT became specified as CD8<sup>+</sup> TILs; their correlation to features like high mutational burden and oncogenic viral infection supported the clinical relevance of this classification [21]. TMIT does not reflect the tumour microenvironment which includes many types of TILs, however, it may predict the response to immunotherapy on an individual basis, which is reported to be an important marker when selecting combined treatments for cancer [22–24].

The aim of this study was to evaluate the prevalence of CD8<sup>+</sup> TILs and TMIT in a large series of ITAC as possible predictors of response to immunotherapy. In addition, all results were correlated with clinico-pathological and follow-up data.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Patients and Samples

Samples from 133 previously untreated ITAC patients treated between 1978 and 2014 were collected from the biobank archives of our hospital. All patients had signed an informed consent for the collection, analysis and storage of their biological material, and the study was approved by the Institutional Ethics Committee of the Hospital Universitario Central de Asturias and by the Regional CEIC from Principado de Asturias (approval number 07/16 for project CICPFI6008HERM). The mean patient age was 66 years, and 98% (131/133) of patients were males. The distribution of disease stage according to the TNM system for tumour classification [25] was: 30 tumours in stage I, 17 in stage II, 45 in stage III, 16 in stage IVa and 25 in stage IVb. Thirteen cases were papillary, 80 were colonic, 10 were solid, and 30 were mucinous histological subtype [7]. A history of professional exposure to

wood dust was recorded for 118 of 133 (89%) patients. Seventy-six (57%) patients received radiotherapy after radical surgery. The median follow-up was 56 months (range 1–460). Details on the clinical features are presented in Table 1.

**Table 1.** Clinical characteristics according to CD8<sup>+</sup> tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) and tumour microenvironment immune type (TMIT) type.

Clinical Feature	All	CD8 <sup>+</sup> TILs			Significance	TMIT Type				Significance
		0%	1–10%	>10%		I	II	III	IV	
All	133	47	76	10		8	96	27	2	
Gender					0.467					0.854
Female	2 (2)	0 (0)	2 (3)	0 (0)		0 (0)	2 (2)	0 (0)	0 (0)	
Male	131 (98)	47 (100)	74 (97)	10 (100)		8 (100)	94 (98)	27 (100)	2 (100)	
Disease stage					0.696 a					0.776 a
I	30 (22)	12 (25)	18 (23)	0 (0)		0 (0)	22 (23)	8 (30)	0 (0)	
II	17 (13)	5 (11)	8 (11)	4 (40)		4 (50)	13 (14)	0 (0)	0 (0)	
III	45 (34)	16 (34)	25 (33)	4 (40)		2 (25)	31 (32)	10 (37)	2 (100)	
IV-a	16 (12)	8 (17)	6 (8)	2 (20)		2 (25)	10 (10)	4 (15)	0 (0)	
IV-b	25 (19)	6 (13)	19 (25)	0 (0)		0 (0)	20 (21)	5 (18)	0 (0)	
Histological type					0.007 b					0.188 b
Papillary	13 (10)	3 (6)	9 (12)	1 (10)		1 (13)	8 (8)	4 (15)	0 (0)	
Colonic	80 (60)	23 (49)	48 (63)	9 (90)		7 (87)	56 (59)	15 (55)	2 (100)	
Solid	10 (7)	3 (6)	7 (9)	0 (0)		0 (0)	6 (6)	4 (15)	0 (0)	
Mucinous	30 (23)	18 (39)	12 (16)	0 (0)		0 (0)	26 (27)	4 (15)	0 (0)	
Recurrence					0.165					0.079
No	70 (53)	20 (43)	43 (57)	7 (70)		6 (75)	44 (46)	19 (70)	1 (50)	
Yes	63 (47)	27 (57)	33 (43)	3 (30)		2 (25)	52 (54)	8 (30)	1 (50)	
Metastasis					0.249					0.389
No	120 (90)	40 (85)	70 (92)	10 (100)		8 (100)	84 (88)	26 (96)	2 (100)	
Yes	13 (10)	7 (15)	6 (8)	0 (0)		0 (0)	12 (12)	1 (4)	0 (0)	
Patient status					0.021 c					0.054 c
Alive	60 (45)	20 (43)	32 (42)	8 (80)		6 (75)	42 (44)	10 (37)	2 (100)	
Died of disease	53 (40)	19 (40)	34 (45)	0 (0)		0 (0)	42 (44)	11 (41)	0 (0)	
Died of other causes	20 (15)	8 (17)	10 (13)	2 (20)		2 (25)	12 (12)	6 (22)	0 (0)	

a: Chi<sup>2</sup> analysis comparing disease stages I, II, III with IVa, IVb; b: Chi<sup>2</sup> analysis comparing papillary-colonic with solid-mucinous intestinal-type adenocarcinoma (ITAC); c: Chi<sup>2</sup> analysis comparing patients alive with patients who died of the disease.

2.2. Immunohistochemistry

Tissue microarray (TMA) blocks were prepared from formalin-fixed, paraffin-embedded tumour tissues using the Beecher Tissue Microarrayer (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA). In total, 5 TMA blocks were constructed, containing three 1 mm cores from different areas of 133 ITAC tumours. Immunohistochemistry (IHC) was performed on an automatic staining workstation (Dako Autostainer Plus; DakoCytomation, Glostrup, Denmark). Antibodies anti-PD-L1 clone E1L3N (1/100 monoclonal rabbit, Cell Signalling Technology, Cambridge UK), anti-CD8 clone C8/144B, IR623 (Prediluted monoclonal mouse, DAKO, Glostrup, Denmark), were applied using high-pH antigen retrieval for 20 min. The slides were evaluated in a double-blind manner by three observers. The staining was visualized by light microscopy.

CD8<sup>+</sup> TILs were scored as 0%, 1–10% and >10% of the cells present in the stromal or in the intratumoural compartment. Staining intensity was similar in all tumours. Staining for PD-L1 was considered positive when >5% of the tumour cells showed membranous and/or cytoplasmic staining. TMIT subtypes were defined by the combination of intratumoural CD8<sup>+</sup> TIL presence (CD8<sup>low</sup>, either 0% or 1–10%, and CD8<sup>high</sup>, >10%) and PD-L1-stained tumour cells (negative, <5% and positive, >5%). TMIT type I was defined as CD8<sup>high</sup>/PD-L1<sup>pos</sup>, type II as CD8<sup>low</sup>/PD-L1<sup>neg</sup>, type III as CD8<sup>low</sup>/PD-L1<sup>pos</sup> and type IV as CD8<sup>high</sup>/PD-L1<sup>neg</sup>. In the stromal compartment, we observed PD-L1-stained macrophages, which were scored as either absent or present.

2.3. Statistical Analysis

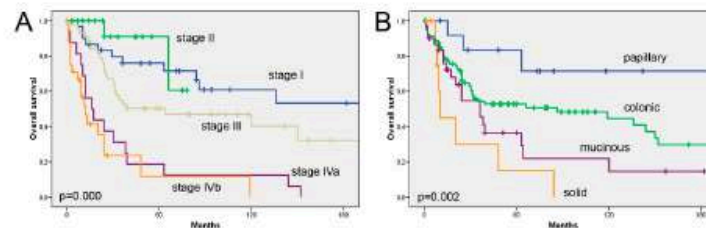
The Chi<sup>2</sup> test was used to test possible associations between CD8<sup>+</sup> TILs, PD-L1 expression, TMIT types and various clinicopathological factors. Kaplan–Meier curves were plotted to assess the relations

of CD8<sup>+</sup> TILs and TMITs to overall survival, using the log-rank test;  $p$ -values < 0.05 were considered to indicate statistical significance. Multivariate Cox regression analysis was performed for factors possibly related to survival. Statistical analysis was carried out with the use of SPSS Base, version 15.0 and SPSS Advanced models, version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) software.

### 3. Results

#### 3.1. Tumour Stage and Histological Subtype Are Related to Longer Survival

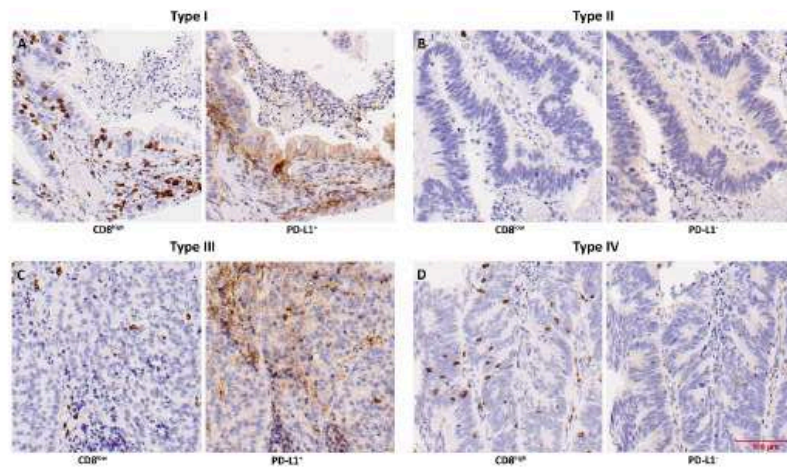
During the period of follow-up, 63 of 133 patients (48%) developed local recurrence, and 13 (10%) distant metastasis. Sixty of 133 patients (45%) remained alive, and the median disease-free time was 12 months (range 1–96 months). (Table 1). The overall five-year survival was 50%, the main causes of death being local recurrence and intracranial invasion; however, 20 patients died during the postoperative period or due to intercurrent causes. Overall survival (Figure 1) was significantly related to disease stage (log-rank 50.498;  $p = 0.000$ ) and histological subtype (log-rank 15.085;  $p = 0.002$ ).



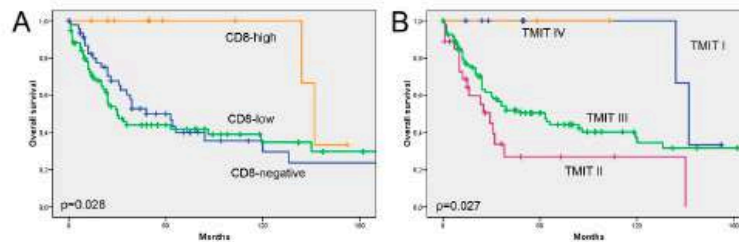
**Figure 1.** Overall survival according to tumour stage (A) and histological subtype (B).

#### 3.2. The Prognostic Value of CD8<sup>+</sup> TILs Is Independent of Tumour Stage and Histological Subtype

Stromal CD8<sup>+</sup> TILs were detected in the majority (126/133, 95%), and intratumoural CD8<sup>+</sup> TILs in 65% (86/133) of cases. All samples with intratumoural CD8<sup>+</sup> TILs also showed stromal CD8<sup>+</sup> TILs, reason why we focused our analyses on intratumoural CD8<sup>+</sup> TILs only. Complete absence of CD8<sup>+</sup> TILs was seen in 35% (47/133) of samples. The presence of intratumoural CD8<sup>+</sup> TILs was low in 57% of cases and high in 8% of cases (Figure 2). All (10/10) CD8<sup>high</sup> cases were histologically papillary and colonic, and also among the CD8<sup>low</sup> cases these IIAC subtypes were dominant (75%, 57/76). CD8<sup>high</sup> cases also appeared to be at a lower tumour stage and developed less recurrence or metastasis compared to CD8<sup>low</sup> and CD8<sup>neg</sup> tumours (Table 1). Kaplan–Meier analysis showed that CD8<sup>high</sup> cases had significantly better overall survival than CD8<sup>low</sup>/CD8<sup>neg</sup> cases ( $p = 0.028$ ) (Figure 3). Using multivariate Cox regression, we found that presence of CD8<sup>+</sup> TILs >10% was a positive prognostic factor independent of tumour stage, while histological subtype lost its prognostic value due to its interrelation with CD8<sup>+</sup> TILs (Table 2).



**Figure 2.** Immunohistochemical staining of CD8<sup>+</sup> TILs and PD-L1-expressing tumour cells, in the four TMIT types: (A) type I, (B) type II, (C) type III and (D) type IV.



**Figure 3.** Overall survival according to CD8<sup>+</sup> TILs (A) and TMIT (B).

**Table 2.** Multivariate Cox regression survival analysis of tumour stage, histological type and CD8<sup>+</sup> TILs.

	Log Rank	Univariate Significance	HR (95% CI)	Multivariate Significance
Tumour stage (stages I–III versus IVa, IVb)	50.498	<i>p</i> = 0.000	5.15 (3.06–8.70)	<i>p</i> = 0.000
Histological type (papillary-colonic versus solid-mucinous)	15.085	<i>p</i> = 0.002	1.21 (0.73–2.03)	<i>p</i> = 0.461
CD8 <sup>+</sup> TILs (negative/low versus high)	4.829	<i>p</i> = 0.028	0.16 (0.04–0.67)	<i>p</i> = 0.012

HR: Hazard ratio; CI: Confidence interval.

### 3.3. TMIT Types Display Different Clinical Outcomes

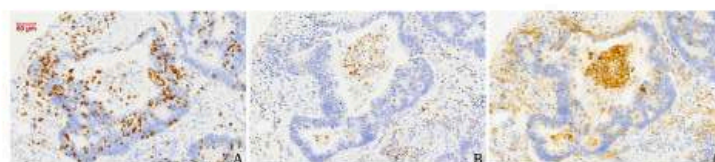
The most frequent TMIT was type II, observed in 72% (96/133) of cases, followed by type III in 20% (27/133), type I in 6% (8/133) and type IV in 1% (2/133) of cases. No significant correlation was found between TMIT and any of the clinicopathological characteristics (Table 1). Kaplan–Meier analysis showed that type I and IV cases (CD8<sup>high</sup> and either PD-L1<sup>pos</sup> or PD-L1<sup>neg</sup>) had much better overall survival (LR 9.186, *p* = 0.027). Analysis of only TMIT II and III cases (CD8<sup>low</sup> and either PD-L1<sup>pos</sup> or PD-L1<sup>neg</sup>) revealed a worse overall survival for those tumours expressing PD-L1, although not statistically significant (LR 3.593, *p* = 0.058) (Figure 3).

### 3.4. PD-L1-Expressing Tumour Cells and Macrophages Co-Occur with CD8<sup>+</sup> TILs

By analysing PD-L1 staining for the evaluation of TMIT, we found 26% (35/133) of cases with positivity in patches of tumour cells, and this was positively correlated ( $p = 0.000$ ) with intratumoural presence of CD8<sup>+</sup> TILs (Table 3). We also observed a notable PD-L1 positivity on macrophages, particularly in the stromal compartment (Figure 4), again correlated ( $p = 0.001$ ) with intratumoural presence of CD8<sup>+</sup> TILs (Table 3). Mucinous ITAC displayed a notable lower presence of PD-L1-positive macrophages compared to papillary, colonic and solid ITAC, corresponding, respectively, to 3% and 18–30%. We found no other correlations between the presence of PD-L1-positive macrophages and clinical and follow-up data (Table S1).

**Table 3.** Correlations between CD8<sup>+</sup> TILs and PD-L1-expressing tumour cells and macrophages.

	PD-L1 Expression Tumour Cells			PD-L1 Expression Macrophages		
	Negative	Positive	Significance	Negative	Positive	Significance
CD8 <sup>+</sup> TILs	0%	41	6	45	2	
	1–10%	55	21	60	16	$p = 0.001$
	>10%	2	8	5	5	



**Figure 4.** Immunohistochemical staining of CD8<sup>+</sup> TILs (A) and CD68 (B) and PD-L1- (C) expressing macrophages.

## 4. Discussion

Patients with ITAC in advanced stages generally have a poor prognosis, with limited therapeutic options. In this study, we analysed 133 ITAC for the presence of CD8<sup>+</sup> TILs and TMIT, combining the presence of CD8<sup>+</sup> TILs and the expression of PD-L1 on tumour cells as a possible predictive marker for treatment with PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors. In addition, we investigated their possible prognostic value. To the best of our knowledge, this is the first study analysing CD8<sup>+</sup> TILs and TMIT as indicators for immunotherapy in sinonasal ITAC.

We found 65% (86/133) of cases with intratumoural CD8<sup>+</sup> TILs, all of which also showing these lymphocytes in the stromal compartment. Kaplan–Meier survival analysis revealed no difference between cases with absence and low presence of CD8<sup>+</sup> TILs; however, all cases with a high presence of CD8<sup>+</sup> TILs showed significantly better overall survival ( $p = 0.028$ ), in multivariate analysis, independently of tumour stage and histological subtype. There are no studies on ITAC to compare our results with; however, in other sinonasal tumour types such as SNSCC and olfactory neuroblastoma (ONB), CD8<sup>+</sup> TILs have also been found to correlate to better survival [18,19]. The same has been reported in head and neck cancer [26,27], lung adenocarcinoma [28,29] and most other studied cancers. This confirms the protective, cytotoxic anti-tumour function of CD8<sup>+</sup> TILs.

Our evaluation of TMIT classification showed that type I and IV cases (CD8<sup>high</sup> and either PD-L1<sup>+</sup> or PD-L1<sup>-</sup>) were exclusively papillary and colonic and had much better overall survival. This indicates that the more important component of TMIT is an elevated presence of CD8<sup>+</sup> TILs, while tumoural PD-L1 expression does not have additional prognostic value. Nevertheless, among the CD8<sup>low</sup> cases, those expressing PD-L1 showed a tendency toward a worse survival (Figure 3). This confirms previous studies on PD-L1 in sinonasal tumours of different histotypes [17,18]. Also for lung adenocarcinomas, a tumour type similar to ITAC, most studies report a worse survival in PD-L1-positive cases [29,30].

which may be explained by PD-L1 immunosuppressive effect, which prevents cytotoxicity by activated CD8<sup>+</sup> TILs.

We observed PD-L1- and CD68-positive macrophages in the stromal compartment in 17% (23/133) of cases, which significantly co-occurred with CD8<sup>+</sup> TILs. Infiltration of macrophages in solid tumours has been associated with poor prognosis, promoting angiogenesis and invasion, and suppressing antitumour immunity [31]. These anti-inflammatory and pro-tumoural properties are mostly ascribed to M2 (CD68<sup>+</sup> and CD163<sup>+</sup>/CD204<sup>+</sup>) macrophages, whereas M1 macrophages (CD68<sup>+</sup> and HLA-DR<sup>+</sup>) would be pro-inflammatory [32,33]. However, this distinction is not generally accepted, and both M1 and M2 macrophage infiltrations have also been associated with favourable clinical outcome, perhaps through the recruitment of CD8<sup>+</sup> TILs [34–36]. In our study, the association of CD68-positive macrophages with CD8<sup>+</sup> TILs and a prolonged overall survival appears to support an antitumour role for both types of infiltrating lymphocytes.

Immune checkpoint inhibitors are an emerging and hopeful therapeutic option for a variety of tumours, and several clinical trials are showing good efficacy and tolerance to PD-1 checkpoint inhibitors in locally advanced HNSCC [14–16]. However, clinical responses are seen in only 13–22% of patients, underlining the need for predictive biomarkers. The presence of tumour-activated CD8<sup>+</sup> TILs is an essential requirement for the treatment with immune checkpoint inhibitors, while PD-L1 expression has been shown to be associated with improved outcomes upon immunotherapy [24]. These two factors are united in the TMIT classification, where type I (CD8<sup>high</sup>/PD-L1<sup>+</sup>) and, to a lesser extent, type IV (CD8<sup>high</sup>/PD-L1<sup>-</sup>) tumours are predicted to present the best response [22–24]. Our analysis revealed 8/133 (6%) of ITAC to be TMIT I, and 1.5% TMIT IV and indicated that ITAC is a lowly immunogenic cancer, with solid and mucinous subtypes even less immunogenic. This contrasts with known strong immunogenic tumours such as skin melanoma, renal cell and bladder cancer or head and neck and lung SCC, where TMIT I characterizes 40–50% of cases [21]. On the other hand, ITAC is comparable to adenocarcinomas of other organs such as lung, colon and stomach, with reports of 12–14%, 19% and 23% TMIT I, respectively [21,28,37,38].

A limitation of using TMIT as a predictor of response to therapy is the lack of consensus on the scoring and cut-off values of CD8<sup>+</sup> TILs and PD-L1. Indeed, the proportions of cases among the TMIT types vary considerably between studies on the same types of cancer. In addition, the exact localization of TILs, either inside the tumour or in the stroma, can be important. Moreover, the studied series of tumours may be heterogeneous, for example, squamous cell carcinoma and adenocarcinoma subtypes in non-small cell lung cancer. Similarly, ITAC includes different histological subtypes, and we found significant differences among them. Among the mucinous tumours, none were TMIT I or IV, and PD-L1-positive macrophages were virtually absent. This suggests that this subtype is even less immunogenic than papillary and colonic ITAC. Another possible limitation of our study is the large period of time over which the samples were collected. To address this, we compared cases treated before and after the year 2003, the point in time when endoscopic surgery was introduced in our hospital, and we found the same distribution of CD8<sup>+</sup> TILs and TMIT types and the same association with overall survival. Apart from CD8<sup>+</sup> TILs, the tumour microenvironment includes many more types of immune cells (myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells, dendritic cells, macrophages, natural killer cells, B cells) that may also be related to prognosis or play a role in the response to immune therapy [32]. However, from all studies, the strongest relation to clinical outcome and therapeutic response are found for CD8<sup>+</sup> TILs [23,39]. Finally, aside from CD8<sup>+</sup> TILs, PD-L1 expression and TMIT, there are other biomarkers that may predict the efficacy of anti-PD1 immunotherapy, such as tumour mutational burden, lactate dehydrogenase concentration in serum and pro-inflammatory interferon gene signature [24].

## 5. Conclusions

The main aim of this study was to evaluate possible predictors of response to immunotherapy. Our results demonstrate that intratumoural CD8<sup>+</sup> TILs are present in up to 65% of ITAC. Moreover,

a high number of CD8<sup>+</sup> TILs and TMIT types I and IV were associated with longer overall survival. TMIT classification did not have additional prognostic value over CD8<sup>+</sup> TILs alone. The modest percentage of TMIT type I CD8<sup>high</sup>/PD-L1<sup>pos</sup> cases indicate that ITAC is a lowly immunogenic tumour type. Nevertheless, a subgroup of patients may benefit from anti-PD-1 agents already approved in HNSCC.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2076-393X/8/2/202/s1>, Supplementary Table S1. Clinical characteristics according to PD-L1<sup>+</sup> macrophages

**Author Contributions:** Conceptualization, J.L.L. and M.A.H.; Methodology, R.G.-M., S.R., C.R., V.N.C., L.S.-F. and B.V.; Formal Analysis, R.G.-M. and S.R.; Investigation, R.G.-M., S.R., C.R., V.N.C., L.S.-F. and B.V.; Resources, S.R., F.L. and J.L.L.; Data Curation, C.R., V.N.C. and B.V.; Writing—Original Draft Preparation, R.G.-M. and S.R.; Writing—Review & Editing, all authors; Supervision, J.L.L. and M.A.H.; Funding Acquisition, M.A.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study was supported by grants CICPF16008HERM of Fundación AECC, IDI2018/155 Ayudas a Grupos PCTI Principado de Asturias, and CB16/12/00390 from the Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), Spain. Plan Nacional de I+D+I 2013-2016 of the Plan Estatal cofinanced by the FEDER Funding Program from the European Union.

**Acknowledgments:** The authors thank technicians Eva Allonca and Aitana Vallina for retrieving and processing the paraffin-embedded tissue samples for tissue microarrays.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Binazzi, A.; Corfiati, M.; Di Marzio, D.; Cacciatore, A.M.; Zajacová, J.; Mensi, C.; Galli, P.; Miligi, L.; Calisti, R.; Romeo, E.; et al. Sinonasal cancer in the Italian national surveillance system: Epidemiology, occupation, and public health implications. *Am. J. Ind. Med.* **2018**, *61*, 239–250. [[CrossRef](#)]
2. Youlden, D.R.; Cramb, S.M.; Peters, S.; Porceddu, S.V.; Møller, H.; Fritschi, L.; Baade, P.D. International comparisons of the incidence and mortality of sinonasal cancer. *Cancer Epidemiol.* **2013**, *37*, 770–779. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Choussy, O.; Ferron, C.; Védrine, P.O.; Toussaint, B.; Liétin, B.; Marandas, P.; Babin, E.; De Raucourt, D.; Rey, E.; Cosmidis, A.; et al. Adenocarcinoma of ethmoid: A GETTEC retrospective multicenter study of 418 cases. *Laryngoscope* **2008**, *118*, 437–443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Llorente, J.L.; López, E.; Suárez, C.; Hermesen, M.A. Sinonasal carcinoma: Clinical, pathological, genetic and therapeutic advances. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2014**, *11*, 460–472. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Arsenic, metals, fibres, and dusts. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* **2012**, *100*, 11–465.
6. Bonzini, M.; Battaglia, P.; Parassoni, D.; Casa, M.; Facchinetti, N.; Turri-Zanoni, M.; Borchini, R.; Castelnovo, P.; Ferrario, M.M. Prevalence of occupational hazards in patients with different types of epithelial sinonasal cancers. *Rhinology* **2013**, *51*, 31–36. [[CrossRef](#)]
7. El-Naggar, A.K.; Chan, J.; Grandis, J.; Takata, T.; Sliotweg, P. *WHO Classification of Tumors Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors*, 4th ed.; IARC Press: Lyon, France, 2017.
8. Nicolai, P.; Schreiber, A.; Bolzoni Villaret, A.; Lombardi, D.; Morassi, L.; Raffetti, E.; Donato, F.; Battaglia, P.; Turri-Zanoni, M.; Bignami, M.; et al. Intestinal type adenocarcinoma of the ethmoid: Outcomes of a treatment regimen based on endoscopic surgery with or without radiotherapy. *Head Neck* **2016**, *38* (Suppl. S1), E996–E1003. [[CrossRef](#)]
9. Cantu, G.; Solero, C.L.; Micali, R.; Mattana, F.; Riccio, S.; Colombo, S.; Pompilio, M.; Lombardo, G.; Formillo, P.; Quattrone, P. Anterior craniofacial resection for malignant paranasal tumors: A monoinstitutional experience of 366 cases. *Head Neck* **2012**, *34*, 78–87. [[CrossRef](#)]
10. Bhayari, M.K.; Yilmaz, T.; Sweeney, A.; Calzada, G.; Roberts, D.B.; Levine, N.B.; DeMonte, F.; Hanna, E.Y.; Kupferman, M.E. Sinonasal adenocarcinoma: A 16-year experience at a single institution. *Head Neck* **2014**, *36*, 1490–1496. [[CrossRef](#)]
11. Vergez, S.; du Mayne, M.D.; Coste, A.; Gallet, P.; Jankowski, R.; Dufour, X.; Righiri, C.; Rey, E.; Choussy, O.; Serrano, E.; et al. Multicenter study to assess endoscopic resection of 159 sinonasal adenocarcinomas. *Ann. Surg. Oncol.* **2014**, *21*, 1384–1390. [[CrossRef](#)]



12. Hermesen, M.A.; Riobello, C.; Garcia-Marín, R.; Cabal, V.N.; Suárez-Fernández, L.; López, E.; Llorente, J.L. Translational genomics of sinonasal cancers. *Semin. Cancer Biol.* **2020**, *61*, 101–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Pardoll, D.M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *12*, 252–264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Mehra, R.; Seiwert, T.Y.; Gupta, S.; Weiss, J.; Gluck, I.; Eder, J.P.; Burtness, B.; Tahara, M.; Keam, B.; Kang, H.; et al. Efficacy and safety of pembrolizumab in recurrent/metastatic head and neck squamous cell carcinoma: Pooled analyses after long-term follow-up in KEYNOTE-012. *Br. J. Cancer* **2018**, *119*, 153–159. [[CrossRef](#)]
15. Ferris, R.L.; Licitra, L.; Fayette, J.; Even, C.; Blumenschein, G., Jr.; Harrington, K.J.; Guigay, J.; Vokes, E.E.; Saba, N.E.; Haddad, R.; et al. Nivolumab in Patients with Recurrent or Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: Efficacy and Safety in CheckMate 141 by Prior Cetuximab Use. *Clin. Cancer Res.* **2019**, *25*, 5221–5230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Chow, L.Q.M.; Haddad, R.; Gupta, S.; Mahipal, A.; Mehra, R.; Tahara, M.; Berger, R.; Eder, J.P.; Burtness, B.; Lee, S.H.; et al. Antitumor activity of pembrolizumab in biomarker-unselected patients with recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: Results from the phase Ib KEYNOTE-012 Expansion Cohort. *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, 3838–3845. [[CrossRef](#)]
17. Riobello, C.; Vivanco, B.; Reda, S.; López-Hernández, A.; García-Inclán, C.; Potes-Ares, S.; Cabal, V.N.; López, E.; Llorente, J.L.; Hermesen, M.A. Programmed death ligand-1 expression as immunotherapeutic target in sinonasal cancer. *Head Neck* **2018**, *40*, 818–827. [[CrossRef](#)]
18. Quan, H.; Yan, L.; Wang, S.; Wang, S. Clinical relevance and significance of programmed death-ligand 1 expression, tumour-infiltrating lymphocytes, and p16 status in sinonasal squamous cell carcinoma. *Cancer Manag. Res.* **2019**, *11*, 4335–4345. [[CrossRef](#)]
19. Classe, M.; Burgess, A.; El Zein, S.; Wassef, M.; Herman, P.; Mortuaire, G.; Leroy, X.; Malouf, G.G.; Verillaud, B. Evaluating the prognostic potential of the Ki67 proliferation index and tumour-infiltrating lymphocytes in olfactory neuroblastoma. *Histopathology* **2019**, *75*, 853–864. [[CrossRef](#)]
20. Taube, J.M.; Anders, R.A.; Young, G.D.; Xu, H.; Sharma, R.; McMiller, T.L.; Chen, S.; Klein, A.P.; Pardoll, D.M.; Topalian, S.L.; et al. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*, 127ra137. [[CrossRef](#)]
21. Ock, C.Y.; Keam, B.; Kim, S.; Lee, J.S.; Kim, M.; Kim, T.M.; Jeon, Y.K.; Kim, D.W.; Chung, D.H.; Heo, D.S. Pan-Cancer Immunogenomic Perspective on the Tumour Microenvironment Based on PD-L1 and CD8 T-Cell Infiltration. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 2261–2270. [[CrossRef](#)]
22. Tumeq, P.C.; Harview, C.L.; Yearely, J.H.; Shintaku, I.P.; Taylor, E.J.; Robert, L.; Chmielowski, B.; Spasic, M.; Henry, G.; Ciobanu, V.; et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* **2014**, *515*, 568–571. [[CrossRef](#)]
23. Teng, M.W.; Ngiew, S.F.; Ribas, A.; Smyth, M.J. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration 16 and PD-L1. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 2139–2145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Blank, C.U.; Haanen, J.B.; Ribas, A.; Schumacher, T.N. Cancer Immunology: The “cancer immunogram”. *Science* **2016**, *352*, 658–660. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Sobin, L.H.; Gospodarowicz, M.K.; Wittekind, C.H. (Eds.) *International Union Against Cancer (UICC) TNM Classification of Malignant Tumors*, 7th ed.; Wiley-Blackwell: Chichester, West Sussex, UK, 2009.
26. Vassilakopoulou, M.; Avgeris, M.; Velcheti, V.; Kotoula, V.; Rampias, T.; Chatzopoulos, K.; Perisanidis, C.; Kontos, C.K.; Giotakis, A.I.; Scorilas, A.; et al. Evaluation of PD-L1 expression and associated tumor-infiltrating lymphocytes in laryngeal squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 704–713. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Ward, M.J.; Thirdborough, S.M.; Mellows, T.; Riley, C.; Harris, S.; Suchak, K.; Webb, A.; Hampton, C.; Patel, N.N.; Randall, C.J.; et al. Tumor-infiltrating lymphocytes predict for outcome in HPV-positive oropharyngeal cancer. *Br. J. Cancer* **2014**, *110*, 489–500. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Chen, L.; Cao, M.F.; Zhang, X.; Dang, W.Q.; Xiao, J.E.; Liu, Q.; Tan, Y.H.; Tan, Y.Y.; Xu, Y.Y.; Xu, S.L.; et al. The landscape of immune microenvironment in lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma based on PD-L1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes. *Cancer Med.* **2019**, *8*, 7207–7218. [[CrossRef](#)]
29. Wu, S.; Shi, X.; Sun, J.; Liu, Y.; Luo, Y.; Liang, Z.; Wang, J.; Zeng, X. The significance of programmed cell death ligand 1 expression in resected lung adenocarcinoma. *Oncotarget* **2017**, *8*, 16421–16429. [[CrossRef](#)]

30. Brody, R.; Zhang, Y.; Ballas, M.; Siddiqui, M.K.; Gupta, P.; Barker, C.; Midha, A.; Walker, J. PD-L1 expression in advanced NSCLC: Insights into risk stratification and treatment selection from a systematic literature review. *Lung Cancer* **2017**, *112*, 200–215. [CrossRef]
31. Cassetta, L.; Pollard, J.W. Targeting macrophages: Therapeutic approaches in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, *17*, 887–904. [CrossRef]
32. Barnes, T.A.; Amir, E. HYPE or HOPE: The prognostic value of infiltrating immune cells in 8 Cancer. *Br. J. Cancer* **2017**, *117*, 451–460. [CrossRef]
33. Becker, M.; Müller, C.B.; De Bastiani, M.A.; Klamt, F. Becker 2014 histol histopathol 2014: The prognostic impact of tumor-associated macrophages and intra-tumoral apoptosis in non-small cell lung cancer. *Histol. Histopathol.* **2014**, *29*, 21–31. [PubMed]
34. Rakaee, M.; Busund, L.R.; Jamaly, S.; Paulsen, E.E.; Richardsen, E.; Andersen, S.; Al-Saad, S.; Bremnes, R.M.; Dønnem, T.; Kilvaer, T.K. Prognostic Value of Macrophage Phenotypes in Resectable Non-Small Cell Lung Cancer Assessed by Multiplex Immunohistochemistry. *Neoplasia* **2019**, *21*, 282–293. [CrossRef] [PubMed]
35. Edin, S.; Wikberg, M.L.; Oldenburg, P.A.; Palmqvist, R. Macrophages Good Guys in Colorectal Cancer. *Oncoimmunology* **2013**, *2*, e23038. [CrossRef] [PubMed]
36. Biswas, S.K.; Mantovani, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: Cancer as a paradigm. *Nat. Immunol.* **2010**, *11*, 889–896. [CrossRef] [PubMed]
37. Noh, B.J.; Kwak, J.Y.; Eom, D.W. Immune classification for the PD-L1 expression and tumour-infiltrating lymphocytes in colorectal adenocarcinoma. *BMC Cancer* **2020**, *20*, 58. [CrossRef] [PubMed]
38. Koh, J.; Ock, C.Y.; Kim, J.W.; Nam, S.K.; Kwak, Y.; Yun, S.; Ahn, S.H.; Park, D.J.; Kim, H.H.; Kim, W.H.; et al. Clinicopathologic implications of immune classification by PD-L1 expression and CD8-positive tumor-infiltrating lymphocytes in stage II and III gastric cancer patients. *Oncotarget* **2017**, *8*, 26356–26367. [CrossRef]
39. Fridman, W.H.; Zitvogel, L.; Sautès-Fridman, C.; Kroemer, G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2017**, *14*, 717–734. [CrossRef]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

