



Universidad de Oviedo

Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias

Programa de Doctorado en Biomedicina y Oncología Molecular

**“Perfil inmune en carcinomas de células
escamosas de cabeza y cuello”**

TESIS DOCTORAL

Mario Sánchez Canteli

Marzo de 2022



Universidad de Oviedo

Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias

Programa de doctorado en Biomedicina y Oncología molecular

TESIS DOCTORAL

“Perfil inmune en carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello”

Autor	Directores	Tutor
Mario Sánchez Canteli	Dr. D. Juan Pablo Rodrigo Tapia Dra. Dña. Juana María García Pedrero	Dr. D. Cesar Antonio Álvarez Marcos



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Perfil inmune en carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello	Inglés: Head and neck squamous cell carcinoma immune profile
2.- Autor	
Nombre: Mario Sánchez Canteli	DNI/Pasaporte/NIE
Programa de Doctorado: Biomedicina y Oncología Molecular	
Órgano responsable: Centro Internacional de Postgrado	

RESUMEN (en español)

Los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (CCECC) son la neoplasia maligna más frecuente en la región de la cabeza y el cuello, y son el sexto cáncer más comúnmente diagnosticado. Cada vez se reconoce más la importancia del microambiente tumoral inmune en el pronóstico de los pacientes con CCECC.

Hipótesis: El microambiente tumoral inmune juega un papel relevante en la patogénesis y pronóstico del CCECC.

Objetivo: El objetivo general de este trabajo fue evaluar la expresión tumoral y estromal de PD-L1, PD-1 y LLT1, y la infiltración por TILs (linfocitos infiltrantes de tumores) CD8+ y Tregs/FOXP3+, y establecer una posible asociación con parámetros clinicopatológicos y su impacto en la supervivencia de los pacientes con CCECC.

Métodos: Se recogieron retrospectivamente muestras de 372 pacientes con CCECC negativos para VPH tratados quirúrgicamente en el Hospital Universitario Central de Asturias entre 1990 y 2010. Se construyeron microarrays de tejido para realizar análisis inmunohistoquímicos de la expresión de PD-L1, expresión de PD-1 en células inmunes, densidad de TILs CD8+ y FOXP3+ y expresión tumoral y estromal de LLT1. La expresión de PD-L1 y la densidad de TIL CD8+ se combinaron para establecer el tipo de microambiente tumoral.

Resultados: La expresión de PD-1 y PD-L1 se detectó de forma frecuente en CCECC. La densidad media de TILs CD8+ fue de 275 por mm² y de 54 por mm² en el caso de TILs FOXP3+. Los pacientes con tumores que mostraban una TPS (tumor proportion score) o CPS (combined proportion score) positiva de PD-L1 presentaron de forma concordante y significativa una mayor supervivencia específica de enfermedad (SEE) y una mayor supervivencia global (SG). Los pacientes con una alta densidad de infiltración por TILs CD8+ y TILs FOXP3+ también mostraron significativamente una mejor SEE y SG. El tipo de microambiente tumoral se correlacionó con la SEE, observándose la mejor SEE en los casos con tipo I (positividad para PD-L1 CPS y alta densidad de CD8+ TIL). En el análisis multivariante de Cox, la baja infiltración por TILs CD8+ se asoció de forma independiente con una peor SEE. LLT1 se analizó en los pacientes con carcinomas de orofaringe (CCEO; n=240). Los pacientes con expresión tumoral de LLT1 mostraron significativamente una peor SEE y peor SG. Los pacientes con tumores con una alta infiltración por TILs LLT1+ mostraron de forma significativa una mayor SEE y una mayor SG. El análisis multivariante de Cox reveló además que la expresión de LLT1 tumoral y la infiltración de TILs positivo para LLT1 eran factores pronósticos independientes para SEE y SG.

Conclusiones: Una alta infiltración por TILs, en particular por linfocitos T CD8+, y la expresión positiva de PD-L1 se asocia con mejores resultados de supervivencia. La combinación de la expresión positiva de PD-L1 y una alta infiltración por TILs CD8+ (microambiente inmune tipo I) confiere el pronóstico más favorable. La expresión tumoral de LLT1 se detecta frecuentemente en pacientes con CCEO HPV negativo y emerge como un predictor independiente de mal pronóstico. Una alta densidad de TILs LLT1



positivos se asocia independientemente con un mejor pronóstico.

RESUMEN (en Inglés)

Head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) are the most common malignancy in the head and neck region, and the sixth most commonly diagnosed cancer. The importance of the immune tumor microenvironment in the prognosis of patients with HNSCC is increasingly recognized.

Hypothesis: The immune tumor microenvironment plays a relevant role in the pathogenesis and prognosis of HNSCC.

Objective: The overall aim of this work was to evaluate the tumor and stromal expression of PD-L1, PD-1 and LLT1, and the infiltration by TILs (tumor infiltrating lymphocytes) CD8+ and Tregs/FOXP3+, and to establish their possible associations with clinicopathological parameters and the impact on patient survival.

Methods: Samples were retrospectively collected from 372 HPV-negative HNSCC surgically treated patients at the Hospital Universitario Central de Asturias between 1990 and 2010. Tissue microarrays were constructed to perform immunohistochemical analysis of tumor and stromal expression of PD-L1, PD-1 expression in immune cells, density of CD8+ and FOXP3+ TILs and tumor and stromal expression of LLT1. PD-L1 expression and TIL CD8+ density were combined to establish the type of tumor microenvironment.

Results: The expression of PD-1 and PD-L1 was frequently detected in HNSCC tissue specimens. The average density of CD8+ TILs was 275 per mm² and 54 per mm² in the case of FOXP3+ TILs. Patients with tumors that showed a positive PD-L1 TPS (tumor proportion score) or CPS (combined proportion score) concordantly and significantly exhibited a higher disease-specific survival (DSS) and overall survival (OS). Patients with a high density of infiltration by CD8+ TILs and FOXP3+ TILs also showed significantly better DSS and OS. The type of tumor microenvironment correlated with DSS, with the best DSS being observed in cases with type I (positivity for PD-L1 CPS and high density of CD8+ TIL). In Cox multivariate analysis, only low CD8+ TIL infiltration was independently associated with a worse DSS. LLT1 was analyzed in patients with carcinoma of the oropharynx (OPSCC; n=240). Patients harboring positive tumoral LLT1 showed significantly worse DSS and worse OS. Patients with tumors with a high infiltration of LLT1+ TILs showed significantly higher DSS and higher OS. Cox multivariate analysis further revealed that tumoral LLT1 expression and infiltration of LLT1-positive TILs were independent prognostic factors for DSS and OS.

Conclusions: A high infiltration by TILs, in particular by CD8+ T lymphocytes, and a positive expression of PD-L1 are associated with better survival results. The combination of both positive expression of PD-L1 and high infiltration by CD8+ TILs (type I immune microenvironment) gives the most favorable prognosis. Tumoral expression of LLT1 is frequently detected in patients with HPV-negative OPSCC and emerges as an independent predictor of poor prognosis. A high density of LLT1-positive TILs is independently associated with a better prognosis.

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA Y ONCOLOGÍA MOLECULAR

*“La medicina es una ciencia de la incertidumbre
y un arte de la probabilidad”*

William Osler

AGRADECIMIENTOS:

Todo camino tiene un final, al igual que toda carrera una meta o todo proyecto un cierre. Con este trabajo finalizo una etapa académica que comenzó hace ya varios años. En dicha etapa, he tenido la suerte y el privilegio de estar bajo la tutela de mis directores de Tesis Doctoral desde el año 2016, primero con la realización del Trabajo Fin de Grado, después con la elaboración del Trabajo Fin de Máster y ahora con la defensa de la presente Tesis Doctoral.

El Prof. Dr. Juan P. Rodrigo Tapia es un excelente ejemplo de cómo llevar a la máxima excelencia el trabajo, tanto en el quirófano como en el laboratorio, y brindar, a la vez, una oportunidad de formación al más alto nivel para alumnos y residentes. La Dra. Juana M. García Pedrero tiene unas capacidades de dedicación, organización y resolución incuestionables, que facilitan de sobremanera el trabajo en el laboratorio. No les puedo estar más agradecido por la oportunidad que me han brindado.

Quiero agradecer a mi madre, Belén, y a mi padre, Luis, por inculcarme la capacidad de trabajo y los valores necesarios para mi desarrollo personal y profesional y por guiarme para llegar a donde estoy. No sería quien soy sin ellos.

También me gustaría acordarme de todo el equipo de Otorrinolaringología del HUCA, dirigidos por el Prof. Dr. José Luis Llorente y de los tutores, el Prof. Dr. Fernando López y el Prof. César A. Álvarez, por introducir en el mundo de la investigación a todos los residentes que se forman en la familia de ORL del HUCA.

Por último, no puedo sino mencionar a mis amigos y familia, porque los buenos momentos hay que compartirlos y en los no tan buenos debemos apoyarnos. A Charlie, porque eres un ejemplo de cómo hay que luchar y ganar las batallas, y de que nunca hay que rendirse. Y a María, por acompañarme en la última recta de este trabajo y hacer que cada minuto a su lado sea un regalo que pienso, y quiero, aprovechar.

ÍNDICE:

ABREVIATURAS.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello.....	5
1.1.1. Epidemiología.....	5
1.1.2. Etiología.....	6
1.1.3. Evaluación y diagnóstico.....	9
1.1.4. Tratamiento.....	10
1.1.5. Pronóstico.....	12
1.2. Generalidades sobre la biología molecular en los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello.....	13
1.2.1. Modelos de carcinogénesis genómica.....	13
1.2.2. Alteraciones genéticas más frecuentes.....	14
1.2.3. Señas de identidad del cáncer.....	15
1.3. Inmunología tumoral en los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello.....	17
1.3.1. Generalidades.....	17
1.3.2. Elementos del microambiente tumoral.....	18
1.3.2.1. Células efectoras del sistema inmune innato.....	18
1.3.2.2. Células mieloides.....	19
1.3.2.3. Células efectoras del sistema inmune adaptativo.....	20
1.3.2.4. Otros componentes del estroma.....	22
1.3.3. Alteración de los puntos de control inmune.....	24
1.3.4. Supresión de la actividad citolítica de las células NK.....	28
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	31
2.1. Hipótesis.....	33
2.2. Objetivos.....	33
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	35
3.1. Sujetos a estudio.....	37
3.2. Recogida de las muestras y construcción de matrices tisulares (TMA).....	40
3.3. Análisis inmunohistoquímico.....	41
3.4. Detección de VPH.....	44
3.5. Análisis estadístico.....	45

4. RESULTADOS.....	47
4.1. Análisis de la expresión de PD-1 y PD-L1 e infiltración por TILs en muestras tisulares de CCECC.....	49
4.2. Análisis de la expresión de LLT1 en células tumorales y TILs estromales en muestras tisulares de CCEO.....	55
4.3. Correlaciones entre la expresión de PD-1, PD-L1, la infiltración por TILs y los parámetros clínico-patológicos en CCECC.....	58
4.4. Correlaciones de la expresión tumoral y estromal de LLT1 en TILs con parámetros clínico-patológicos en CCEO.....	60
4.5. Impacto de la expresión de PD-1 y PD-L1 e infiltración por TILs en la supervivencia del CCECC.....	62
4.6. Correlación de la expresión tumoral y estromal de LLT1 con la supervivencia en pacientes con CCEO.....	69
5. DISCUSIÓN.....	73
5.1. Relación de la expresión de PD-1 y PD-L1 con la supervivencia en CCECC.....	77
5.2. Relación de la infiltración por TILs con la supervivencia en CCECC.....	79
5.3. Relación de la combinación de la expresión de PD-L1 e infiltración por TILs con la supervivencia en CCECC.....	80
5.4. Relación de la expresión de LLT1 con la supervivencia en CCEO.....	84
6. CONCLUSIONES.....	87
7. BIBLIOGRAFÍA.....	91

ABREVIATURAS

- ADCC: Citotoxicidad dependiente de anticuerpo (*“Antibody-dependent cellular cytotoxicity”*)
- AJCC: *American Joint Committee on Cancer*
- APCs: Células presentadoras de antígenos (*“Antigen-presenting cell”*)
- CAF: Fibroblastos asociados al cáncer (*“Cancer-associated fibroblast”*)
- CCE: Carcinoma de células escamosas
- CCECC: Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello
- CCEH: Carcinoma de células escamosas de hipofaringe
- CCEL: Carcinoma de células escamosas laríngeo
- CCEO: Carcinoma de células escamosas de orofaringe
- CNA: Alteración en el número de copias (*“copy number alteration”*)
- CPS: Puntuación de la proporción combinada (*“Combined proportion score”*)
- DCs: Células dendríticas (*“Dendritic cells”*)
- ISH: Hibridación *in situ* (*“In situ hybridization”*)
- KLRs: Receptores de tipo lectina en las células *Natural Killer*.
- LLT1: *Lecitin Like Transcript 1*
- mDCs: Células dendríticas mieloides (*“Myeloid dendritic cells”*)
- MDSC: Células supresoras con origen mieloide (*“Myeloid-derived suppressor cell”*)
- NKC: Complejo de genes *Natural Killer*
- NK: *Natural Killer*
- PCR: Reacción de la cadena de polimerasa
- PD-1: Proteína de muerte celular programada 1 (*“Programmed Cell Death 1”*)

- PD-L1: Ligando de muerte celular programada 1 (*“Programmed Death-ligand 1”*)
- PET- ¹⁸F-FDG: Tomografía por emisión de positrones
- RM: Resonancia magnética
- R/M: Recurrente/metástasico
- SEE: Supervivencia específica de enfermedad
- SG: Supervivencia global
- TAAs: Antígenos asociados a tumor (*“Tumor-associated antigen”*)
- TAN: Neutrófilos asociados a tumor (*“Tumor-associated Neutrophil”*)
- TC: Tomografía computerizada
- TILs: Linfocitos infiltrantes de tumor (*“Tumor-infiltrating Lymphocytes”*)
- TMAs: Macrófagos asociados al tumor (*“Tumor-associated Macrophages”*)
- TMA: Matrices tisulares (*“tissue microarrays”*)
- TME: Microambiente tumoral (*“Tumor microenvironment”*)
- TPS: Puntuación de la proporción tumoral (*“Tumor proportion score”*)
- TORS: Cirugía robótica transoral (*“Transoral robotic surgery”*)
- VPH: Virus del Papiloma Humano
- VPH-KRT: Virus del papiloma humano con diferenciación queratinocítica y reducción del proceso oxidativo (*“HPV- keratinocyte differentiation and oxidative reduction process”*)
- VPH-IMU: Virus del papiloma humano con respuesta inmune y diferenciación celular mesenquimal (*“Immune response and mesenchymal cell differentiation”*)

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CABEZA Y CUELLO

Los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (CCECC) son neoplasias malignas de estirpe epitelial originadas en la mucosa de la vía aerodigestiva superior, que tradicionalmente incluyen la cavidad oral, orofaringe, hipofaringe y laringe. En el presente trabajo nos hemos centrado en los carcinomas de células escamosas (CCE) que afectan a la orofaringe, hipofaringe y laringe, por lo que al hablar de CCECC nos referiremos a estas tres localizaciones anatómicas.

1.1.1. EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer de cabeza y cuello comprende un heterogéneo grupo de tumores malignos de la vía aerodigestiva superior, que en conjunto constituye la séptima causa más común de cáncer¹. La incidencia varía de forma importante en función de la localización anatómica y región geográfica². Más de un 95% corresponden a carcinomas de células escamosas³. Los CCE de cavidad oral y de laringe son los más frecuentes, con una incidencia de 3,9 casos por 100.000 habitantes y de 2,3 casos por 100.000 habitantes respectivamente. De forma global, la incidencia del CCECC está asociada al consumo del tabaco y está disminuyendo en los países donde está descendiendo su consumo⁴. En contraste, la incidencia del CCECC debido a la infección por el virus del papiloma humano (VPH-positivo) ha aumentado drásticamente en los Estados Unidos desde la década de 1970, debido al incremento de carcinomas de células escamosas de orofaringe (CCEO) entre hombres blancos de mediana edad. La incidencia del CCEO VPH-positivo se ha incrementado de 0,8 casos por 100.000 habitantes entre 1988 y 1990 a 2,6 casos por 100.000 habitantes entre 2003 y 2004. En el mismo tiempo se ha producido un descenso del 50% en la incidencia del CCEO VPH-negativo, pasando de dos casos por 100.000 habitantes a un caso por 100.000 habitantes⁵. En Europa la prevalencia estimada del VPH

en los CCEO se ha incrementado del 35% antes del 2000 al 73% después del 2005⁶. En una revisión realizada por *Herrero y cols.*⁷ se ha estimado una incidencia de CCEO VPH-positivos en España e Italia alrededor del 13%. En el estudio de *Rodrigo y cols.*⁸, describen una menor incidencia de CCEO VPH-positivos en Asturias, en comparación al resto de España. Sin embargo, esta incidencia está en aumento pasando del 1,3% entre 1990 y 1999 a 6,1% entre el 2000 y 2009.

1.1.2. ETIOLOGÍA

Existen dos causas principales de los CCECC: consumo de tabaco y alcohol e infección por VPH. Históricamente la mayoría estaban causados por el tabaco y el alcohol, pero en las dos últimas décadas el VPH ha sido reconocido como agente causal, específicamente en los CCEO. Tanto los CCECC VPH-positivos como VPH-negativos tienen una mayor incidencia en los varones que en las mujeres, y la incidencia también se incrementa con la edad. Los pacientes con CCEO VPH-positivo suelen ser de raza blanca, tienen un estatus socioeconómico alto y son diagnosticados a una menor edad que los pacientes VPH-negativos. Además, el VPH influye en el pronóstico, de forma que los pacientes con CCEO VPH-positivo tienen un mejor pronóstico que los VPH-negativo⁹.

Factores de riesgo CCECC-VPH-negativo:

El tabaco es el agente causal de la mayoría de CCECC y el riesgo se incrementa de forma sinérgica con el alcohol¹⁰. Históricamente, aproximadamente el 90% de los pacientes con CCECC tenían historia de consumo de tabaco, con un riesgo aumentado de 4 a 5 veces de desarrollar carcinomas orales, orofaríngeos e hipofaríngeos y un riesgo aumentado 10 veces de desarrollar carcinomas laríngeos¹¹. Los efectos carcinógenos del tabaco son dosis dependiente en relación con la frecuencia, duración e intensidad del

hábito tabáquico. De forma paralela, el cese del consumo reduce el riesgo de desarrollar CCECC a medida que se incrementa el tiempo desde el cese del consumo¹².

El consumo del alcohol incrementa el riesgo de CCECC y se estima que del 1% al 4% de los casos pueden ser atribuibles al consumo de alcohol en pacientes no fumadores, e incrementa dos veces el riesgo de desarrollar CCECC en bebedores que nunca han fumado¹³. En particular, el consumo de alcohol incrementa en mayor medida el riesgo de carcinomas de células escamosas de hipofaringe (CCEH) en comparación con otras sublocalizaciones¹⁴. Sin embargo, el mayor impacto del alcohol se observa en la interacción con el tabaco, donde tiene un impacto multiplicativo en el riesgo de cáncer¹⁵.

Los CCECC son dos a cinco veces más comunes en hombres que en mujeres, aunque esta ratio varía en función de la región geográfica y se cree que es debida a un mayor consumo de tabaco y alcohol en varones². Los indicadores de un bajo nivel socioeconómico, como bajo nivel educacional y bajos ingresos económicos, están fuertemente asociados con un incremento del riesgo de CCECC de manera global¹⁶. Aunque el riesgo se atenúa tras ajustar el consumo de tabaco y alcohol, aproximadamente un tercio del riesgo asociado con un bajo nivel socioeconómico permanece desconocido. Incluso entre no fumadores y no bebedores, existe un mayor riesgo de desarrollar CCECC entre los pacientes con un bajo nivel socioeconómico¹⁷.

La supresión inmune secundaria a fármacos inmunosupresores y a la infección por VIH incrementa el riesgo de CCECC¹⁸.

Factores de riesgo CCECC VPH-positivo:

La infección por el VPH es una infección de transmisión sexual que suele cursar de forma asintomática, pero que puede producir diferentes tipos de lesiones benignas y malignas entre las que se encuentra el CCECC VPH-positivo, un subtipo que ocurre

primariamente en los tejidos linfoides de amígdalas linguales y palatinas¹⁹. La proporción de CCEO causados por el VPH está en incremento, con una prevalencia estimada del 80% en los Estados Unidos. En contraste, el VPH es detectado en menos del 20% del resto de localizaciones de los CCECC⁶. La infección oral por VPH es un precursor de CCEO-VPH positivo. Aunque existen más de cien tipos diferentes de VPH, solamente un pequeño grupo de estos son considerados de alto riesgo oncogénico²⁰. El subtipo VPH16 es responsable de más del 90% de los CCEO VPH-positivos²¹. Aunque la historia natural de la progresión de infección oral por VPH a CCEO VPH-positivo no está esclarecida, se sabe que la mayoría de las infecciones por VPH no progresan a cáncer. El tiempo desde la primera infección oral por VPH hasta el desarrollo de cáncer es desconocido, aunque se cree de más de una década²². Aunque el VPH es una causa clara de CCEO VPH-positivo, existen otros factores que influyen en los riesgos de exposición al VPH oral, como la persistencia de la infección por VPH una vez que es adquirida.

Los hábitos sexuales son una forma de exposición a la infección por VPH y están fuertemente asociados con el riesgo de CCEO VPH-positivo²³. En cambio, no se relaciona con el riesgo de CCECC VPH-negativo reflejando las distintas etiologías de estas dos enfermedades⁹. Aunque es difícil de identificar cuál de los hábitos sexuales confiere el mayor riesgo de infección por VPH oral, el sexo oral se cree que es la principal vía de transmisión.

Entre un tercio y dos tercios de los pacientes con CCEO VPH-positivo tienen historia de consumo de tabaco⁹. Este se asocia de forma significativa con un incremento de la prevalencia de VPH oral y la prevalencia de VPH16 se incrementa de forma dosis-dependiente con mayores prevalencias a mayor consumo de tabaco²⁴.

Los pacientes con CCEO VPH-positivos son predominantemente varones (85%-90%), de raza blanca (92%-95%) y con una edad media comprendida entre los 50 y 56 años⁵.

1.1.3. EVALUACIÓN Y DIAGNÓSTICO

La exploración endoscópica, la palpación cervical, la tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética (RM) son usadas de rutina para determinar la extensión inicial y estadio. La tomografía por emisión de positrones con ¹⁸F-Fluorodesoxiglucosa (PET-¹⁸F-FDG) ha incrementado la sensibilidad para detectar pequeños tumores y afectación ganglionar no palpable en la exploración o visualización directa²⁵.

El diagnóstico se establece mediante el análisis histológico. Con la identificación de la infección por VPH de alto riesgo, principalmente el subtipo VPH16, como factor de riesgo para el desarrollo de CCEO y su implicación pronóstica, existe un creciente interés en clasificar al CCECC como VPH positivo y negativo. Esta distinción se debe a la diferente biología molecular, mutaciones, predictores de respuesta al tratamiento y pronóstico entre estos dos subtipos²⁶. Dado que el papel del VPH en otras localizaciones diferentes a la orofaringe y su valor pronóstico continúan en debate, esta distinción no se suele aplicar a las otras localizaciones.

Existe un diferente fenotipo biológico y molecular entre el CCEO VPH-positivo y el CCEO VPH-negativo²⁷. El análisis inmunohistoquímico de p16-INK4A en las muestras tumorales se emplea como test inicial de elección y como biomarcador subrogado de la infección por VPH de alto riesgo²⁸, seguido por la detección del ADN del VPH mediante hibridación *in situ* (ISH) o reacción en cadena de la polimerasa (PCR)²⁹. A diferencia del CCEO VPH-positivo, el CCECC causado por el tabaco y el

alcohol está más asociado con mutaciones en p53 y otros genes supresores de tumores, haciéndolos menos sensibles al tratamiento con quimioterapia y radioterapia²⁸.

En la 8ª Edición del *Manual de Estadificación del Cáncer de la American Joint Committee on Cancer (AJCC)* y de la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC), publicada en 2017, se realizaron cambios en la estadificación de los CCECC. Algunos de los cambios incluyen la subclasificación en función del estatus VPH del CCEO, la inclusión de la extensión extranodal (ENE) en los CCECC VPH-negativos, la inclusión de la profundidad de invasión (DOI) en los carcinomas de células escamosas de la cavidad oral y cambios en la definición de los tumores con primario de origen desconocido³⁰.

1.1.4. TRATAMIENTO

La cirugía, radioterapia y quimioterapia y las diversas combinaciones de tratamiento son empleadas en el manejo del CCECC en función del estadio TNM y localización del tumor primario. La enfermedad en un estadio inicial (I y II) es la forma de presentación en un 40% de los pacientes y se trata con una sola modalidad de tratamiento: cirugía o radioterapia. Para la mayoría de los pacientes con una enfermedad en un estadio avanzado (III y IVA/B) resecable, que representan un 60% de los casos, el tratamiento está basado en radioterapia combinada con quimioterapia basada en platinos, con o sin quimioterapia de inducción o cirugía más radioterapia/quimiorradioterapia³¹. La enfermedad metastásica se trata mediante quimioterapia en combinación, monoterapia, inmunoterapia o tratamiento de soporte en función de la situación clínica.

El tratamiento de la recurrencia local o regional depende del sitio de la recurrencia y las terapias previas y puede variar desde cirugía de rescate a radioterapia con quimioterapia, solo quimioterapia^{26,31} o inmunoterapia³².

La cirugía está indicada en tumores resecables en los que se puedan lograr bordes quirúrgicos libres de tumor. La cirugía clásica abierta o los procedimientos mínimamente invasivos como la cirugía transoral robótica (TORS) o cirugía transoral láser (TLM) se emplean en función de las características del tumor y sitio anatómico. En el momento actual, se plantea la TORS como una alternativa a la quimiorradioterapia como estrategia preservadora de función en casos avanzados, en un intento de reducir la toxicidad de la quimiorradioterapia. En manos expertas se postula efectiva y segura oncológicamente para casos seleccionados de CCEO³³.

La radioterapia se emplea como tratamiento único en casos iniciales (estadios I-II), terapia adyuvante a la cirugía, o concurrente con la quimioterapia en el tratamiento de la enfermedad localmente avanzada³¹. La dosis de radiación varía entre los 60 Gy y 70 Gy. La estrategia de desintensificación de dosis en pacientes con bajo riesgo de recidiva está en estudio y la IMRT (radioterapia de intensidad modulada) puede reducir los efectos adversos tardíos²⁶.

La quimioterapia es parte de la terapia multimodal. Se puede administrar como quimioterapia de inducción, concomitante con radioterapia y como tratamiento adyuvante³¹. El cisplatino a altas dosis es el radiosensibilizador estándar en el tratamiento del CCECC. Como fármaco alternativo tenemos el cetuximab^{34,35}. Sin embargo, la adición de cetuximab a cisplatino con radioterapia no demostró mejoría en la supervivencia en comparación a cisplatino con radioterapia en un ensayo en fase 3, incrementando de forma notable la toxicidad³⁴. Estudios recientes demuestran que la concomitancia con cisplatino es superior a la concomitancia con cetuximab³⁶.

1.1.5. PRONÓSTICO

La supervivencia tras el diagnóstico de un CCECC depende fundamentalmente de la localización anatómica del tumor primario, el estadio y el estatus VPH (en el caso de los CCEO), junto con otros factores clínicos y patológicos. El sistema de estadificación de la AJCC/UICC es el principal parámetro usado para predecir el pronóstico y guiar el tratamiento³⁰. La supervivencia a los 5 años tras el diagnóstico de un CCECC en los Estados Unidos es de aproximadamente un 65%. La supervivencia a los 5 años del diagnóstico se ha incrementado de forma significativa en los últimos 20 años pasando de un 54,7% entre 1992 y 1996, hasta un 65,9% entre 2002 y 2006. El incremento de la supervivencia ha sido mayor en el CCEO, donde la supervivencia a 5 años ha pasado del 39,7% al 69,8%. Este incremento puede ser atribuido a los avances en el tratamiento y al mejor pronóstico de los CCEO VPH-positivos, cuya incidencia ha aumentado en los últimos años³⁷.

1.2. GENERALIDADES SOBRE LA BIOLOGÍA MOLECULAR EN LOS CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CABEZA Y CUELLO

1.2.1. MODELOS DE CARCINOGENESIS GENÓMICA

En términos generales, los CCECC se pueden clasificar en tres subgrupos genéticos: tumores con presencia de VPH transcripcionalmente activo (VPH-positivo), tumores que son VPH-negativos con numerosas variaciones en el número de copias (CNA-alto) y tumores que son VPH-negativos con pocas variaciones en el número de copias (CNA-silentes)³⁸. Estos subgrupos han sido identificados mediante perfiles de expresión génica pero no han sido verificados por completo y aún se encuentran bajo investigación³⁸.

Las vías de p53 y RB juegan un papel clave en el control del ciclo celular y se encuentran frecuentemente alteradas en los CCECC VPH-negativos, si bien parece que permanecen activas en los tumores CNA-silentes. Además, la etiología de los tumores CNA-silentes no está del todo definida y la edad se considera como factor de riesgo. Numerosos oncogenes y rutas de señalización se relacionan con la progresión del CCECC VPH-negativo con CNA-alto, destacando las mutaciones en *FAT1* y *NOTCH1* que se relacionan con la vía de WNT- β -catenina y siendo su principal factor de riesgo el consumo de tabaco³⁸.

El CCECC clásico (VPH-negativo con CNA-alto) se caracteriza por mutaciones en el factor nuclear eritroide de tipo 2 relacionado con el factor 2 (*NFE2L2*). Los tumores VPH-negativos de forma habitual se desarrollan desde cambios precursores en la mucosa que se pueden presentar como leucoplasias. Las células en la mucosa leucoplásica progresan a cáncer por acumulación de mutaciones. La falta de conocimiento sobre los cambios precursores dificulta la precisión de la situación temporal de los eventos, pero se cree que la acumulación de mutaciones es el factor más importante (Figura 1)³⁸.

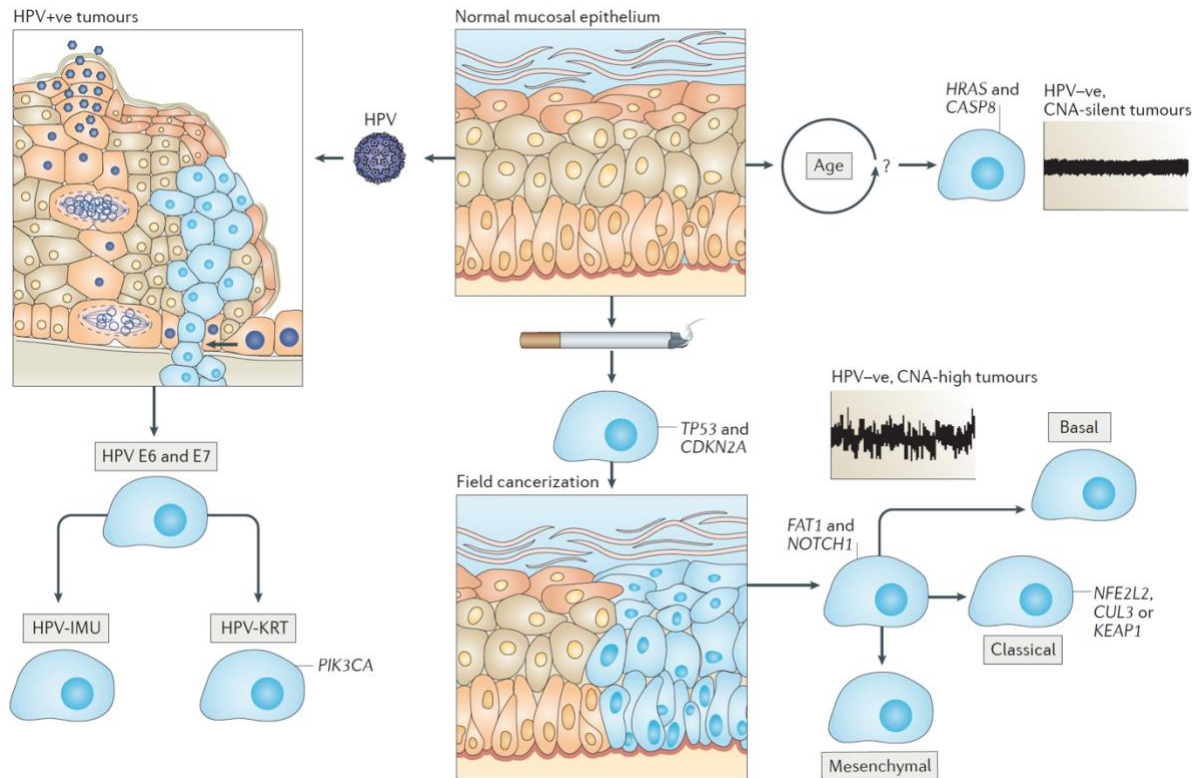


FIGURA 1: Modelos de carcinogénesis genómica en los CCECC. Tomado de la referencia³⁸.

1.2.2. ALTERACIONES GENÉTICAS MÁS FRECUENTES

Como ya se ha mencionado, existen características clínicas, biológicas y moleculares que distinguen a los CCEO VPH-positivos de los VPH-negativos²⁷, y por ello los CCEO VPH-positivos han sido reconocidos como una entidad independiente en la actual clasificación de la AJCC/UICC. Por el contrario, los CCECC causados por el tabaco y el alcohol están más asociados con mutaciones de *TP53* y otros genes supresores de tumores²⁸. La secuenciación del genoma de los CCECC ha identificado, además de mutaciones en *TP53*, mutaciones relacionadas con señales de supervivencia (*PIK3CA-AKT1-MTOR-PTEN*, *EGFR* y *MET*), proliferación (*RB*, *MET*, *CCDN1*, *CDKN2A/CDKN2b* e inactivación de p16) y desdiferenciación tumoral (*NOTCH1*)³⁹. Son

más frecuentes las mutaciones de *TP53* e inactivación de p16/*CDKN2A* entre los CCECC VPH-negativos, y mutaciones en *TRAF3*, *PIK3CA* y amplificación de *E2F1* en los CCECC VPH-positivos⁴⁰.

1.2.3. SEÑAS DE IDENTIDAD DEL CÁNCER

Las señas de identidad del cáncer (“*hallmarks*”) comprenden seis capacidades biológicas que son adquiridas durante las diferentes etapas del desarrollo tumoral. Incluyen mantener la señalización proliferativa, evadir los supresores del crecimiento, permitir la inmortalidad replicativa, resistencia a la muerte celular, inducción de la angiogénesis y activación de la invasión y la metástasis. Detrás de estas señas de identidad se encuentran la inestabilidad del genoma y la inflamación. En la última década se han agregado dos nuevas señas de identidad: la reprogramación del metabolismo energético y la evasión de la destrucción inmunológica (Figura 2)⁴¹. Por otro lado, los tumores son estructuras complejas y heterogéneas. Además de las células cancerosas, contienen un repertorio de diferentes poblaciones de células normales del estroma circundante y células inmunes reclutadas, que en conjunto constituyen el microambiente tumoral (TME) (Figura 3), y a través de una estrecha comunicación tumor-estroma contribuyen a la adquisición de estos rasgos distintivos del cáncer⁴¹.

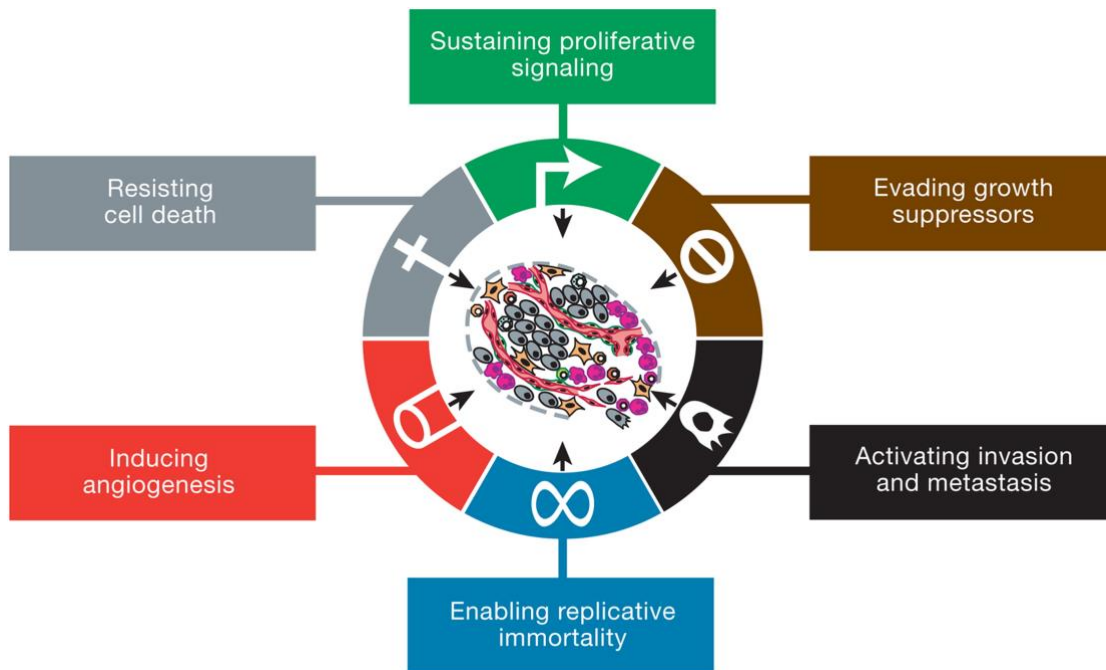


FIGURA 2: Señas de identidad del cáncer. Tomado de la referencia⁴¹.

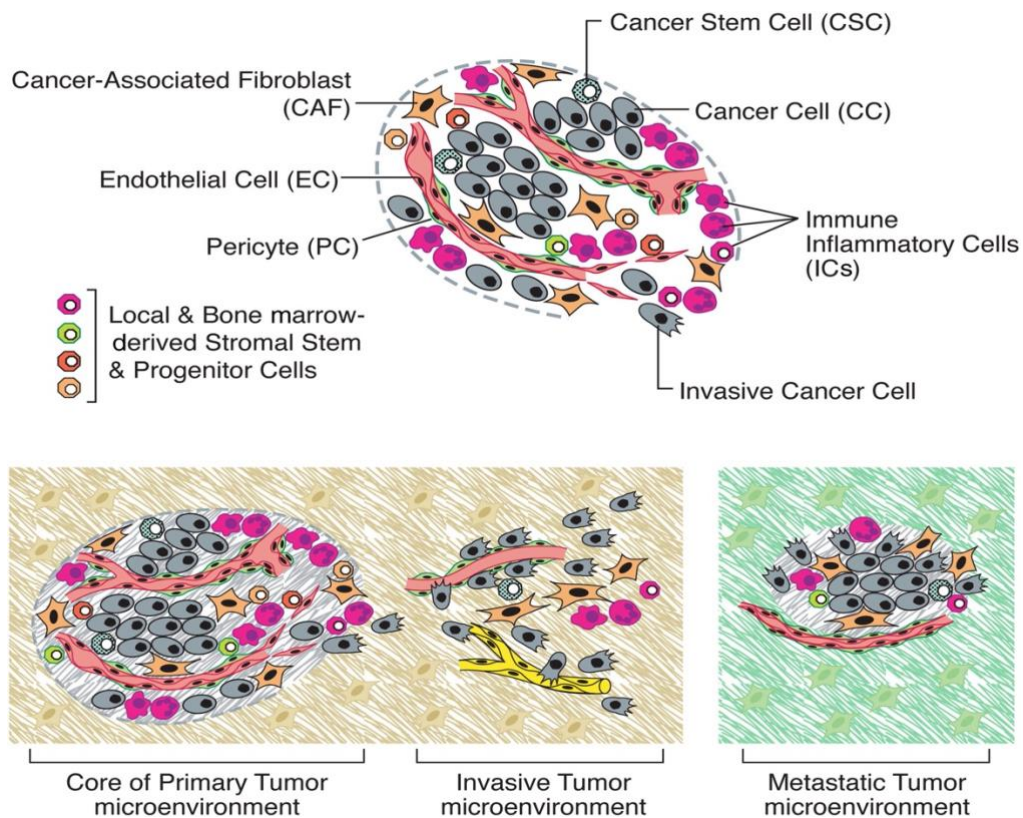


FIGURA 3: Componentes del TME. Tomado de la referencia⁴¹.

1.3. INMUNOLOGÍA TUMORAL EN LOS CCECC

1.3.1. GENERALIDADES

La capacidad para evadir la respuesta inmune ha sido identificada recientemente como una nueva señal de identidad del cáncer⁴¹. Aunque el cáncer es dirigido inicialmente por mutaciones oncogénicas, las células cancerosas tienen la capacidad de modular o “educar” al microambiente circundante y a las señales del sistema inmune para desarrollarse, invadir y metastatizar⁴².

La immuno-edición del cáncer describe una relación dinámica entre el tumor y el sistema inmune. En la fase de eliminación, el sistema inmune puede identificar y eliminar células tumorales según la expresión de antígenos asociados a tumor (TAAs). La fase de equilibrio se caracteriza por un estado latente del tumor: las células cancerosas no se destruyen, pero su crecimiento está restringido por el sistema inmune. Y en la fase de escape inmune las células pueden suprimir o evadir el control inmune⁴³.

La respuesta al tratamiento y la progresión tumoral está influenciada por la interacción entre el tumor y el TME. El TME representa un complejo ecosistema en el que se produce una estrecha comunicación e interacción entre las diversas subpoblaciones celulares que lo componen, como las células tumorales, los linfocitos T y B, las células Natural Killers (NK), células supresoras con origen mieloide (MDSC), macrófagos, células dendríticas y fibroblastos asociados al cáncer (CAF), junto con la matriz extracelular (Figura 3)^{41,44}.

Se considera a los linfocitos infiltrantes tumorales (TILs) como los efectores cruciales de la respuesta inmune antitumoral y su presencia ha sido relacionada con un incremento en la supervivencia en varios tipos de cáncer^{45,46}. Los tumores han desarrollado mecanismos para evadir la respuesta inmune del huésped (immunosupervivencia) entre los que se encuentran la capacidad de disminuir la expresión de HLA

de clase I para evitar el reconocimiento por las células T⁴⁷, inducción de la apoptosis de las células T⁴⁸, reclutamiento de células inmunosupresoras como células T reguladoras (Tregs), MDSCs, o macrófagos de tipo M2⁴⁹, inactivación del proceso de reconocimiento de antígenos previniendo el procesamiento y presentación de los antígenos asociados al tumor⁴⁹, alteración de los puntos de control inmune⁵⁰ y supresión de la actividad citolítica de las células NK⁵¹. También a través de un proceso selectivo conocido como inmunoedición, se seleccionan las células tumorales menos inmunogénicas por su capacidad de escapar del sistema inmune ofreciendo así una ventaja biológica para sobrevivir⁴³.

En los últimos años el microambiente inmune tumoral ha ganado mucho interés, especialmente debido a los avances en la inmunoterapia del cáncer. Desde que los CCECC se dividen en VPH-positivos (principalmente el CCEO) y VPH-negativos, es de esperar que el TME de cada subtipo pueda variar. Los CCECC VPH-positivos presentan un incremento del infiltrado inmune comparado con los CCECC VPH-negativos⁵².

1.3.2. ELEMENTOS DEL MICROAMBIENTE TUMORAL

1.3.2.1. CÉLULAS EFECTORAS DEL SISTEMA INMUNE INNATO

Los neutrófilos y las células NK son las células efectoras innatas y son las primeras en responder en caso de daño tisular.

Neutrófilos: pueden ser atraídos al microambiente tumoral a través de la secreción de IL-8, CCL4 o CCL5 por las células tumorales. Los neutrófilos asociados al tumor (TAN) pueden diferenciarse hacia un fenotipo antitumoral (N1) o protumoral (N2), en función de los factores de crecimiento presentes en el TME. Los TAN de tipo N2 pueden promover el crecimiento tumoral favoreciendo la inestabilidad genética, angiogénesis, metástasis y supresión inmune⁵³. En estudios recientes se ha encontrado

una menor supervivencia y mayor porcentaje de afectación ganglionar en pacientes con carcinomas de orofaringe e hipofaringe con una alta infiltración por neutrófilos^{54,55}.

Células NK: tienen un efecto citolítico directo a través de la liberación de perforinas y granzimas y pueden secretar IFN- γ que promueve la activación de células mieloides y células T-helper 1. Pueden promover la apoptosis tumoral vía FasL o TRAIL (apoptosis relacionada con TNF inducida por ligando). También las células NK pueden eliminar células tumorales a través de la citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC)⁴⁴. En el momento actual, se sabe poco acerca de la presencia de las células NK en el TME, a pesar de que el mecanismo inmune del anticuerpo dirigido frente a EGFR (cetuximab) actúa sobre la citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC)⁵⁶. La presencia de células NK CD56+ tumorales y estromales se ha asociado con una mayor supervivencia, tanto en pacientes con CCECC VPH-positivos como VPH-negativos⁵⁷.

1.3.2.2. CÉLULAS MIELOIDES

Células dendríticas: las células dendríticas (DCs) son células presentadoras de antígenos (APCs) que relacionan el sistema inmune innato con el adaptativo. Se encargan de seleccionar antígenos del sitio tumoral y, cuando se activan de forma apropiada, inducir una respuesta tumoral específica de células T. Algunos estudios previos sugieren que un mayor número de células mieloides DCs (mDCs) se asocia con una mayor infiltración por linfocitos intratumorales, menores tasas de metástasis ganglionares, menos recurrencias y una mejor supervivencia en pacientes con CCECC^{58,59,60}. Por el contrario, otros estudios no relacionan la infiltración por DCs con parámetros clínicos en el CCECC^{61,62}. En los estudios donde se incluyó el estatus VPH, se ha encontrado mayor infiltración por DCs en CCECC VPH-positivos⁶³, mientras que en otros no se han encontrado diferencias⁶⁴.

Macrófagos: los macrófagos están presentes en el TME y aparecen con dos fenotipos. Los macrófagos activados por IFN- γ polarizan hacia un fenotipo M1 y contribuyen a respuestas inmunes antitumorales. Los macrófagos activados por IL-4 polarizan hacia un fenotipo M2 y contribuyen a respuestas antiinflamatorias y protumorales⁴⁴. Se ha descrito una mayor densidad de células CD68+ (marcador de macrófagos) en los CCECC en comparación a tejido sano y su presencia se asocia a una peor supervivencia y mayor afectación ganglionar^{65,66}, aunque esta correlación no se observa en otros estudios^{67,68}. Las evidencias sugieren un rol de los TAMs (Macrófagos asociados al tumor) M2 en la progresión de los CCECC. Los CCECC VPH-positivos parecen presentar una mayor infiltración por TAMs M1, mientras que los CCECC VPH-negativos presentan una mayor infiltración por TAMs M2⁴⁴.

Células supresoras con origen mieloide (MDSCs): están caracterizadas por su capacidad para inhibir las respuestas inmunes innatas y adaptativas. Suprimen la acción de las células T CD4+ y CD8+, inducen células Tregs y actúan junto a los macrófagos favoreciendo un fenotipo inmunosupresor elevando los niveles de IL-10 y disminuyendo IL-12⁶⁹. Una mayor infiltración por MDSCs se ha correlacionado con un estadio clínico más avanzado y mayor grado histológico⁷⁰, y se ha encontrado una mayor infiltración por MDSCs en CCECC en comparación al tejido sano⁶⁹.

1.3.2.3. CÉLULAS EFECTORAS DEL SISTEMA INMUNE ADAPTATIVO

Células T CD8+: tras la activación por estimulación antigénica por las APCs o por citoquinas, las células T CD8+ nativas se diferencian en células T efectoras de memoria o citotóxicas⁷¹. Las células T citotóxicas constituyen un subgrupo de células T con la capacidad de reconocer y eliminar células tumorales. Varios estudios correlacionan un alto infiltrado inmune tumoral por células T CD8+ con mejor pronóstico en

CCECC^{72,73,74,75,76}. Sin embargo, el efecto parece verse influido por la localización del tumor primario, la cantidad relativa de otras células inmunes infiltrantes, la distribución espacial y estatus del VPH⁴⁴. Dos recientes meta-análisis sobre el rol de los TILs CD8+ en el CCE oral han mostrado resultados contradictorios^{77,78}. En el CCEO, los TILs CD8+ parecen tener un efecto positivo en la supervivencia cuando se detecta una alta infiltración tanto estromal como tumoral^{76,79,80,81}. Los CCEO VPH-positivos muestran una mayor infiltración por TILs CD8+ y se ha descrito que, entre estos pacientes, los que tienen una menor proporción de TILs CD8+ no presentan un mejor pronóstico en comparación a los VPH negativos⁸². En los CCEL, una alta infiltración por TILs CD8+ también se ha relacionado con una mejor supervivencia^{83,84,85}.

Células T CD4+: representan un heterogéneo grupo de células que pueden ser subclasificadas en varios tipos: Th1, Th2, Th9, Th17, células T helper foliculares (Tfh) y Tregs⁸⁶. El rol de estas células en los CCECC puede ser atribuible a cualquier subtipo y la tinción inmunohistoquímica de CD4+ puede no ser suficiente. Esto puede explicar el ambiguo rol de células T CD4+ en el CCECC⁴⁴. No se ha hallado una correlación significativa entre los TILs CD4+ y un pronóstico más favorable en pacientes con CCECC^{73,87,88,89}. Para establecer su papel en el CCECC es necesario un estudio de las subpoblaciones de TILs CD4+ en las diversas localizaciones y subtipos tumorales.

Células T reguladoras: son una subpoblación de células T CD4+ que pueden ser identificadas por la expresión del factor de transcripción FoxP3⁸⁶. Juegan un papel clave en el mantenimiento de la tolerancia inmune regulando otras células inmunes (DCs, células NK, células B, células CD4+ y CD8+), por lo que también facilitan el escape inmune y la progresión tumoral⁹⁰. En estudios recientes, una mayor presencia de TILs CD4+ FoxP3+ se ha asociado con un mejor pronóstico en CCECC^{91,92}. Sin embargo, por

localizaciones, en el CCE de cavidad oral se correlaciona una menor presencia de TILs CD4+ FoxP3+ con un mejor pronóstico^{93,94}.

Linfocitos B: la presencia y valor pronóstico de las células B en el TME está poco estudiado⁴⁴. Como parte del sistema inmune adaptativo, los linfocitos B juegan un rol importante en la respuesta inmune frente a las células tumorales. Los linfocitos B maduros pueden producir anticuerpos que se unen a las células tumorales permitiendo la ADCC por las células NK, la fagocitosis por macrófagos mediada por el receptor Fc, convertirse en células presentadoras de antígeno o interactuar directamente con las células T CD4+ (CD40/CD40L) y CD8+ (CD27/CD70), favoreciendo así la acción inmune antitumoral⁹⁵. Sin embargo, las células B reguladoras (Bregs) se cree que estimulan el crecimiento tumoral por interacción negativa con otras células inmunes del TME⁹⁶. Se ha descrito una mayor proporción de linfocitos B CD19+/CD20+ tumorales en los CCECC VPH-positivos, frente a los CCECC VPH-negativos y mucosa sana^{64,97}. La mayoría de los estudios asocian la presencia de linfocitos B con un mejor pronóstico de los CCECC^{98,99}. Pero otros estudios no encuentran esta asociación favorable¹⁰⁰.

1.3.2.4. OTROS COMPONENTES DEL ESTROMA

Fibroblastos asociados al cáncer (CAFs): son las células no inmunes más abundantes en el estroma. Favorecen el desarrollo tumoral promoviendo la proliferación tumoral, invasión y metástasis. La presencia de CAFs en el TME se relaciona con desmoplasia estromal mediante la deposición de colágeno. Los marcadores más empleados para identificar CAFs son α -SMA (*smooth muscle actin*), integrina $\alpha 6$ y FAP (*fibroblast activation protein*). Producen factores de crecimiento epidérmico (EGF) y vascular (VEGF) y producen metaloproteasas de matriz (MMPs) que ayudan en el remodelado de la matriz extracelular y favorecen la progresión tumoral y el desarrollo de

metástasis¹⁰¹. También promueven la supresión inmune en el estroma circundante, al producir niveles altos de TGF- β , IL-10 e IL-6, y reclutan más células inflamatorias a través de la secreción de quimocinas¹⁰². Existen pocos estudios al respecto, pero algunos estudios iniciales han relacionado la mayor abundancia de CAFs con un peor pronóstico en los CCECC^{103,104,105}.

1.3.3 ALTERACIÓN DE LOS PUNTOS DE CONTROL INMUNE

La respuesta inmune se activa cuando las células T reconocen a los TAAs expresados por las células tumorales y procesados por las células presentadoras de antígenos (APC). Con el fin de mantener la homeostasis inmune, la activación de las células T está regulada por señales estimuladoras e inhibitoras. Las células T requieren dos señales para activarse. La primera es generada a través del receptor de células T (TCR) la cual es dependiente de antígeno. La segunda es co-estimuladora, generada por la interacción entre moléculas co-estimuladoras en la membrana de las APC y la célula T.

Los puntos de control inmune representan recesos inmunológicos que bloquean a los efectos estimuladores de células T con el fin de evitar la autoinmunidad (Figura 4). Las moléculas clave que participan en vías de control inmune incluyen PD-1/PD-L1 y CTLA-4¹⁰⁶.

PD-1 (*programmed cell death 1*): es un receptor inhibitor que pertenece a la familia de CD28. Se expresa en la superficie celular de las células T activadas (también células B, NK y monocitos). Después de unirse a sus principales ligandos (PD-L1 y PD-L2), PD-1 impide la activación de células T y limita la actividad de células T efectoras en órganos periféricos y tejidos durante la inflamación. Esto se consigue inhibiendo la proliferación de las células T y regulando a la baja a las moléculas anti-apoptóticas y la liberación de citoquinas¹⁰⁷.

PD-L1 (*programmed cell death ligand 1*): es el ligando fisiológico de PD-1. Es inducido en tejido no linfoide y en células tumorales. Se expresa bajo condiciones inflamatorias desencadenado por citoquinas entre las que destaca IFN- γ y estímulos exógenos. En células tumorales, la expresión de PD-L1 puede estar desencadenada por alteraciones celulares asociadas a carcinogénesis (inducción intrínseca). Su expresión

ocurre frecuentemente en una variedad de tumores, incluyendo los CCECC. La unión del PD-L1 con PD-1 bloquea la activación de células T favoreciendo la evasión inmune¹⁰⁸.

CTLA-4: es una glicoproteína de superficie expresada por las células T. Regula negativamente la activación de las células T compitiendo por los ligandos B7, CD80 y CD86 con el receptor activador CD28. En los CCECC, se ha encontrado en superficie una expresión aumentada de CTLA-4 en las células T reguladoras (Tregs), que disminuyen la proliferación de las células T¹⁰⁹.

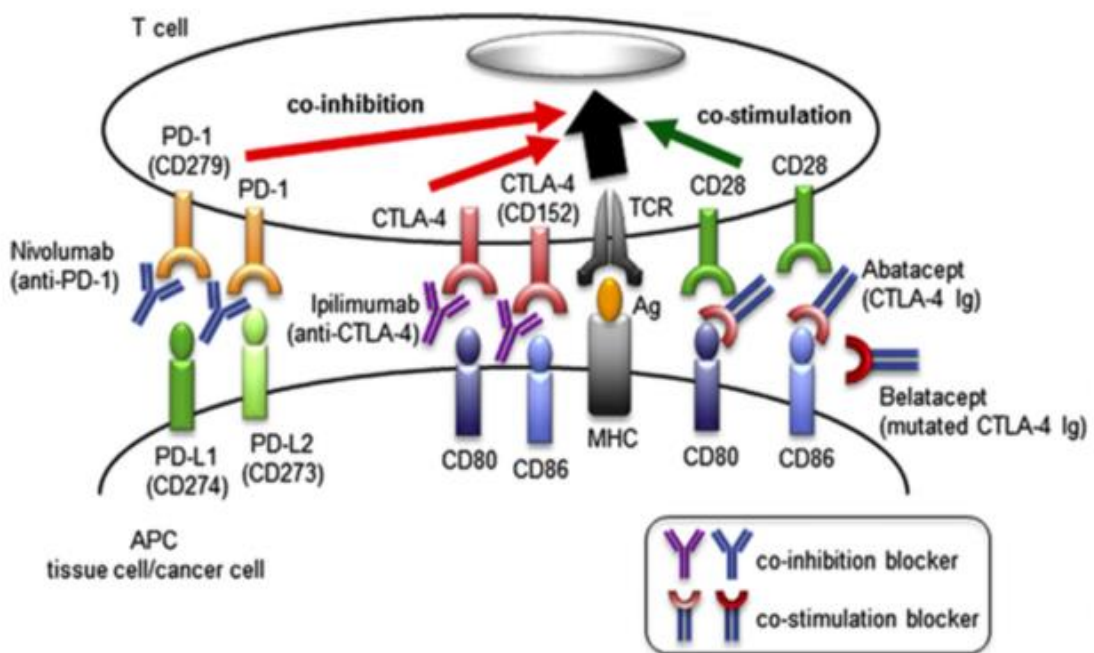


FIGURA 4: Vías de señalización estimuladoras o inhibitoras de células T y anticuerpos monoclonales dirigidos contra ellas. Tomado de la referencia¹⁰⁸.

Expresión de PD-L1:

PD-L1 no se expresa generalmente en tejido normal, pero algunas citoquinas inflamatorias, en particular $IFN\gamma$, pueden aumentar su expresión en varios tipos celulares,

incluyendo las células tumorales. Esto indica que los tumores pueden aumentar la expresión de PD-L1 en respuesta a IFN γ secretado por los TILs. Se considera un mecanismo de resistencia inmune adaptativo para suprimir la función de las células T efectoras y PD-L1 también puede ser expresado en el tumor sin presencia de TILs¹⁰⁶. Basado en la combinación de la expresión de PD-L1 y la densidad de TILs, *Teng MW et al.*¹¹⁰ han propuesto clasificar los tumores en cuatro grupos:

- Tipo I: expresión de PD-L1 con alta densidad de TILs. Se considera que presentan una resistencia inmune adaptativa. Estos pacientes podrían ser los más beneficiados de la inmunoterapia.
- Tipo II: no presentan expresión de PD-L1 y no presentan TILs. Se considera que presentan una ignorancia inmune. Son los denominados “desiertos inmunológicos”, y en ellos no sería eficaz la inmunoterapia.
- Tipo III: expresión de PD-L1 y no presentan TILs, por lo que la inducción de la expresión de PD-L1 sería debida a las alteraciones oncogénicas (inducción intrínseca). Esto sugiere una inmunosupresión tumoral.
- Tipo IV: no presentan expresión de PD-L1 y tienen una alta densidad de TILs. Esto sugiere una tolerancia inmune. La inmunosupresión se supone debida a otro mecanismo diferente a PD-1/PD-L1.

La inmunoterapia ha emergido como una estrategia de tratamiento prometedora en el cáncer. El bloqueo de los puntos de control inmune usando anticuerpos dirigidos principalmente frente a PD-1/PD-L1 ha demostrado eficacia en el tratamiento de varias neoplasias^{106,111}. En 2016 la FDA (*Food and Drug Administration*) aprobó el uso de los anticuerpos monoclonales anti-PD-1 Nivolumab y Pembrolizumab para el tratamiento de pacientes con un CCECC recurrente/metástasico (R/M) y refractario a las terapias basadas en platino. En 2019, la FDA aprobó el uso de Pembrolizumab como primera línea

de tratamiento en pacientes con un CCECC R/M irresecable³². La expresión de PD-L1 se ha propuesto como biomarcador predictivo para los inhibidores de los puntos de control inmune, aunque ha mostrado un valor predictivo moderado entre los tumores sólidos¹¹². En el CCECC, la expresión de PD-L1 se correlaciona con una buena eficacia de los inhibidores de los puntos de control inmune anti-PD-1/PD-L1 y se incrementa el valor predictivo cuando se considera tanto la expresión de PD-L1 como de la infiltración tumoral por células inmunes. Sin embargo, el valor predictivo de la expresión de PD-L1 tiene limitaciones ya que algunos pacientes PD-L1 negativos han mostrado respuesta al tratamiento con inmunoterapia^{113,114}.

Más allá del posible papel de PD-L1 como biomarcador predictivo de la respuesta anti-PD-1/PD-L1 en los CCECC, el valor pronóstico de su expresión continúa siendo controvertido. Dos recientes meta-análisis no han mostrado un claro impacto de la expresión de PD-L1 en el pronóstico de los CCECC^{115,116}. No obstante, la considerable heterogeneidad entre los estudios podría contribuir a explicar estos resultados contradictorios. También pueden causar discrepancias las diferencias metodológicas en la tinción inmunohistoquímica de PD-L1, incluyendo los anticuerpos empleados y/o los puntos de corte de cada estudio. Además, las localizaciones heterogéneas, el estadio, diferentes regímenes de tratamiento y el estatus VPH de los pacientes pueden haber contribuido a los resultados variables. En nuestra opinión, un análisis más detallado del microambiente tumoral y del infiltrado inmune asociado a la expresión de PD-L1 puede ser beneficioso para definir y clarificar su valor pronóstico en los CCECC.

1.3.4. SUPRESIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOLÍTICA DE LAS CÉLULAS NK

Los receptores de tipo lectina en las células NK (KLRs) son un tipo de glicoproteínas de tipo lectina C, codificadas por genes del Complejo NK (NKC) localizados en el brazo corto del cromosoma 12^{51,117,118}. Además de la subfamilia NKG2, NKC incluye un grupo de genes menos estudiado que codifican los receptores NKRP1 (CD161) y sus ligandos lectina de tipo C (CLEC). En este grupo, los más estudiados son el complejo NKRP1A/LLT1 codificados por los genes *KLRB1* y *CLEC2D*, respectivamente¹¹⁹. Ambas moléculas son glicoproteínas de señalización transmembrana de tipo II con un dominio lectina tipo C extracelular. NKRP1 se expresa predominantemente en la superficie de células NK, donde actúa como un receptor inhibitorio. Sin embargo, también estimula las células T, lo que resulta en la liberación de IL-17 y citoquinas inflamatorias⁵¹.

En un reciente estudio de metadatos sobre 18.000 tumores de 39 tipos tumorales, *Gentles AJ y cols.*¹²⁰ describieron la expresión de KLR1B (CD161) como uno de los marcadores pronósticos más favorables. La unión del ligando LLT1 (*Lecitin Like Transcript 1*) al receptor NKRP1 de las células NK también estimula la producción de IFN- γ , y de forma similar estimula la activación de las células B¹²¹. LLT1 también se expresa en osteoblastos y condrocitos e inhibe la degradación ósea. La expresión tumoral de LLT1 puede facilitar la supervivencia de las células tumorales frente a la actividad citolítica de las NK. Por otro lado, NKRP1 puede estar involucrado en la activación de los linfocitos B y T en el curso de reacciones inflamatorias y la patogénesis de enfermedades autoinmunes. De esta forma, el complejo receptor/ligando NKRP1A/LLT1 se postula como una diana terapéutica que podría ser usada en la inmunoterapia del cáncer y algunas enfermedades autoinmunes⁵¹. La expresión de LLT1 se ha detectado en células B y monocitos circulantes, pero no en los macrófagos localizados en hígado o pulmones.

Además, se ha encontrado una alta expresión de LLT1 en sitios inmunoprivilegiados (cerebro, placenta y testículos) y se ha confirmado la capacidad del ligando LLT1 para inhibir la función de las células NK¹¹⁷.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

En el momento actual, el impacto del perfil de respuesta inmunológica en el pronóstico y respuesta al tratamiento de pacientes con CCECC es incierto. Esto es debido a que la mayoría de los estudios incluyen series heterogéneas de pacientes que han recibido diferentes tratamientos y además tumores de diferentes localizaciones, sin tener en cuenta la posible influencia de la infección por el virus VPH.

Como se indicó anteriormente, estudios previos sobre linfocitos infiltrantes de tumor (TILs), han mostrado que una alta infiltración por células T CD8+ y Tregs está asociado a un pronóstico más favorable en el CCECC, siendo inconsistentes los resultados con relación a la expresión de PD-1/PD-L1. Y hasta el momento actual, las interacciones entre PD-L1, PD-1 y los diferentes tipos de TILs, así como el impacto de estas interacciones en el pronóstico no han sido bien documentadas en estos carcinomas.

Por otro lado, se desconoce si el inhibidor de la activación de células NK LLT1 se expresa en los CCECC y su posible relevancia pronóstica aún no se ha explorado.

2.2. OBJETIVOS

Nuestro objetivo se ha centrado en estudiar varios aspectos clave que regulan la respuesta inmune frente al CCECC, como la infiltración tumoral por células del sistema inmune y la expresión de inhibidores de puntos de control inmunológico. Para ello, se ha seleccionado una amplia serie de pacientes diagnosticados de CCECC, con estatus del VPH conocido, de localizaciones bien definidas y tratados de forma homogénea, con el fin de definir el valor pronóstico y las posibles implicaciones terapéuticas del perfil de respuesta inmune.

Este objetivo general se ha abordado a través de los siguientes objetivos específicos:

- 1- Evaluar la expresión tumoral y estromal de PD-1 y PD-L1 en una cohorte homogénea de pacientes con CCECC VPH-negativos.
- 2- Analizar la infiltración tumoral de células T citotóxicas (CD8+) y células T reguladoras (Tregs/FOXP3+).
- 3- Evaluar la expresión tumoral y estromal de LLT1.
- 4- Analizar las correlaciones de la expresión tumoral/estromal de PD-1, PD-L1 y LLT1 con la infiltración por linfocitos T (CD8+ y Tregs) y NK.
- 5- Investigar el significado clínico y valor pronóstico de la expresión de PD-1, PD-L1, LLT1 y de la infiltración por linfocitos T y NK, así como de las combinaciones de estos parámetros.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. SUJETOS A ESTUDIO

Se seleccionó una serie homogénea de 382 pacientes tratados quirúrgicamente de un carcinoma escamoso de cabeza y cuello (249 CCEO, 65 CCEH y 68 CCEL) en el Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) entre los años 1990 y 2009.

El manejo de las muestras y los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación del Principado de Asturias (CEI 70/16, con fecha 5 mayo de 2016 para el proyecto PI16/00280 y CEI 141/19, con fecha 14 de mayo de 2019 para el proyecto PI19/00560). El consentimiento informado para la recolección, almacenamiento y análisis de las muestras fue obtenido de todos los pacientes.

El estadio del cáncer fue establecido de acuerdo con la 7ª edición del Manual de la *American Joint Committee on Cancer Staging* y la edad fue definida como la edad en el momento de la cirugía.

Todos los pacientes tenían un tumor primario único localizado en orofaringe, hipofaringe o laringe confirmado con biopsia. En todos los casos los márgenes quirúrgicos microscópicos estaban libres de tumor, ningún paciente había recibido otro tratamiento antes de la cirugía y el estatus de la infección por VPH era conocido.

Para obtener una muestra homogénea, se excluyeron del análisis 10 casos que mostraban infección por el VPH (8 en CCEO, 1 en CCEH y 1 en CCEL), por lo que la muestra final fue de 372 pacientes (241 CCEO, 64 CCEH y 67 CCEL)

Las variables clínico-patológicas fueron estudiadas retrospectivamente y revisadas en la historia clínica hospitalaria. Las variables analizadas fueron: edad, sexo, consumo de tabaco y alcohol, localización del tumor primario, clasificación pT y pN, estadio, grado de diferenciación histológica, administración de RT complementaria y

seguimiento clínico. Las características clínico-patológicas del total de los pacientes CCECC a estudio se muestran en la Tabla 1.

La edad media de los pacientes fue de 58,6 años (rango 30-86 años). Sólo 14 casos fueron mujeres. El tiempo de seguimiento mínimo en los pacientes que no fallecieron por el tumor fueron 36 meses y el tiempo de seguimiento medio para el total de la serie fue de 34,6 meses (mediana 21,5 meses). Doscientos treinta y dos (62%) de los 372 pacientes recibieron radioterapia complementaria.

La recurrencia fue definida como recidiva del tumor en los primeros 5 años después del tratamiento en cualquier localización: recidiva local, metástasis ganglionar y/o metástasis a distancia.

TABLA 1: Características clínico-patológicas de la cohorte de 372 pacientes con CCECC VPH-negativos seleccionados para estudio.

CARACTERÍSTICAS	Nº DE CASOS (%)
Edad (media y rango)	58,6 (30-86 años)
Sexo	
- Varones	358 (96)
- Mujeres	14 (4)
Tabaco	
- No fumadores	12 (3)
- Moderado (1-50 paquetes-año)	149 (40)
- Importante (>50 paquetes-año)	206 (55)
- Desconocido	5 (1)
Alcohol	
- No bebedores	25 (7)
- Bebedores	342 (90)
- Desconocido	5 (1)
Localización	
- Orofaringe	241 (65)
- Hipofaringe	64 (17)
- Laringe	67 (18)
Clasificación pT	
- T1	38 (10)
- T2	77 (21)
- T3	125 (34)
- T4	132 (35)
Clasificación pN	
- N0	103 (28)
- N1	46 (12)
- N2	183 (49)
- N3	40 (11)
Estadio	
- I	20 (5)
- II	24 (6)
- III	64 (17)
- IV	264 (71)
Grado de diferenciación	
- Bien diferenciado	147 (39)
- Moderadamente diferenciado	148 (40)
- Pobremente diferenciado	77 (21)
Radioterapia complementaria	
- Si	232 (62)
- No	140 (38)
Recurrencia	
- Si	224 (60)
- No	148 (40)
Total	372

3.2. RECOGIDA DE LAS MUESTRAS Y CONSTRUCCIÓN DE MATRICES TISULARES (TMA)

Se obtuvieron las muestras histológicas tumorales conservadas en parafina a través del Biobanco del Principado de Asturias (PT17/0015/0023). El diagnóstico histológico de carcinoma escamoso fue confirmado por patólogos expertos. Se seleccionaron tres áreas morfológicamente representativas de cada bloque de tejido tumoral parafinado para la construcción de las matrices tisulares (TMAs). Se emplearon tres cilindros de 1 mm de diámetro de cada caso para construir los TMAs, como se describió previamente¹²².

Así se construyeron un total de 15 TMAs, que contenían 3 núcleos de tejido de cada uno de los 382 CCECC (141 CCEO amigdalares, 108 CCEO en base de lengua, 65 CCEH y 68 CCEL). Cada TMA también incluía 3 cilindros de mucosa normal de laringe o de faringe, que sirvieron como control interno. El epitelio normal se obtuvo de pacientes adultos varones, no fumadores y no bebedores e intervenidos de amigdalectomía o de pólipos laríngeos.

3.3. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO

Los TMAs fueron cortados en secciones de 3 µm y secados en portaobjetos de microscopio IHC Flex (Dako, Santa Clara, CA). Las secciones fueron desparafinadas en xileno y rehidratadas a través de soluciones de gradación decreciente de etanol. El proceso de recuperación antigénica se realizó calentando las secciones usando la solución Envision Flex Target Retrieval de alto pH (Dako).

Se realizó un estudio inmunohistoquímico de PD-1, PD-L1, LLT1, CD8 y FOXP3 de las muestras contenidas en los TMAs.

La tinción se llevó a cabo en una estación de trabajo de tinción automática (Dako Autostainer Plus, Dako) a temperatura ambiente con los siguientes anticuerpos monoclonales:

- Anti-PD-L1 (clon E1L3N, diluido 1:200, Cell Signaling Technology, Danvers, MA).
- Anti-PD-1 (clon EH33, diluido 1:200, Cell Signaling Technology, Danvers, MA)
- Anti-LLT1/CLEC2D (Clon 4C7, diluido 1:200, Novus Biologicals, Littleton, CO).
- Anti-CD8 (clon SP16, diluido 1:400, NeoMarkers, Fremont, CA)
- Anti-FOXP3 (clon 236A/E7, diluido 1:400, Abcam, Cambridge, UK).

La detección se llevó a cabo usando el sistema de visualización EnVision Flex + (DakoCytomation, Dako) durante 30 minutos a temperatura ambiente y empleando la diaminobenzidina como cromógeno. La contratinción con hematoxilina durante 7 minutos fue el último paso.

Como control positivo de PD-L1 se empleó tejido placentario, y de PD-1, LLT1, CD8 y FOXP3, tejido amigdalario sano.

Todas las secciones fueron revisadas por dos investigadores de forma ciega respecto a la información clínica.

Para la expresión de PD-L1, solamente se valoró la tinción de membrana celular y la expresión en células tumorales se cuantificó como: expresión de PD-L1 negativa

(<1% de células con tinción), expresión de PD-L1 baja (1-10%), expresión de PD-L1 intermedia (11-50%) o expresión de PD-L1 alta (>50% células teñidas). La positividad de la puntuación de proporción tumoral (TPS: tumor proportion score) se definió como $\geq 1\%$ de las células tumorales con tinción positiva respecto al total de células tumorales, basándose en las recomendaciones actuales³². La puntuación de proporción combinada (CPS: combined proportion score), que corresponde al número de células positivas para PD-L1 (englobando células tumorales, linfocitos y macrófagos) en relación con el total de células tumorales, también se consideró positivo si era $\geq 1\%$.

La expresión de PD-1 fue evaluada en las células inmunes estromales y fue considerada positiva cuando $\geq 1\%$ de las células tenían tinción positiva.

Los linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) se definen como linfocitos presentes en el tumor (intratumorales), mientras que el área peritumoral no está incluida. La cuantificación de la tinción de TILs se llevó a cabo de forma automatizada usando el software *ImageJ* para CD8 (marcador de linfocitos T citotóxicos) y de forma manual para FOXP3 (marcador de linfocitos T reguladores), contando las células en las 3 áreas tumorales de cada caso dentro de cada TMA (3 áreas representativas de cada tumor). Las 3 áreas tumorales se midieron y el número total medio de células positivas para cada marcador se expresó en densidad por mm². Con fines estadísticos, el valor de la mediana fue usado como punto de corte para definir una alta y baja densidad tanto para TILs CD8+ como FOXP3+.

La tinción de LLT1 mostró una distribución homogénea entre las muestras tumorales, preferentemente detectado en el citoplasma de las células tumorales, aunque algunos casos mostraron tinción a nivel de la membrana celular. Se aplicó un sistema de puntuación semicuantitativo basado en la intensidad de la tinción: la expresión de LLT1 fue clasificada como negativa (ausencia de expresión), débil-moderada, o intensidad de

tinción fuerte. Con fines estadísticos, y basado en estudios preliminares, la puntuación fue dicotomizada como expresión negativa *versus* positiva (débil-moderada/ fuerte).

La tinción estromal de LLT1 fue puntuada de forma semicuantitativa midiendo la densidad de las células inmunes positivas, como se describió previamente¹²³: ausencia o células positivas esporádicas (*score* 0), número de células positivas medio a moderado (*score* 1), número de células positivas abundante (*score* 2) o altamente abundante (*score* 3). La tinción de LLT1 en los TILs fue evaluada de forma conjunta en el compartimento intratumoral y estromal y las puntuaciones fueron dicotomizadas como expresión baja (*scores* 0 y 1) *versus* expresión alta (*scores* 2 y 3).

3.4. DETECCIÓN DE VPH

El estatus VPH fue analizado usando inmunohistoquímica para p16 y detección de los serotipos de VPH de alto riesgo mediante hibridación *in situ* en todos los casos. Y en los casos p16 positivos, la detección por PCR empleando los cebadores GP5+/6+, y posterior genotipado por enzimoimmunoanálisis, como previamente ha sido descrito⁸.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las características clínicas y demográficas de los pacientes se resumieron usando estadísticos descriptivos estándar.

La correlación entre resultados inmunohistoquímicos, conteo de linfocitos infiltrantes y variables clínico-patológicas fue analizada mediante la versión 21 del software para *Mac* de *IBM SPSS Statistics* usando Chi-cuadrado de Pearson, test exacto de Fisher, correlación de Spearman.

El análisis mediante Kaplan-Meier fue usado para la estimación de la supervivencia, comparando las distribuciones mediante el test Log-Rank.

Los estudios de regresión de Cox fueron usados para los análisis univariantes y multivariantes y se calcularon los cocientes de riesgos (HR) con un intervalo de confianza del 95% y los valores de P.

Todos los estudios se realizaron bilaterales. Los valores de $P < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PD-1, Y PD-L1 E INFILTRACIÓN POR TILS EN MUESTRAS TISULARES DE CCECC

No fue posible analizar la expresión de todos los marcadores en todos los casos por problemas con la integridad de las muestras correspondientes a cada caso. La tinción de PD-1 pudo ser evaluada en 319 de los 372 casos; 152 (47,5%) de los 319 casos presentaron expresión positiva de PD-1 en las células inmunes estromales (Figura 5).

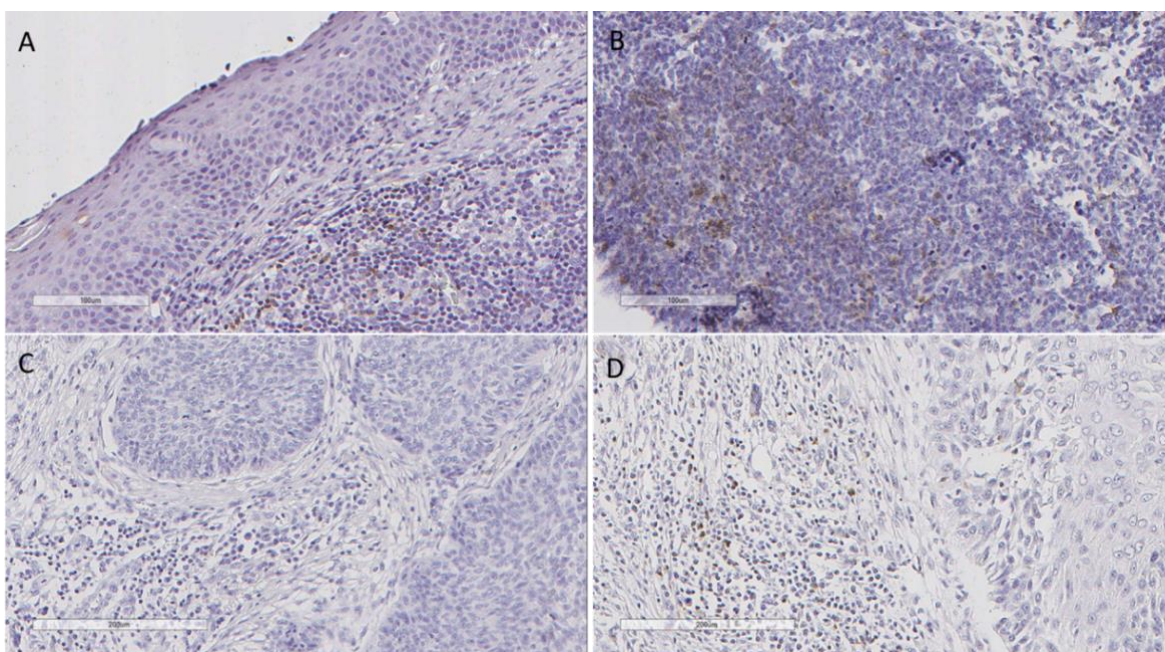


FIGURA 5: Ejemplos de tinción de PD-1. **A:** Epitelio amigdalario con tinción subepitelial, **B:** control positivo: tejido linfoide amigdalario, **C:** tumor con ausencia de expresión en células inmunes estromales; **D:** tumor con expresión en células inmunes estromales. Magnificación original 200X.

La tinción de PD-L1 fue evaluable en 349 de los 372 casos; 103 (29,5%) de los 349 casos presentaron expresión tumoral de PD-L1 (Figura 6). De estos casos, 66 (19%) se clasificaron como baja expresión (1-10% de células tumorales con tinción), 18 (5%) como expresión intermedia (11-50% de células tumorales con tinción) y 19 casos (5,5%) se clasificaron como alta expresión (>50% de células tumorales con tinción) (Figura 7).

92 casos (26%) mostraron expresión estromal de PD-L1; de estos, 37 casos (11% del total de casos) no mostraron expresión en las células tumorales, pero sí en el estroma (Figura 6). Se halló una correlación significativa entre la expresión tumoral y estromal (células inmunes) de PD-L1 (coeficiente de correlación de Spearman = 0,373, $P < 0,001$). La puntuación de la proporción combinada (CPS) de PD-L1 fue positiva en 140 casos (40%).

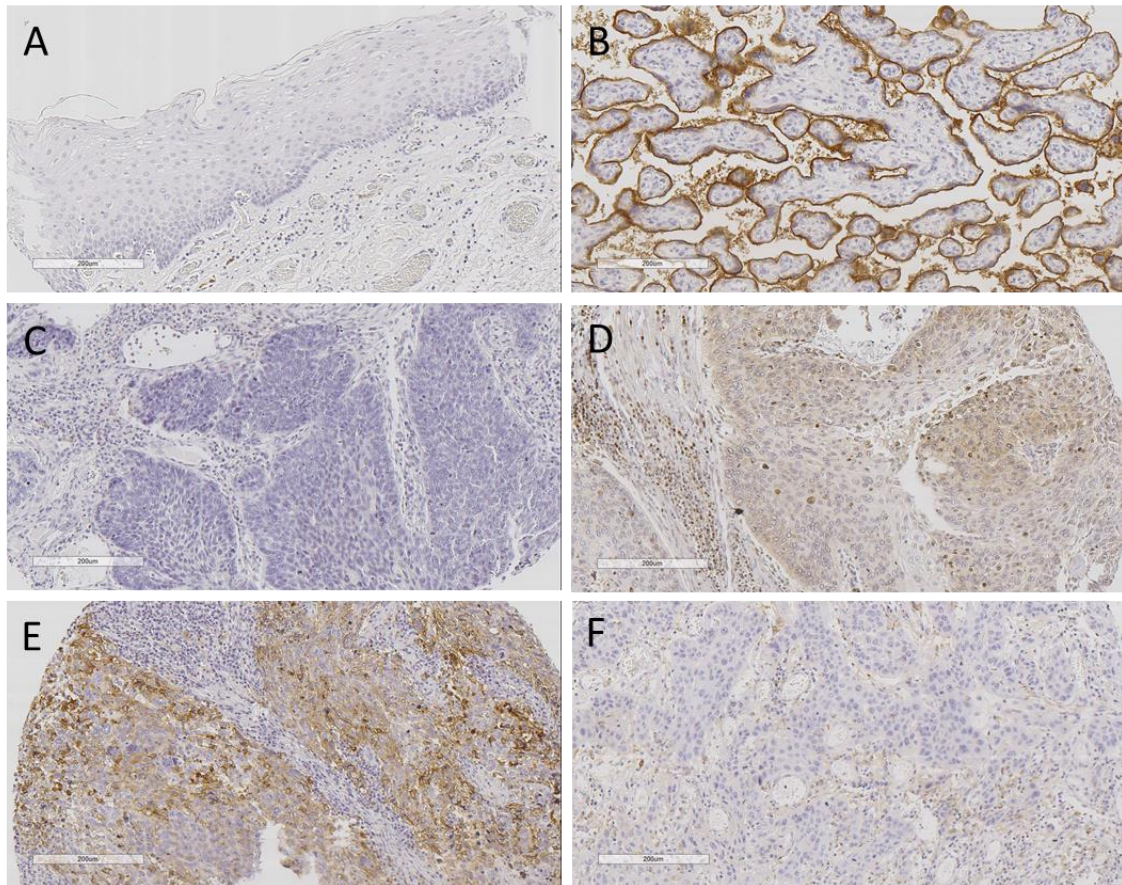


FIGURA 6: Ejemplos de tinción de PD-L1. **A:** Epitelio normal sin tinción, **B:** control positivo (placenta), **C:** tumor con ausencia de expresión, **D:** tumor con expresión en células tumorales y estromales, **E:** tumor con expresión sólo en células tumorales; **F:** tumor con expresión sólo en células estromales. Magnificación original 200X.

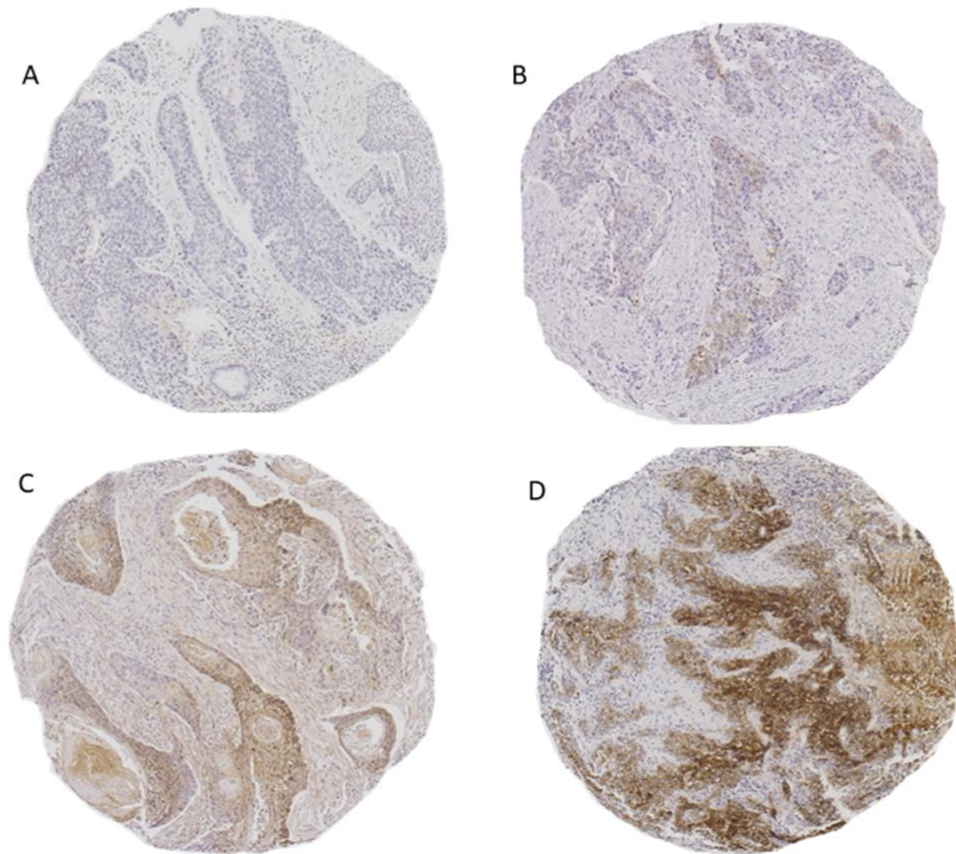


FIGURA 7: Ejemplos de CCECC con tinción negativa y positiva para PD-L1. **A:** Niveles de expresión de PD-L1 negativos (< del 1% de las células), **B:** bajos (1-10%), **C:** intermedios (11-50%); **D:** altos (> del 50%). Magnificación original 20X.

La expresión de PD-1 se correlacionó de forma significativa con PD-L1 TPS (coeficiente de correlación de Spearman = 0,373, $P < 0,001$) y con PD-L1 CPS (coeficiente de correlación de Spearman = 0,288, $P < 0,001$).

En cuanto al infiltrado inmune, el número de linfocitos T infiltrantes (TILs) CD8+ se pudo evaluar en 337 de los 372 casos, mostrando una densidad media de 275 TILs CD8+ por mm^2 (mediana=182, rango 4-2.670/ mm^2). El número de TILs FOXP3+ se evaluó en 338 de los 372 casos observando una menor infiltración de Tregs que TILs CD8+, con una densidad media de 54 por mm^2 (mediana=37, rango 0-321/ mm^2). La ratio

media entre TILs CD8+ y FOXP3+ fue 9,4 (mediana 5,1; rango 0,1-129). En la Figura 8 se muestran ejemplos representativos de una alta y baja infiltración por TILs CD8+ y FOXP3+, respectivamente.

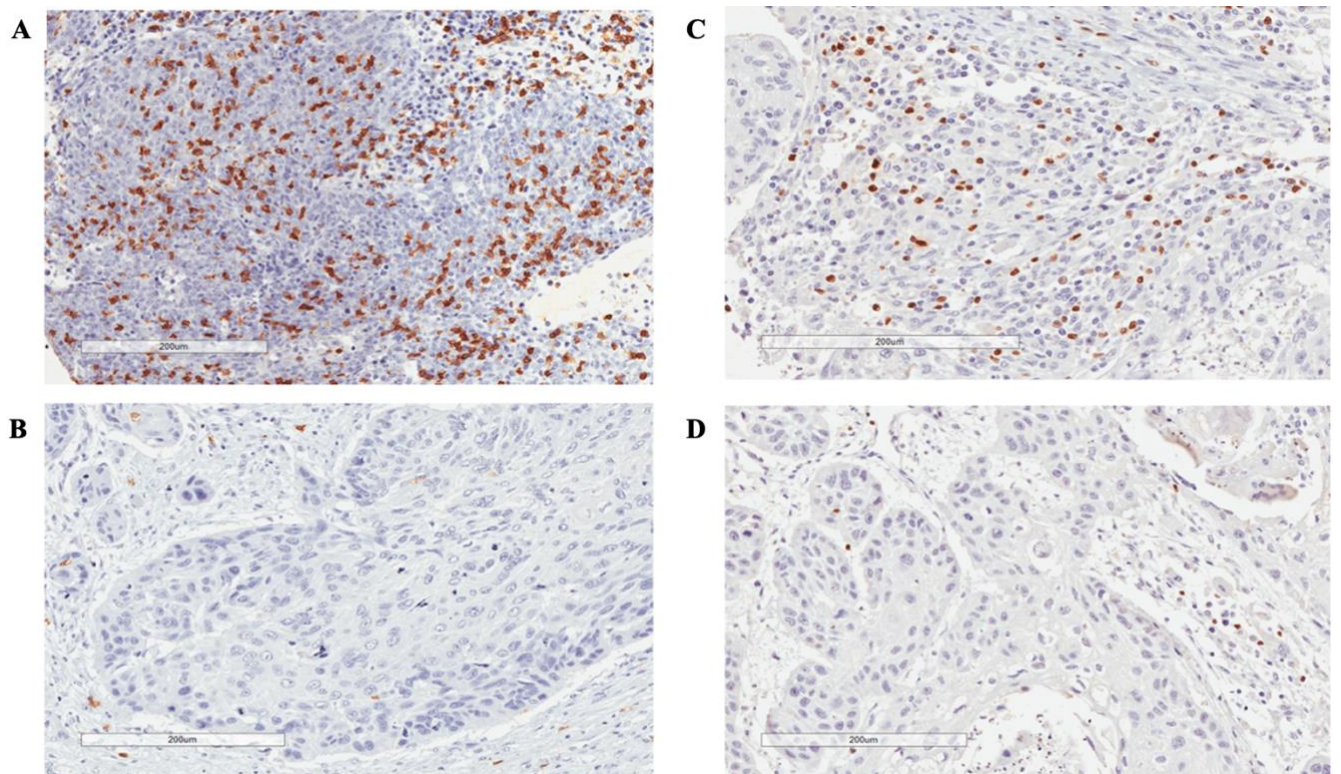


FIGURA 8: Ejemplos de CCECC con alta (A) y baja (B) infiltración por TILs CD8+ y alta (C) y baja (D) infiltración por TILs FOXP3+. Magnificación original 200X.

Se encontró una fuerte correlación positiva entre el número de TILs citotóxicos (CD8+) y reguladores (Tregs, FOXP3+) (coeficiente de correlación de Spearman = 0,473, $P < 0,001$). El número de TILs CD8+ y FOXP3+ también se correlacionó con la expresión de PD-L1 y fue significativamente mayor en los casos positivos para PD-L1, tanto valorado mediante el TPS como el CPS (Figura 9). De forma similar, la infiltración por TILs CD8+ y Tregs FOXP3+ también se correlacionaron significativamente con la

expresión positiva de PD-1 (coeficiente de correlación de Spearman = 0,316, $P < 0,001$, y coeficiente de correlación de Spearman = 0,239, $P < 0,001$, respectivamente).

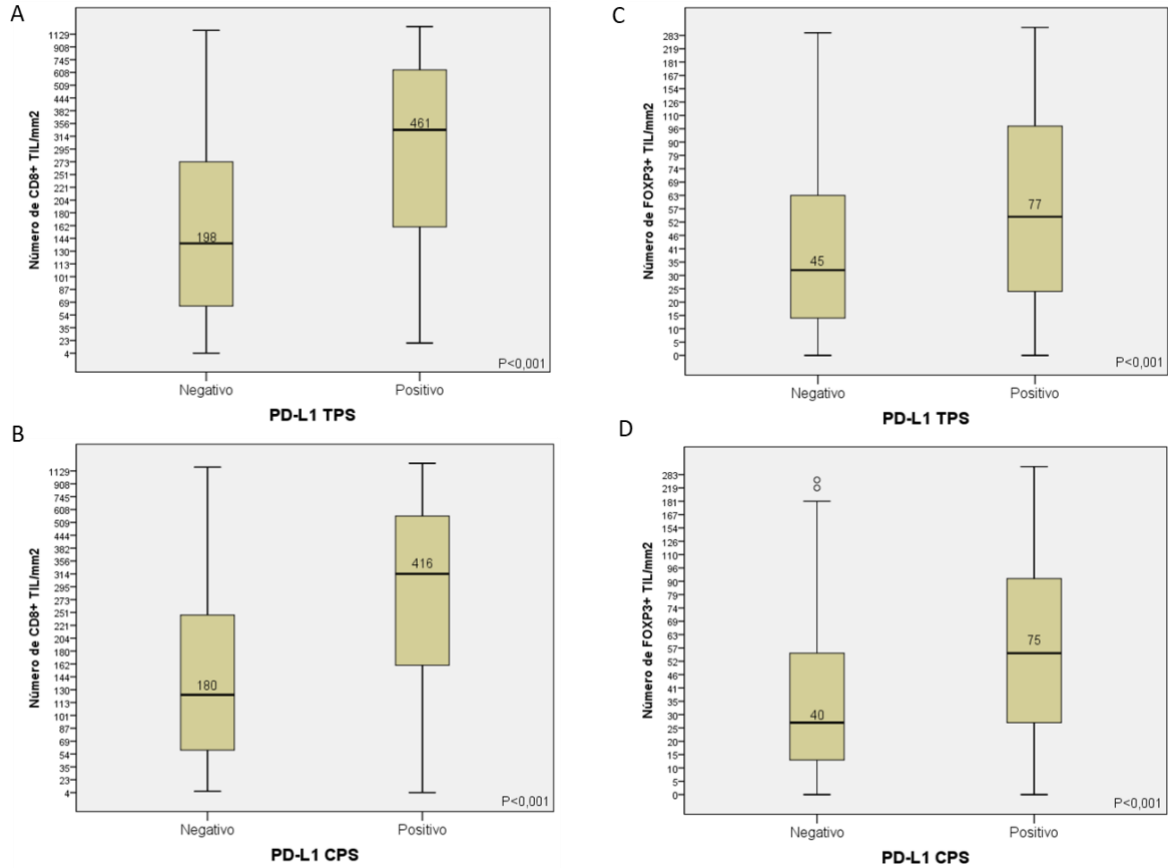


FIGURA 9: Correlación entre PD-L1 TPS, PD-L1 CPS e infiltración por TILs CD8+ (A, B) y Tregs FOXP3+ (C, D). Se muestran los diagramas de cajas con la mediana (línea negra) y los valores medios.

La expresión de PD-L1 por CPS y la infiltración por TILs CD8+ se combinaron para clasificar el microambiente tumoral en 4 subtipos, de acuerdo con lo descrito por Teng y cols¹¹⁰. Tipo I, de respuesta inmune adaptativa, con CPS positiva de PD-L1 y una alta infiltración por TILs CD8+. El tipo I se observó en 67 de 335 casos (20%). Tipo II, de ignorancia inmune, con CPS negativa de PD-L1 y una baja infiltración por TILs CD8+, que se observó en 143 de los 335 casos (43%). Tipo III, de inducción intrínseca, con CPS

positiva de PD-L1 y una baja infiltración por TILs CD8+, que se observó en 30 de los 335 casos (9%). Tipo IV, de tolerancia inmune, con una CPS negativa y una alta infiltración por TILs CD8+, que se observó en 95 de los 335 casos (28%).

4.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LLT1 EN CÉLULAS TUMORALES Y TILS ESTROMALES EN MUESTRAS TISULARES DE CCEO

La tinción de LLT1 se evaluó en 221 (92%) de 241 casos de CCEO HPV-negativos. Las muestras con una inadecuada integridad tisular y/o representatividad del tumor fueron excluidas de la evaluación. Tampoco se incluyeron en el análisis los casos de hipofaringe o laringe por agotamiento de las muestras disponibles en los TMAs.

Del total de 221 casos evaluables, 190 (86%) casos presentaron expresión positiva de LLT1 en las células tumorales: 144 (65%) mostraron expresión débil a moderada y 46 (21%) mostraron expresión fuerte (Figura 10). El epitelio normal de faringe mostró expresión negativa de LLT1, mientras que una expresión fuerte fue observada en TILs con una abundancia variable (Figura 11).

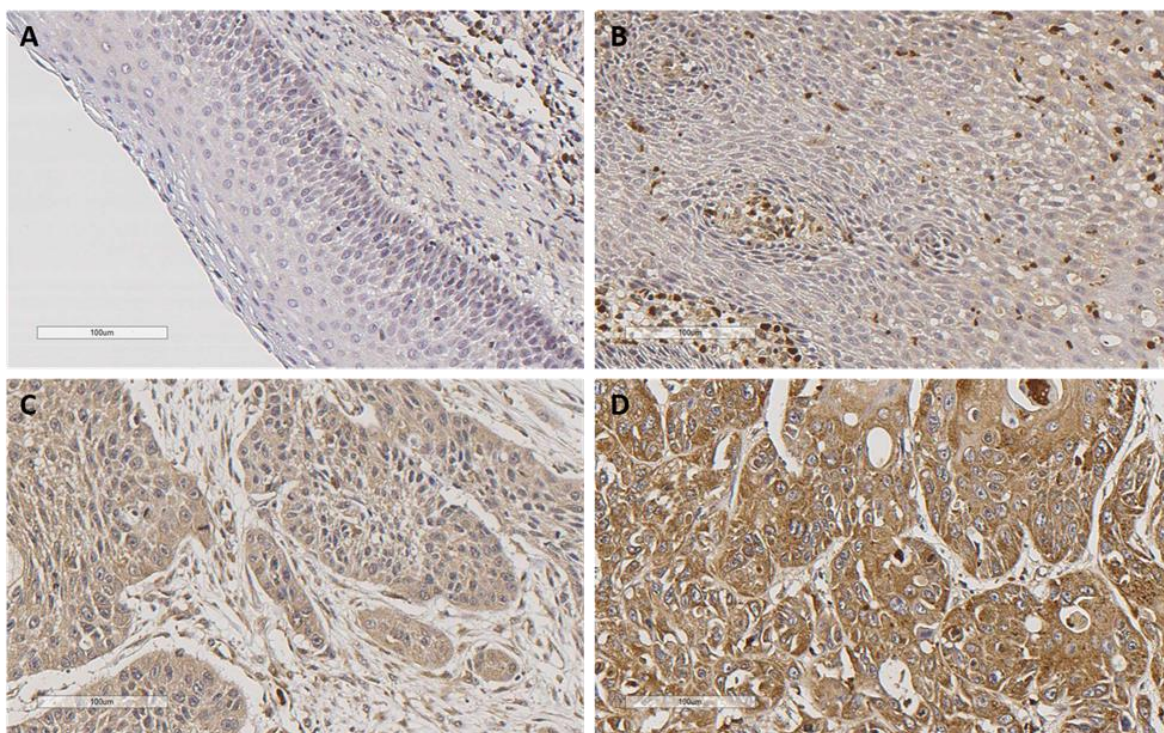


FIGURA 10: Expresión inmunohistoquímica de LLT1 en CCEO. **A:** Expresión de LLT1 negativa en epitelio normal, **B:** tumor con expresión negativa, **C:** tumor con expresión débil-moderada, **D:** tumor con expresión fuerte (> del 50%). Magnificación original 200X.

También se evaluó la expresión estromal de LLT1 en el infiltrado inmune intratumoral. La tinción de LLT1 en los TILs pudo ser valorada en 220 muestras de CCEO HPV-negativos y se correlacionó con la expresión tumoral de LLT1. En la Figura 11 se muestran imágenes representativas de las diferentes puntuaciones de tinción positiva de LLT1 en TILs. 8 tumores mostraron ausencia o expresión esporádica de LLT1 en los TILs (*score* 0), 52 expresión media a moderada de LLT1 (*score* 1), 89 una expresión abundante (*score* 2) y 71 altamente abundante de LLT1 en los TILs (*score* 3). Dicotomizando en alta *versus* baja expresión, 60 (27%) casos mostraron una baja expresión de LLT1 en los TILs y 160 (73%) una alta expresión. La expresión estromal de LLT1 en los TILs no se correlacionó con la expresión tumoral de LLT1 (coeficiente de correlación de Spearman = 0,033, $P = 0,625$).

La expresión tumoral de LLT1 se correlacionaba significativamente con la expresión de PD-L1 TPS (coeficiente de correlación de Spearman = 0,144, $P = 0,032$), pero no con la de PD-L1 CPS (coeficiente de Spearman = 0,103, $P = 0,127$), ni PD-1 (coeficiente de Spearman = 0,132, $P = 0,53$), ni tampoco con la infiltración por linfocitos T citotóxicos CD8+ (coeficiente de Spearman = 0,03, $P = 0,65$) o Tregs FOXP3+ (coeficiente de Spearman = 0,057, $P = 0,4$).

Sin embargo, se encontró una correlación positiva significativa entre la expresión estromal de LLT1 en los TILs y la expresión de PD-L1 TPS (coeficiente de Spearman = 0,168, $P = 0,013$), PD-L1 CPS (coeficiente de Spearman = 0,229, $P = 0,001$), PD-1 (coeficiente de Spearman = 0,178, $P = 0,009$), así como con la infiltración por TILs CD8+ (coeficiente de Spearman = 0,302, $P < 0,001$) y FOXP3+ (coeficiente de Spearman = 0,204, $P = 0,002$).

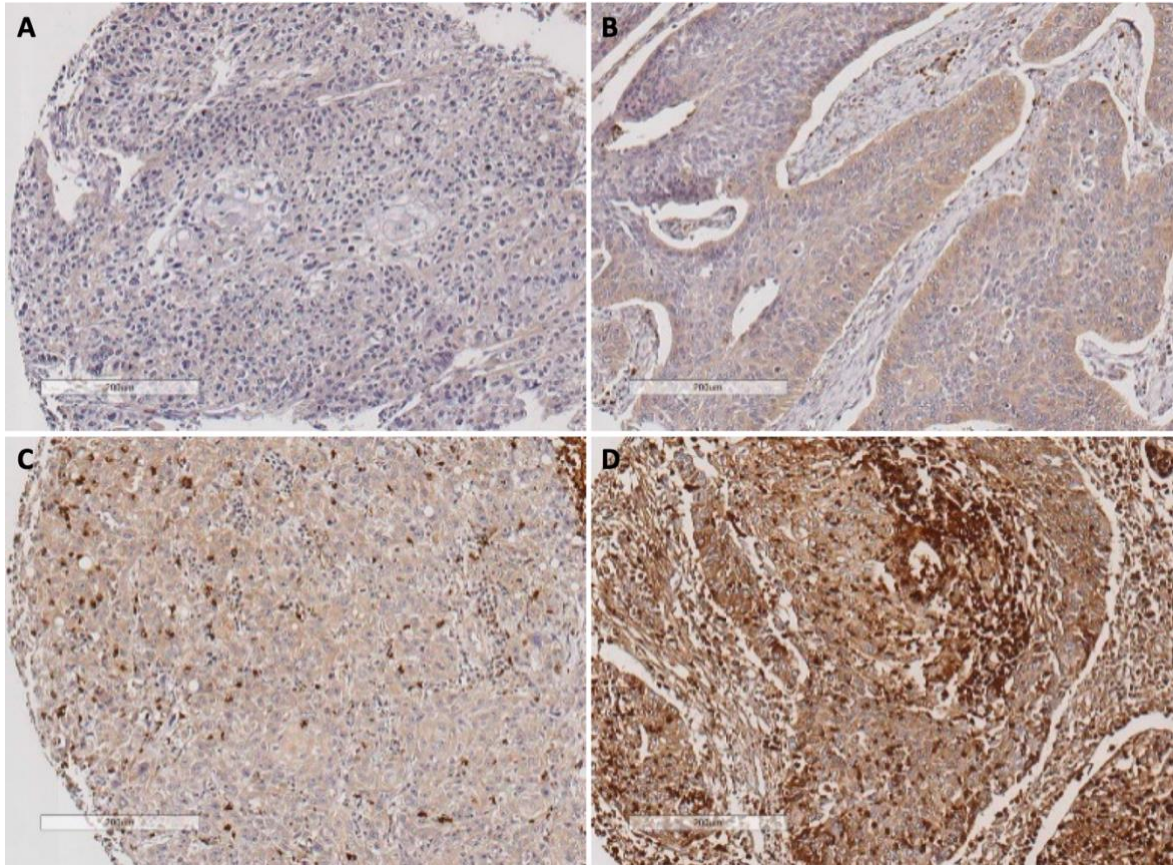


FIGURA 11: Ejemplos representativos de las diferentes densidades de tinción estromal de LLT1. **A:** ausencia de tinción en los TILs, **B:** tinción de densidad moderada, **C:** densidad abundante; **D:** densidad altamente abundante. Magnificación original 200X.

4.3. CORRELACIONES ENTRE LA EXPRESIÓN DE PD-1, PD-L1, LA INFILTRACIÓN POR TILs Y LOS PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS EN CCECC

Se analizaron las posibles correlaciones entre la expresión de PD-L1, PD-1 y la infiltración por TILs citotóxicos (CD8+) y Tregs (FOXP3+) con los parámetros clínico-patológicos (Tabla 2).

La TPS positiva de PD-L1 y la CPS positiva de PD-L1 fueron significativamente menos frecuentes en tumores clasificados como pT4 ($P = 0,033$ y $P = 0,04$, respectivamente) y en tumores en estadio IV ($P = 0,017$ y $P = 0,029$, respectivamente). La CPS positiva de PD-L1 fue más frecuente en tumores sin recurrencia ($P = 0,043$). No se observaron otras correlaciones entre la expresión de PD-L1 y las características clínico-patológicas (Tabla 2).

En paralelo a nuestras observaciones de PD-L1, una alta infiltración por TILs CD8+ fue también significativamente menos frecuente en estadio avanzado IV ($P = 0,03$). Una alta infiltración por Tregs FOXP3+ fue significativamente más frecuente en tumores de localización laríngea CCEL ($P = 0,002$), en comparación a CCEO y CCEH. También encontramos que era más frecuente una alta infiltración por TILs CD8+ y FOXP3+ en tumores no recurrentes, aunque las diferencias no alcanzaron la significación estadística. No se observaron otras correlaciones con otros parámetros clínico-patológicos (Tabla 2).

TABLA 2: Correlación de la expresión de PD-1 y PD-L1 y la infiltración por TILs CD8+ y FOXP3+ con parámetros clínico-patológicos.

Características	TPS positivo PD-L1 (%)	P	CPS positivo PD-L1 (%)	P	PD-1 positivo (%)	P	TILs CD8+ por encima de la mediana (%)	P	TILs FOXP3+ por encima de la mediana (%)	P
Localización										
Orofaringe	69/231 (30)	0,94	89/231 (38)	0,46	107/222 (48)	0,56	110/225 (49)	0,84	96/225 (43)	0,02
Hipofaringe	18/60 (30)		28/59 (47)		23/55 (42)		29/57 (51)		32/57 (56)	
Laringe	16/58 (28)		23/58 (40)		22/42 (54)		25/55 (45)		38/56 (68)	
Clasificación pT										
T1-T2	34/102 (33)	0,033	46/102 (45)	0,04	40/91 (44)	0,77	50/96 (52)	0,45	56/97 (58)	0,44
T3	42/120 (35)		54/119 (45)		53/110 (48)		59/116 (51)		59/116 (51)	
T4	26/127 (20)		39/124 (31)		56/115 (49)		54/122 (44)		50/122 (41)	
Clasificación pN										
N0	31/90 (34)	0,28	40/90 (44)	0,38	36/78 (46)	0,79	47/87 (54)	0,26	44/88 (50)	0,9
N1-3	72/259 (28)		100/258 (39)		116/241 (48)		117/250 (47)		122/250 (49)	
Estadio										
I-II	13/35 (37)	0,017	16/35 (46)	0,029	13/28 (46)	0,079	19/32 (59)	0,03	20/33 (61)	0,15
III	26/61 (43)		33/61 (54)		25/57 (44)		36/59 (61)		33/59 (56)	
IV	64/253 (25)		91/252 (36)		114/234 (49)		109/246 (44)		113/246 (46)	
Grado de diferenciación										
Bien diferenciado	43/137 (31)	0,47	54/138 (39)	0,7	55/125 (44)	0,35	65/134 8	0,25	58/135 (43)	0,18
Moderadamente diferenciado	36/139 (26)		54/139 (39)		67/128 (52)		61/138 (44)		75/140 (54)	
Pobremente diferenciado	24/73 (33)		32/72 (42)		31/70 (44)		40/71 (56)		37/71 (52)	
Recurrencia										
No	45/133 (34)	0,18	63/133 (47)	0,043	58/117 (50)	0,64	69/127 (54)	0,11	71/128 (56)	0,07
Si	58/216 (27)		67/215 (36)		94/202 (46)		95/210 (45)		95/210 (45)	
Total	103/349 (29,5)		130/348 (37)		152/319 (47,5)		164/337 (49)		166/338 (49)	

4.4. CORRELACIONES DE LA EXPRESIÓN TUMORAL Y ESTROMAL DE LLT1 EN TILs CON PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS EN CCEO

Como se indicó anteriormente, la expresión de LLT1 sólo se evaluó en el subgrupo de 221 pacientes con CCEO VPH-negativos. Las correlaciones con los parámetros clínico-patológicos se muestran en la Tabla 3. La expresión positiva de LLT1 en las células tumorales era más frecuente en los pacientes con recurrencia tumoral y en pacientes muertos por tumor, aunque las diferencias no alcanzaron la significación estadística ($P = 0,1$). No se observaron otras correlaciones de la expresión tumoral de LLT1 con las características clínico-patológicas.

En cuanto a la expresión estromal de LLT1, una alta expresión de LLT1 en los TILs se asoció significativamente con una menor tasa de recurrencias tumorales ($P = 0,001$) y menor mortalidad por el tumor ($P = 0,005$), no habiendo asociación con la clasificación TNM, estadio ni grado de diferenciación tumoral (Tabla 3).

TABLA 3: Correlación de la expresión tumoral y estromal de LLT1 con parámetros clínico-patológicos en CCEO VPH-negativos.

Características	Expresión positiva de LLT1 en células tumorales (%)	P	Expresión alta de LLT1 en TILs (%)	P
Localización		0,79		1
Amigdalas	87/102 (85,3%)		75/102 (73%)	
Base de la lengua	103/119 (86,6%)		85/119 (71%)	
Clasificación pT		0,43		0,46
T1	11/12 (92%)		9/12 (75%)	
T2	43/53 (81%)		42/53 (78%)	
T3	64/77 (83%)		51/77 (66%)	
T4	72/79 (91%)		58/79 (73%)	
Clasificación pN		0,99		0,239
N0	45/52 (86%)		42/52 (81%)	
N1	24/28 (86%)		23/28 (82%)	
N2	94/110 (85%)		76/110 (69%)	
N3	27/31 (87%)		19/31 (61%)	
Estadio		0,3		0,264
I	2/2 (100%)		2/2 (100%)	
II	13/18 (72%)		17/18 (94%)	
III	32/38 (84%)		28/38 (74%)	
IV	143/163 (88%)		113/163 (69%)	
Recurrencia tumoral		0,1		0,001
No	69/85 (81%)		71/85 (83%)	
Si	121/136 (89%)		89/136 (65%)	
Grado de diferenciación		0,64		0,82
Bien diferenciado	87/99 (88%)		71/99 (71%)	
Moderadamente dif.	69/83 (83%)		60/83 (72%)	
Pobremente dif.	34/39 (87%)		29/39 (74%)	
Estatus		0,1		0,005
Vivo	36/48 (75%)		38/48 (79%)	
Muerto por tumor	110/123 (89%)		79/123 (64%)	
Muerto por otra causa	44/50 (88%)		38/50 (76%)	
Total	190/221 (86%)		160/221 (73%)	

4.5. IMPACTO DE LA EXPRESIÓN DE PD-1 Y PD-L1 E INFILTRACIÓN POR TILS EN LA SUPERVIVENCIA DEL CCECC

Los pacientes con tumores que mostraban una TPS o CPS positiva de PD-L1 presentaron de forma significativa y concordante una mayor supervivencia específica de enfermedad (SEE) y una mayor supervivencia global (SG) (Figura 12).

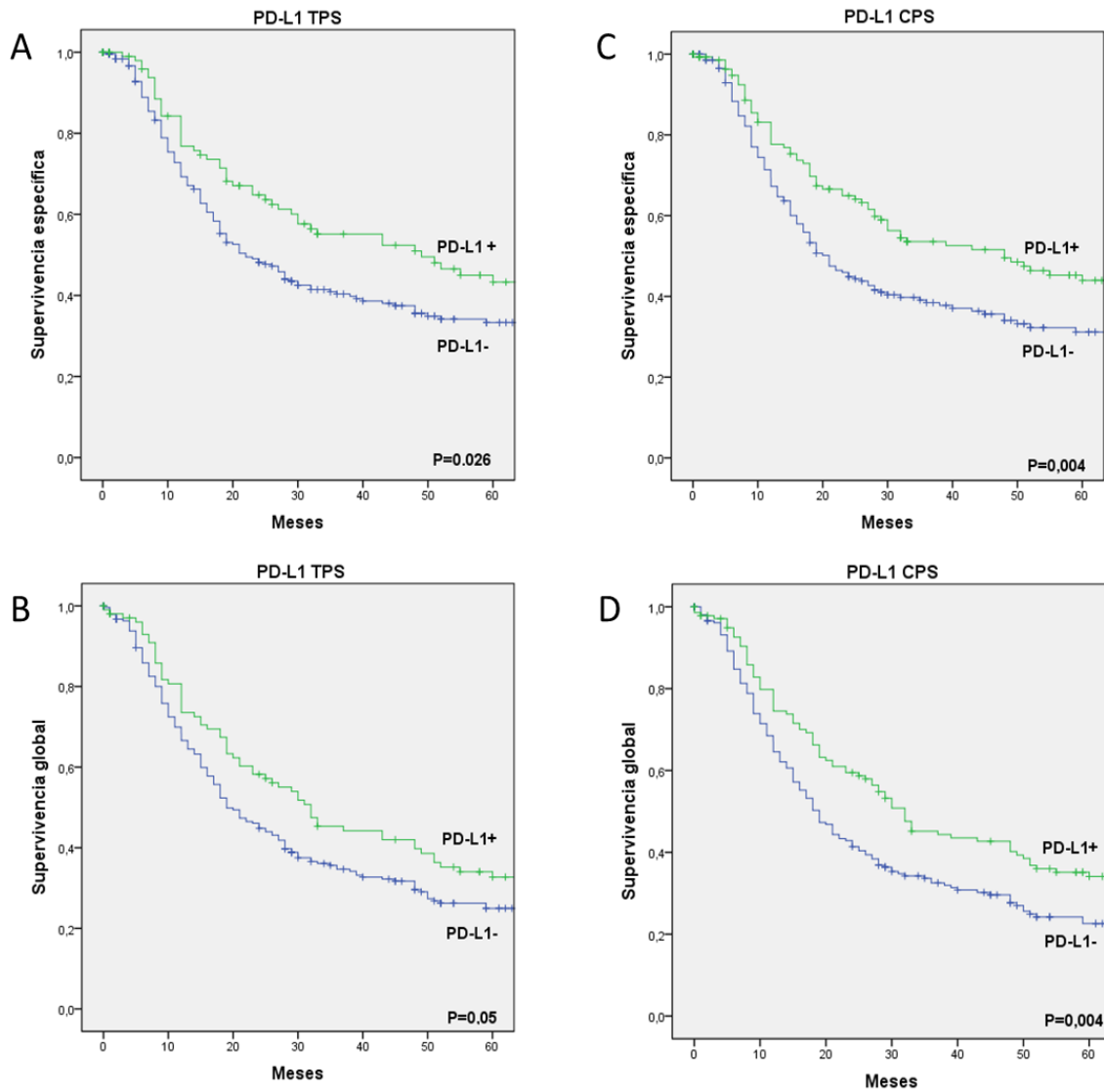


FIGURA 12: Supervivencia específica de enfermedad y supervivencia global de acuerdo con TPS (A, B) o CPS (C, D) de PD-L1.

Aunque la expresión de PD-L1 dicotomizada como positiva *versus* negativa se correlacionó significativamente con una mejor supervivencia de los pacientes, no se

encontró una asociación significativa entre los diferentes niveles de expresión tumoral de PD-L1 y la supervivencia ($P = 0,13$ para la SEE y $P = 0,24$ para la SG; Figura 13).

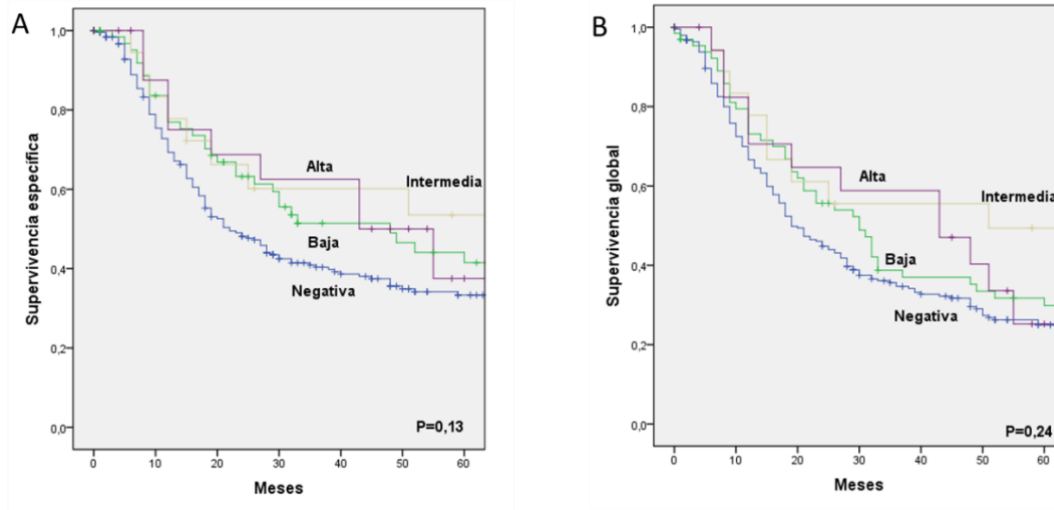


FIGURA 13: Supervivencia específica de enfermedad (A) y supervivencia global (B) en función de los diferentes niveles de expresión de PD-L1 (CPS).

La expresión de PD-1 en las células inmunes no mostró asociación con la supervivencia de los pacientes (Figura 14).

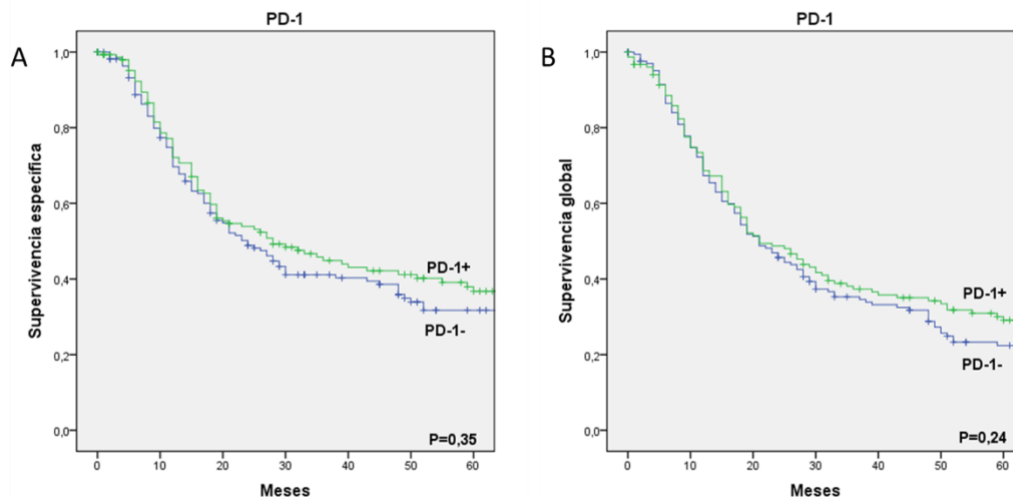


FIGURA 14: Supervivencia específica de enfermedad (A) y supervivencia global (B) en función de la expresión de PD-1.

Respecto a la infiltración por linfocitos T citotóxicos (CD8+) y Tregs (FOXP3+), los pacientes con una alta densidad de infiltración por ambos tipos de linfocitos también mostraron de forma significativa una mejor SEE y SG (Figura 15).

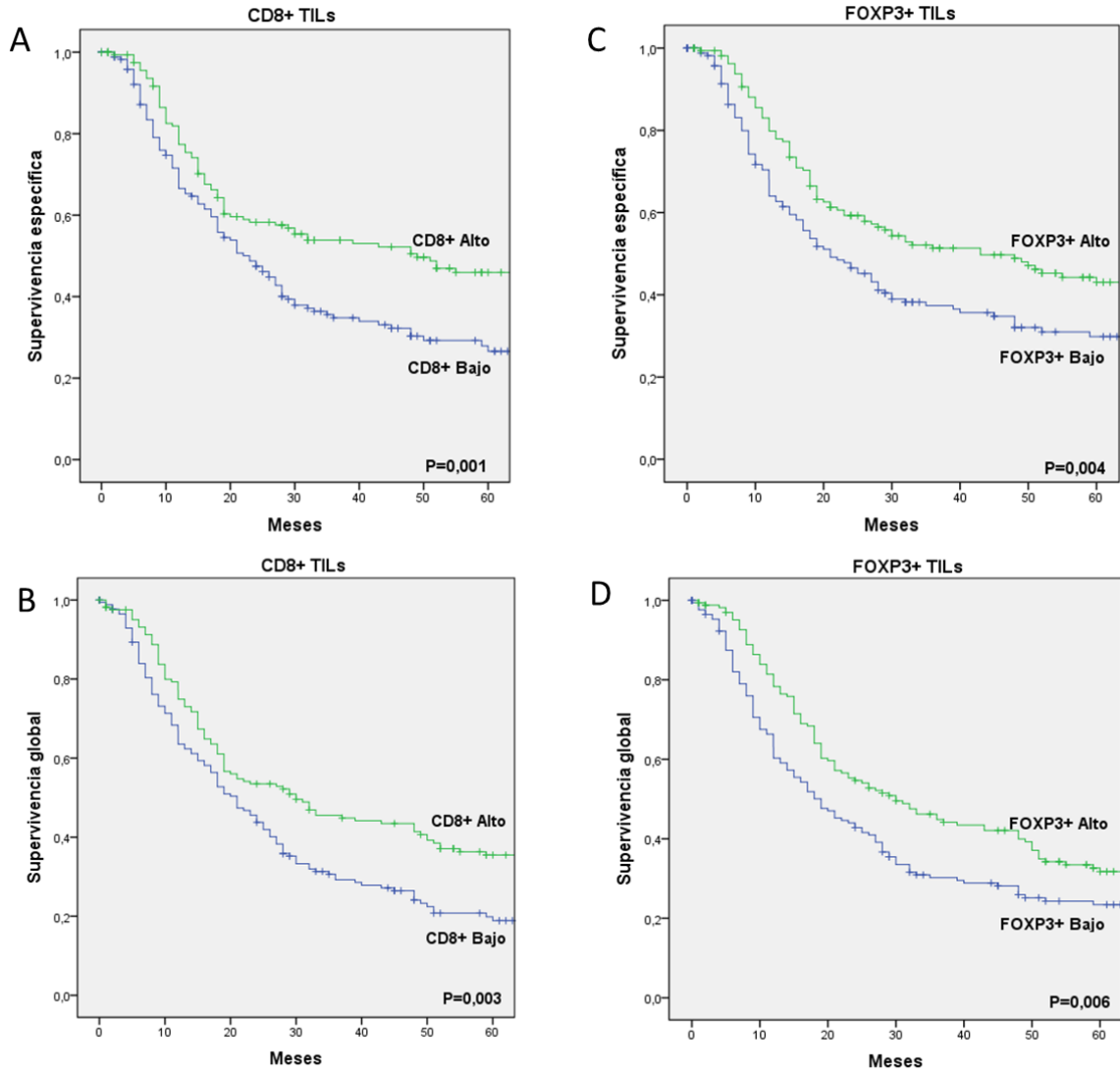


FIGURA 15: Supervivencia específica de enfermedad y supervivencia global de acuerdo con la densidad de infiltración por TILs CD8+ (**A, B**) y TILs FOXP3+ (**C, D**).

La ratio entre los TILs CD8+ y FOXP3+ (usando como punto de corte la mediana de esta ratio) no tuvo influencia en el pronóstico ($P = 0,84$ para la SEE y $P = 0,78$ para la SG). Además, una alta infiltración por TILs CD8+ se asoció significativamente con un mejor pronóstico independientemente de los niveles de TILs FOXP3+ ($P = 0,009$ para la SEE y $P = 0,007$ para la SG; Figura 16).

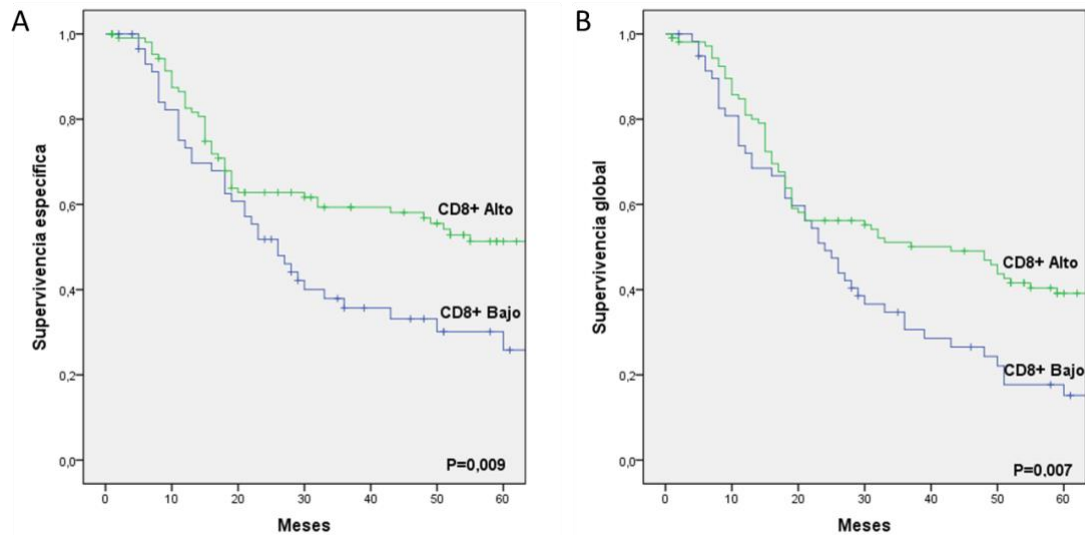


FIGURA 16: Supervivencia específica de enfermedad (A) y supervivencia global (B) en función de la infiltración por TILs CD8+ en el grupo de pacientes con alta densidad de infiltración por TILs FOXP3+.

De acuerdo con el fenotipo del microambiente tumoral, el subgrupo de pacientes con CCECC clasificado como tipo I (PD-L1 CPS positivo / alta densidad de CD8+) mostraron la mayor SEE a 5 años (53%), seguido por el tipo IV (PD-L1 CPS negativo / alta densidad de CD8+) con una SEE a 5 años de 48%, el tipo III (PD-L1 CPS positivo / baja densidad de CD8+) con una SEE a 5 años de 30 % y por último el tipo II (PD-L1 CPS negativo / baja densidad de CD8+) con una SEE a 5 años de 26% ($P = 0.008$; Figura 17). De acuerdo con estos resultados, los pacientes con una alta infiltración por TILs CD8+ presentan claramente un mejor pronóstico independientemente del estatus PD-L1. Sin embargo, entre los pacientes con baja infiltración por TILs CD8+, aquellos con una expresión positiva de PD-L1 muestran un mejor pronóstico.

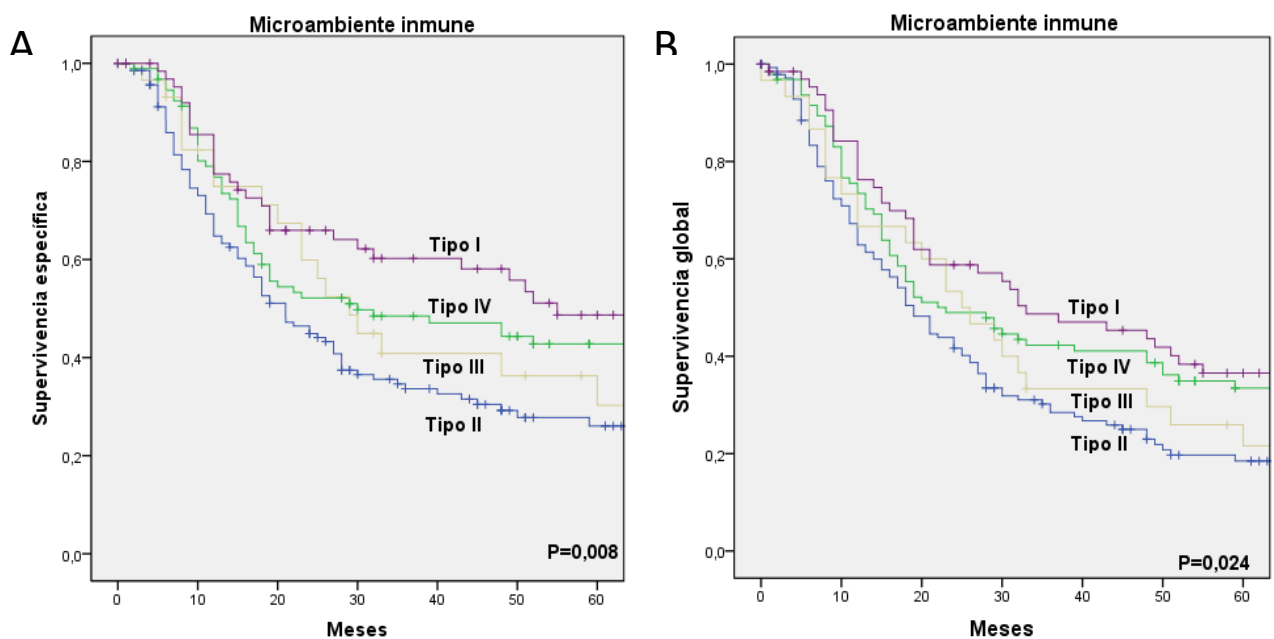


FIGURA 17: Supervivencia específica de enfermedad (**A**) y supervivencia global (**B**) en función del tipo de microambiente inmune.

El análisis multivariante realizado incluyendo la localización del tumor, la clasificación pT, la clasificación pN, el grado de diferenciación, el CPS de PD-L1, la expresión de PD-1, la densidad de TILs CD8+ y la densidad de TILs FOXP3+, mostró que los parámetros asociados de forma independiente con una peor SEE fueron: una clasificación pT4 (HR= 1,56, IC 95% = 1,16-2,1, $P = 0,003$), una clasificación pN+ (HR= 2,27, IC 95% = 1,51-3,42, $P < 0,001$) y una baja infiltración por TILs CD8+ (HR= 1,6, IC 95% = 1,19-2,16, $P = 0,002$). Los mismos parámetros fueron asociados de forma independiente con una peor SG: una clasificación pT4 (HR= 1,61, IC 95% = 1,24-2,10, $P = 0,003$), una clasificación pN+ (HR= 1,84, IC 95% = 1,33-2,56, $P < 0,001$) y una baja infiltración por TILs CD8+ (HR= 1,45, IC 95% = 1,12-1,89, $P = 0,005$).

El impacto del perfil inmune en el curso de la enfermedad también fue analizado por separado en cada sitio anatómico (Tabla 4). El CPS positivo para PD-L1 se asoció con una mejor SEE y SG en orofaringe, hipofaringe y laringe, aunque las diferencias solo fueron significativas en la orofaringe, probablemente debido al bajo número de casos en las otras localizaciones. Una alta infiltración por TILs CD8+ se asociaba con una mejor SEE y SG en todas las localizaciones, siendo las diferencias estadísticamente significativas en orofaringe e hipofaringe. Una alta infiltración por TILs FOXP3+ también se asoció con una mejor SEE y SG en todas las localizaciones, si bien no alcanzó significación estadística. En contraste, la expresión positiva de PD-1 se asociaba con una mejor SEE y SG en orofaringe (aunque no estadísticamente significativa) y con una peor SEE y SG en hipofaringe y laringe, aunque las diferencias sólo fueron significativas en el subgrupo de hipofaringe.

TABLA 4: Supervivencia específica de enfermedad (SEE) y supervivencia global (SG) a 5 años, según la expresión de PD-L1 y PD-1 e infiltración por TILs CD8+ y FOXP3+ en las diferentes localizaciones.

	Orofaringe		Hipofaringe		Laringe	
	SEE	SG	SEE	SG	SEE	SG
CPS PD-L1						
Positivo	40%	29%	35%	27%	65%	58%
Negativo	34%	22%	18%	16%	41%	36%
HR (IC 95%)	0,67 (0,46-0,97)	0,71 (0,52-0,98)	0,87 (0,46-1,6)	0,81 (0,45-1,45)	0,44 (0,19-1,02)	0,49 (0,23-1,04)
<i>P</i>	0,035	0,038	0,66	0,48	0,056	0,06
Expresión PD-1						
Positivo	39%	29%	18%	16%	39%	36%
Negativo	31%	20%	25%	21%	51%	45%
HR (IC 95%)	0,72 (0,5-1,02)	0,75 (0,55-1,02)	1,89 (1,02-3,5)	1,59 (0,87-2,87)	1,2 (0,5-2,85)	1,15 (0,5-2,63)
<i>P</i>	0,07	0,07	0,04	0,13	0,68	0,73
TILs CD8+						
Alto	44%	31%	43%	34%	59%	54%
Bajo	28%	17%	10%	10%	42%	33%
HR (IC 95%)	0,62 (0,43-0,88)	0,67 (0,49-0,91)	0,49 (0,26-0,92)	0,57 (0,31-1,04)	0,74 (0,34-1,62)	0,72 (0,35-1,58)
<i>P</i>	0,008	0,011	0,027	0,06	0,46	0,38
TILs FOXP3+						
Alto	40%	26%	35%	32%	57%	45%
Bajo	32%	24%	14%	11%	42%	40%
HR (IC 95%)	0,72 (0,5-1,02)	0,78 (0,57-1,05)	0,63 (0,34-1,16)	0,63 (0,35-1,11)	0,64 (0,29-1,42)	0,87 (0,41-1,84)
<i>P</i>	0,068	0,11	0,14	0,11	0,28	0,72

HR: razón de riesgos

4.6. CORRELACIÓN DE LA EXPRESIÓN TUMORAL Y ESTROMAL DE LLT1 CON LA SUPERVIVENCIA EN PACIENTES CON CCEO

Los pacientes con expresión tumoral de LLT1 mostraron significativamente una peor SEE ($P = 0,049$, test log-rank) y peor SG ($P = 0,036$, test log-rank) (Figura 18). No se hallaron diferencias significativas entre los diferentes niveles de expresión de LLT1 (Figura 19).

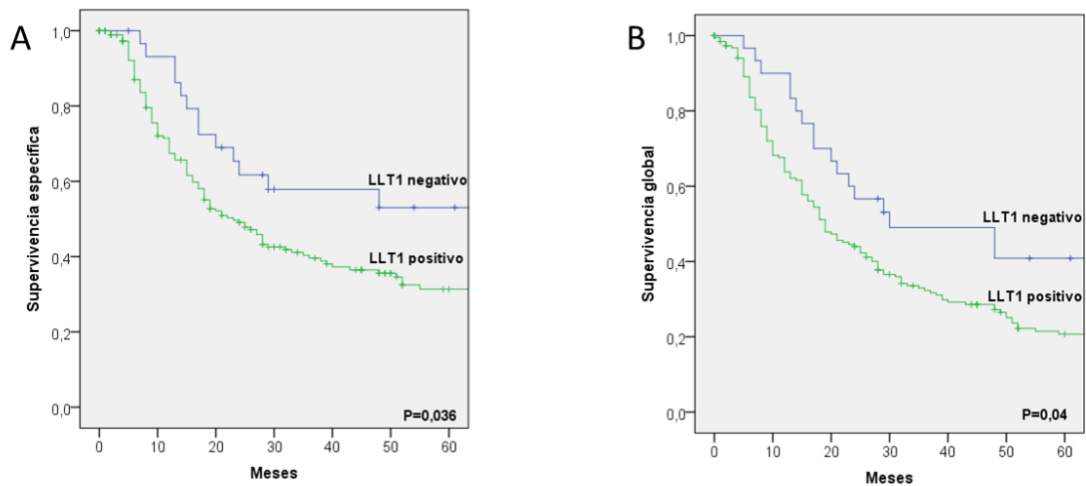


FIGURA 18: Supervivencia específica de enfermedad (A) y global (B) en función de la expresión de LLT1 en las células tumorales

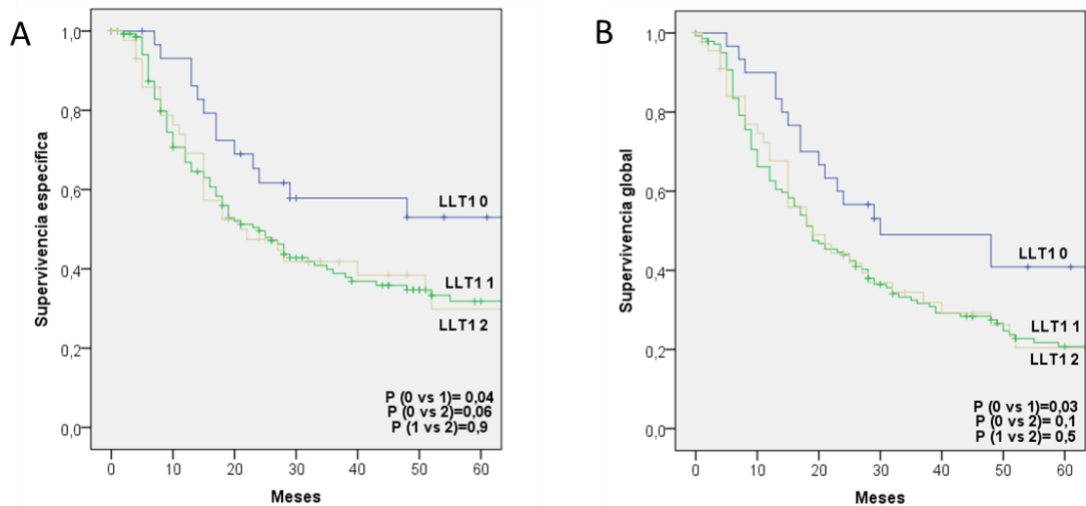


FIGURA 19: Supervivencia específica de enfermedad (A) y global (B) en función de los diferentes niveles de expresión tumoral de LLT1, valores 0, 1 y 2.

En cuanto a la expresión estromal de LLT1, los pacientes con tumores con una alta infiltración por TILs LLT1+ mostraron de forma significativa una mayor SEE ($P < 0,001$, test log-rank) y una mayor SG ($P = 0,007$, test log-rank) (Figura 20).

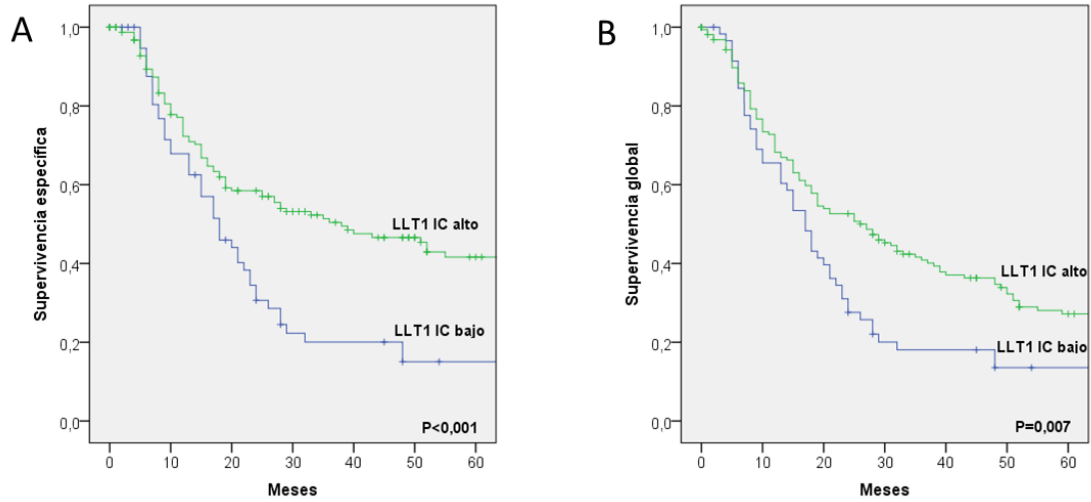


FIGURA 20: Supervivencia específica de enfermedad (A) y global (B) en función de la infiltración por linfocitos positivos para LLT1 (LLT1 IC).

El siguiente paso fue evaluar el impacto en el pronóstico de la combinación de la expresión tumoral de LLT1 y la expresión estromal de LLT1 en los TILs. Los pacientes con tumores con una expresión negativa de LLT1 y alta infiltración por TILs LLT1+ (LLT1tum-/LLT1 IC alto) mostraron el mejor pronóstico, mientras aquellos que mostraron una expresión positiva de LLT1 y baja infiltración por TILs LLT1+ (LLT1tum+/LLT1 IC bajo) mostraron el peor pronóstico, y otras combinaciones mostraron cifras intermedias de supervivencia ($P < 0,001$ para SEE y $P = 0,003$ para SG, test log-rank) (Figura 21).

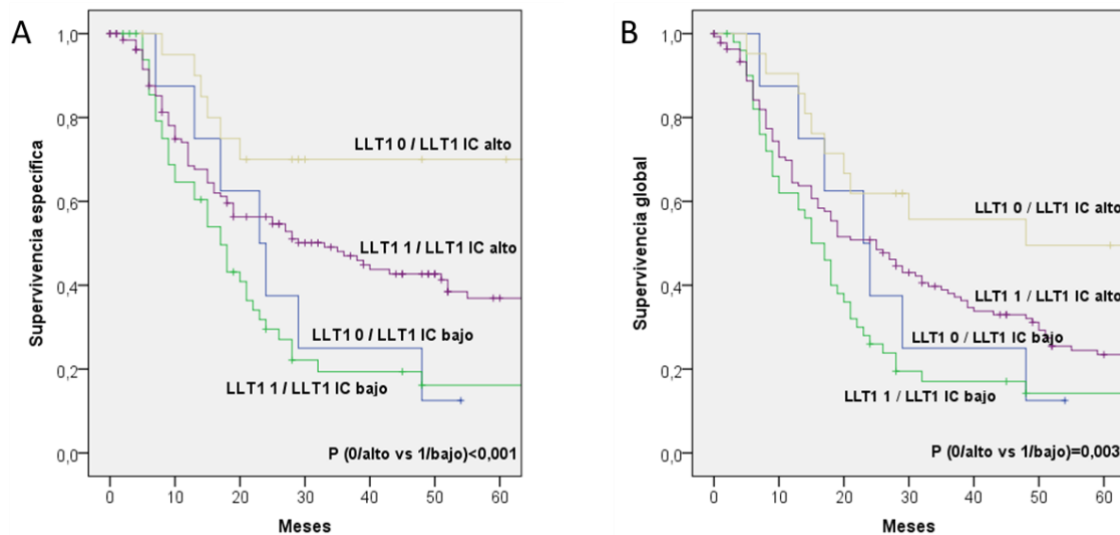


FIGURA 21: Supervivencia específica para enfermedad (A) y supervivencia global (B) en función de la expresión combinada de LLT1 en las células tumorales y la infiltración por linfocitos LLT1 positivos (LLT1 IC).

El análisis multivariante de Cox incluyendo la clasificación pT (T1-T2 vs T3-T4), la clasificación pN (N0 vs N+), el grado de diferenciación, la expresión tumoral de LLT1 (positiva vs negativa) y la infiltración por TILs LLT1+ (baja vs alta) mostró que los parámetros independientes asociados con una peor SEE fueron la clasificación T3-T4 (HR = 1,56, 95% CI = 1,04–2,33, $P = 0,029$), la clasificación N+ (HR = 2,08, 95% CI = 1,28–3,37, $P = 0,003$), la expresión tumoral positiva de LLT1 (HR = 1,79, 95% CI = 1,01–3,19, $P = 0,04$), y una baja infiltración por TILs LLT1+ (HR = 1,75, 95% CI = 1,21–2,53, $P = 0,003$). De forma análoga, los parámetros independientemente asociados con una peor SG fueron: la clasificación T3-T4 (HR = 1,51, 95% CI = 1,07–2,11, $P = 0,017$), la clasificación N+ (HR = 1,68, 95% CI = 1,15–2,46, $P = 0,007$), y una baja infiltración por TILs LLT1+ (HR = 1,45, 95% CI = 1,03–2,03, $P = 0,031$).

5. DISCUSIÓN

En nuestro estudio hemos seleccionado una amplia serie homogénea de pacientes con CCECC tratados quirúrgicamente y con estatus VPH negativo para darle mayor consistencia a los resultados. En esta serie hemos realizado un análisis de la expresión de PD-L1 tanto tumoral como en las células inmunes estromales usando puntos de corte recomendados por las guías recientes³², y hemos tenido en cuenta la relación entre la expresión de PD-L1, PD-1 y la presencia de TILs citotóxicos y reguladores en el microambiente tumoral. Además, analizamos el impacto en el pronóstico de la combinación de la expresión de PD-L1 junto con la infiltración por TILs en los CCECC, según lo descrito en otras localizaciones¹¹⁰. Esto nos ha permitido establecer robustas conclusiones sobre el valor pronóstico de estos marcadores.

Por otro lado, en esta tesis hemos evaluado por primera vez la expresión tumoral y estromal de LLT1 en el tumor y los TILs, respectivamente. Se ha seleccionado una cohorte homogénea de 249 pacientes con CCEO tratados quirúrgicamente y con estatus VPH negativo y analizado su posible impacto pronóstico y relevancia clínica.

El presente estudio reúne una serie de características destacables tales como una adecuada selección de casos evitando la influencia de variables no contraladas (estatus VPH, sitio del tumor primario y diferentes regímenes de tratamiento), un amplio tamaño muestral y el análisis combinado de varios componentes clave del microambiente tumoral en el contexto del CCECC, como la expresión de PD-1 y PD-L1, la expresión tumoral y estromal de LLT1, junto con la infiltración por TILs CD8+ y FoxP3. Sin embargo, este estudio también tiene algunas limitaciones. Primero, existen sesgos potenciales debido a la naturaleza retrospectiva del estudio. Segundo, hemos usado TMAs y dado que la expresión de PD-L1, PD-1 y LLT1 y la infiltración por TILs es heterogénea, nuestra valoración de las tres áreas representativas puede no reflejar la situación del tumor en su totalidad. Sin embargo, hemos observado que la expresión fue altamente concordante

entre las tres áreas seleccionadas y evaluadas para cada tumor. Incluso en casos de análisis de secciones histológicas diagnósticas, esta heterogeneidad puede influir también en la puntuación. Tercero, este estudio se realizó en un único centro. Y cuarto, ayudaría a la robustez de nuestro estudio realizar un análisis en paralelo en una segunda cohorte independiente como grupo de validación de la hipótesis generada.

5.1. RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PD-1 Y PD-L1 CON LA SUPERVIVENCIA EN CCECC

La expresión de PD-L1 por las células tumorales ha sido identificada como un mecanismo de evasión del sistema inmune¹²⁴. Algunos artículos han identificado la expresión de PD-L1 como factor pronóstico negativo en algunos tipos de cáncer, mientras que otros lo han relacionado con un mejor pronóstico^{125, 126}. De forma análoga, en el contexto de los CCECC ocurre algo similar, con dos meta-análisis que no han podido demostrar una clara asociación de la expresión de PD-L1 con el pronóstico^{115,116}. De esta forma, se han obtenido resultados diferentes de la expresión de PD-L1 en relación con el impacto, tanto positivo como negativo. Estas discrepancias pueden ser atribuidas a diferencias metodológicas como el uso de diferentes anticuerpos, puntos de corte variables de la positividad de PD-L1, diferentes sistemas de puntuación aplicados (incluyendo o no a las células inmunes) y la inclusión en los estudios de cohortes heterogéneas de pacientes con diferente estatus VPH y diferentes tratamientos. Además, esta variabilidad pronóstica podría reflejar también un alto nivel de complejidad y heterogeneidad de la comunicación entre el tumor y el estroma, y las interacciones entre la expresión tumoral de PD-L1 y otras células inmunes del microambiente tumoral. Teniendo todo esto en cuenta, en nuestra serie hemos observado que una expresión positiva de PD-L1 (especialmente empleando la cuantificación mediante CPS) se asociaba con mejores cifras de supervivencia entre los pacientes tratados quirúrgicamente de un CCECC. Esta asociación fue consistentemente observada en todas las localizaciones, aunque solo alcanzó significación estadística en la orofaringe, probablemente debido a un menor tamaño muestral en la hipofaringe y laringe.

La expresión de PD-1 en las células T tiene una función inhibidora frente a los linfocitos T efectoras y la expresión de PD-1 está aumentada en linfocitos T exhaustos,

sugiriendo un valor pronóstico negativo. Sin embargo, la expresión positiva de PD-1 no se correlacionó con un peor pronóstico en nuestra cohorte de pacientes. De hecho, en otros estudios de CCECC se ha encontrado una relación entre una alta expresión de PD-1 en células inmunes, con un mejor pronóstico^{127,128,129}. Para explicar este mejor pronóstico de una alta expresión de PD-1, los autores sugieren que el incremento de la expresión de PD-1 puede aumentar en el contexto de una estimulación inmune específica de antígenos.

5.2. RELACIÓN DE LA INFILTRACIÓN POR TILS CON LA SUPERVIVENCIA EN CCECC

*Schneider et al.*¹²⁷ analizaron la expresión de PD-L1 y PD-1 en TILs en una serie de pacientes tratados quirúrgicamente de un CCECC. Estos autores mostraron que la expresión de PD-L1 en el total de la serie no se correlacionó con la supervivencia, aunque se apreció una tendencia a un mejor pronóstico entre los casos con expresión positiva, tal como muestran los resultados de este trabajo. En cambio, encontraron que la expresión de PD-L1 se asociaba con un peor pronóstico en el subgrupo de pacientes con carcinoma oral, sugiriendo una influencia del sitio del tumor con la significación pronóstica de PD-L1. Altos niveles de TILs PD-1 positivos se asociaban con un mejor pronóstico en este estudio, aunque esto puede reflejar una mayor infiltración general/global por TILs. En relación con esto, una alta densidad de TILs, tanto citotóxicos (CD8+) como Tregs (FOXP3+), también estaba asociada con una mayor supervivencia en nuestro estudio. Sin embargo, los análisis multivariantes mostraron que el único parámetro inmunológico independiente asociado significativamente con una mejor SEE y SG fue una mayor densidad de TILs CD8+. Los linfocitos T CD8+ son predominantemente linfocitos T citotóxicos, elemento crucial del sistema inmune celular que es esencial en las respuestas inmunes antitumorales mediadas por células.

*De Ruiter y cols.*⁷⁵ en un reciente meta-análisis correlacionaron de forma consistente una alta infiltración por linfocitos T CD8+ con un mejor pronóstico en los CCECC. Además, casi todos los estudios que evalúan el valor pronóstico de TILs CD8+ describen una asociación entre una elevada densidad de células T CD8+ y un mejor pronóstico en pacientes con CCECC, independientemente del estatus VPH.

5.3. RELACIÓN DE LA COMBINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PD-L1 E INFILTRACIÓN POR TILs CON LA SUPERVIVENCIA EN CCECC

Nuestros resultados muestran que la expresión positiva de PD-L1 (cuantificada tanto mediante TPS como CPS) y una alta densidad de TILs FoxP3+ se correlacionaba fuertemente con una alta densidad de TILs CD8+. Esto puede ser la posible explicación a la asociación observada de estos dos parámetros (PD-L1 e infiltración por TILs FoxP3+) con una mayor supervivencia, tal como se aprecia en los análisis univariantes.

Nuestros hallazgos son consistentes con varios estudios en CCECC^{123,130} y en otras localizaciones tumorales^{131,132,133} que muestran la asociación de la expresión de PD-L1 con niveles aumentados de la infiltración por TILs y un mejor pronóstico de los pacientes. De esta forma, la expresión de PD-L1 puede ser un marcador subrogado de respuestas inmunes antitumorales, explicando así la asociación poco esperada con un mejor pronóstico en algunos tumores.

PD-L1 no se expresa generalmente en tejidos normales, pero las citoquinas inflamatorias, particularmente el IFN- γ , pueden aumentar su expresión en diferentes tipos celulares, incluyendo las células tumorales. Esto indica que los tumores pueden aumentar la expresión de PD-L1 en respuesta a la liberación de IFN- γ por TILs como un mecanismo de resistencia inmune adaptativo para suprimir la función local de los linfocitos T, sugiriendo que la inmunovigilancia existe incluso en estadios avanzados del cáncer^{106,110}. Sin embargo, PD-L1 también puede ser constitutivamente expresado en tumores sin TILs a través de vías intrínsecas oncogénicas¹³⁴.

Basado en la combinación de la expresión de PD-L1 y la densidad de TILs, se ha propuesto una clasificación de los tumores en cuatro grupos¹¹⁰. El tipo I está caracterizado por la positividad de PD-L1 con una alta densidad de TILs llevando a una resistencia inmune adaptativa; los pacientes de tipo I es más probable que se puedan beneficiar de

inmunoterapia con el bloqueo PD-1/PD-L1. El tipo II tiene una expresión negativa de PD-L1 con una ausencia de TILs indicando ignorancia inmune. El tipo III tiene expresión positiva de PD-L1 con una ausencia de TILs indicando inducción de PD-L1 por vías oncogénicas intrínsecas. Y el tipo IV está caracterizado por una expresión negativa de PD-L1 con una alta densidad de TILs indicando tolerancia inmune, y en este caso la supresión de la inmunidad se supone controlada por otros supresores en lugar del eje PD-1/PD-L1. En el melanoma humano (donde estos datos están más avanzados), el tipo I (38%) y el tipo II (41%) son los predominantes en el tumor, con el tipo I teniendo el mejor pronóstico¹¹⁰. El uso de esta clasificación no está disponible en la mayoría de los tumores, pero *Teng y cols.*¹¹⁰ no consideran que el microambiente de tipo I sea tan prevalente como en el observado en el melanoma. De acuerdo con esto, en nuestro estudio sólo un 20% de los pacientes fueron clasificados en el tipo I, cifras comparables a otros dos estudios en CCECC^{123,130}, donde se describen entre el 14 y 20% de tumores de tipo I.

Dado que una alta infiltración por linfocitos T CD8+ refleja una respuesta inmune y ha sido asociada con un mejor pronóstico⁷⁵, los tumores de tipo I y IV se espera que tengan mejor pronóstico, mientras que los tipos II y III tendrían un peor pronóstico. En nuestro estudio, los grupos de pacientes con un tumor de tipo I o IV mostraron significativamente una mejor SEE y SG que los pacientes con tumores de tipo II o III. Las mejores cifras de supervivencia fueron observadas en el tipo I, mientras que las peores en el tipo II. Resultados similares se observaron en el meta-análisis realizado por *Yang y cols.*¹¹⁶ combinando la expresión de PD-L1 con la densidad de TILs CD8+ en aquellos trabajos que incluían ambos datos^{123,130,135}. Nuestro trabajo está en concordancia con dos de estos estudios^{123,130}, que muestran una correlación positiva entre la expresión de PD-L1 y densidad de TILs CD8+ y un mejor pronóstico para la expresión positiva de PD-L1, una alta densidad de TILs CD8+ y un microambiente tumoral de tipo I. Cabe

mencionar que dos de estos estudios, como en nuestra serie, solamente incluyen pacientes con tumor de orofaringe¹³⁰ o predominantemente localizados en orofaringe¹²³, y en uno de ellos¹²³ con el mismo tratamiento (cirugía). Hay que destacar que dos de estos estudios previos incluyen una proporción significativa de pacientes VPH positivo (19% y 37%) y ninguno incluye tumores laríngeos, que constituyen importantes diferencias respecto al diseño de nuestro estudio. El otro estudio¹³⁵ también describe una correlación positiva entre la expresión de PD-L1 y TILs CD8+, aunque ni la expresión positiva de PD-L1 o el microambiente tumoral de tipo I fueron asociados con un mejor pronóstico. De forma notoria, este estudio incluye tumores de hipofaringe tratados con quimioterapia de inducción. En otro estudio reciente de carcinomas de hipofaringe tratados quirúrgicamente también se observó una correlación positiva entre la expresión de PD-L1 y TILs CD8+ y un mejor pronóstico si hay una alta densidad de TILs CD8+ y un microambiente tumoral de tipo I, pero no para la expresión de PD-L1¹³⁶. De nuevo, parece que la localización del tumor y el tipo de tratamiento puede influir en el valor pronóstico de estos parámetros.

De acuerdo con nuestros hallazgos, una alta infiltración por TILs FOXP3+ también predice un mejor pronóstico. Este hallazgo ha sido descrito previamente en CCECC^{75,137} y en otras localizaciones¹³⁷. Resulta un tanto inesperada una asociación entre la presencia de linfocitos T inmunosupresores en el microambiente tumoral con un mejor pronóstico. No obstante, hemos observado una fuerte correlación entre la infiltración tanto por TILs CD8+ como Tregs FOXP3+, y ambos fueron asociados de una forma consistente con un mejor pronóstico en los análisis univariantes. En cambio, el valor pronóstico de los TILs FoxP3+ se pierde en el análisis multivariante sugiriendo que esta asociación con un mejor pronóstico pueda ser indirecta, debido a la correlación con TILs CD8+. Otros estudios también sugieren que el número de TILs FOXP3+ puede

reflejar el número total de linfocitos T presentes en el tumor^{136,138}. Nuestra hipótesis es que el efecto beneficioso de los TILs CD8+ supera al efecto inmunosupresor de los TILs FOXP3+. Para investigar este potencial fenómeno, se podría usar la ratio CD8+/FOXP3+. Así una alta ratio (reflejo de un predominio de TILs CD8+) se ha asociado con un mejor pronóstico en diferentes tipos de tumor¹³⁹. Pocos estudios previos han evaluado esta ratio en CCECC^{52,80}, hallando una asociación con un mejor pronóstico. En nuestro estudio, no hemos observado evidencias de asociación entre la ratio CD8+/FOXP3+ y la supervivencia. Por ello, el valor pronóstico de CD8+/FOXP3+ en CCECC debería ser clarificado y validado en estudios adicionales en amplias cohortes independientes.

5.4. RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LLT1 CON LA SUPERVIVENCIA EN CCEO

Como se ha comentado anteriormente, existen diferentes mecanismos de evasión inmune tumoral en CCECC, y varios puntos de control inmune han sido identificados y están sobreexpresados en el microambiente tumoral induciendo el agotamiento de los linfocitos T efectores, siendo el eje PD-1/PD-L1 antes discutido el más ampliamente estudiado^{41,140}. En marcado contraste, pocos estudios han investigado el rol del eje de control inmune inhibidor LLT1/NKRP1 (CD161). En un reciente estudio de metadatos sobre 18.000 tumores de 39 localizaciones, *Gentles y cols.*¹²⁰ han identificado la expresión de *KLRB1* (que codifica CD161) como el marcador pronóstico más favorable, indicando la presencia de una firma favorable de linfocitos T como marcador de características inmunes innatas. De acuerdo con estos resultados, en un meta-análisis de 730 perfiles de transcriptómica disponibles de cáncer de pulmón, *Braud y cols.*¹⁴¹ encontraron una asociación positiva entre la expresión génica de *CLEC2D* (que codifica LLT1) y *KLRB1* (que codifica CD161) con un pronóstico favorable. De forma interesante, en este artículo, la expresión de LLT1 estaba restringida a células inmunes dentro del tejido tumoral de cáncer de pulmón no microcítico. Además, *Matthew y cols.*¹⁴² describieron una sobreexpresión de LLT1 en carcinomas de próstata y líneas celulares derivadas. Además, la interrupción de la interacción de LLT1 con NKRP1 usando un anticuerpo bloqueante incrementaba la citotoxicidad mediada por NK en líneas celulares de cáncer de próstata. En conjunto, estos datos sugieren un papel importante del eje LLT1-NKRP1A en la evasión inmune, y cómo la expresión de LLT1 en el cáncer de próstata podría contribuir a la inhibición de la actividad citolítica mediada por las células NK. De forma similar, *Marrujo y cols.*¹⁴³ detectaron la expresión de LLT1 en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo y demostraron que el bloqueo del complejo

LLT1-NKRP1 usando anticuerpos bloqueantes o inhibiendo la expresión de LLT1 potenció la lisis de las células cancerosas mediada por las células NK. En base de estos hallazgos, la interacción LLT1-NKRP1A ha sido propuesta como una estrategia novedosa y nueva diana de inmunoterapia para tratar el cáncer de mama triple negativo y el cáncer de próstata¹⁴⁴.

En consonancia con estos estudios, nuestros resultados demuestran por primera vez que la expresión de LLT1 se detecta en un alto porcentaje de las muestras de CCEO. Aún más importante, la expresión positiva de LLT1 en las células tumorales se revela como un predictor independiente de mal pronóstico en pacientes con CCEO, lo que sugiere un posible efecto inmunosupresor de la expresión de LLT1. Estos hallazgos están en línea con nuestras observaciones previas en carcinomas cutáneos escamosos, donde la expresión de LLT1 fue un predictor significativo de riesgo de metástasis nodal y una SEE reducida¹⁴⁵. Estos datos indican por tanto que el valor pronóstico de la expresión de LLT1 puede variar en función del tipo histológico, siendo desfavorable en carcinomas escamosos. Además, nuestro estudio también muestra evidencias del rol de la expresión LLT1 en el infiltrado inmune tumoral. Así, encontramos que una alta densidad de TILs LLT1 positivos se asociaba significativa e independientemente con un mejor pronóstico, si bien la expresión tumoral de LLT1 se asociaba con peor pronóstico. Estos resultados son similares a los descritos en el carcinoma de pulmón no microcítico¹⁴¹, indicando que la expresión de LLT1 en el infiltrado inmune intratumoral puede conferir un pronóstico favorable en diferentes tipos de tumor. Es posible que esta expresión elevada de LLT1 en el infiltrado inmune sea un reflejo de una alta infiltración por linfocitos NK, en los que se expresa, y de ahí su asociación con un mejor pronóstico. De hecho, en nuestra serie de CCEO se observó una fuerte correlación entre la densidad de linfocitos CD8+ y FOXP3+

y la expresión de LLT1 en el infiltrado inmune, lo cual probablemente refleja una alta densidad de infiltrado linfocitario en general.

6. CONCLUSIONES

1. Una alta infiltración por TILs, en particular por linfocitos T CD8+, se asocia con un mejor pronóstico en pacientes tratados quirúrgicamente de un CCECC VPH negativo.
2. La expresión positiva de PD-L1 en pacientes con CCECC VPH negativo se asocia con un mejor pronóstico. Esta asociación puede ser indirecta debida a la fuerte correlación positiva de PD-L1 con una mayor densidad de TILs CD8+.
3. La combinación de la expresión positiva de PD-L1 y una alta infiltración por TILs CD8+ (microambiente inmune tipo I) confiere el pronóstico más favorable en pacientes tratados quirúrgicamente de un CCECC VPH negativo, mientras que la combinación de la expresión negativa de PD-L1 y ausencia de TILs (microambiente inmune tipo II) confiere la peor supervivencia.
4. La expresión tumoral de L1T1 se detecta frecuentemente en pacientes con CCEO HPV negativo y emerge como un predictor independiente de mal pronóstico.
5. Una alta densidad de TILs L1T1 positivos se asocia independientemente con un mejor pronóstico en pacientes tratados quirúrgicamente de un CCEO HPV negativo.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010;127(12):2893-2917.
2. Simard EP, Torre LA, Jemal A. International trends in head and neck cancer incidence rates: differences by country, sex and anatomic site. *Oral Oncol*. 2014;50(5):387-403.
3. Howlander N, Noone AM, Krapcho M, et al. SEER cancer statistics review (CSR) 1975-2011. Bethesda (MD): National Cancer Institute; 2014.
4. Rettig EM, D'Souza G. Epidemiology of head and neck cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2015;24(3):379-396.
5. Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol*. 2011;29(32):4294-4301.
6. Mehanna H, Beech T, Nicholson T, et al. Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer-systematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head Neck*. 2013;35(5):747-755.
7. Herrero R, Castellsagué X, Pawlita M, et al. Human papillomavirus and oral cancer: The International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(23):1772-1783.
8. Rodrigo JP, Heideman DA, García-Pedrero JM, et al. Time trends in the prevalence of HPV in oropharyngeal squamous cell carcinomas in northern Spain (1990-2009). *Int J Cancer*. 2014;134(2):487-492.
9. Gillison ML, D'Souza G, Westra W, et al. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(6):407-420.
10. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis

in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium [published correction appears in *J Natl Cancer Inst.* 2008 Feb 6;100(3):225. Fernandez, Leticia [added]]. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(10):777-789.

11. Vineis P, Alavanja M, Buffler P, et al. Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96(2):99-106.

12. Schlecht NF, Franco EL, Pintos J, Kowalski LP. Effect of smoking cessation and tobacco type on the risk of cancers of the upper aero-digestive tract in Brazil. *Epidemiology.* 1999;10(4):412-418.

13. Anantharaman D, Marron M, Lagiou P, et al. Population attributable risk of tobacco and alcohol for upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol.* 2011;47(8):725-731.

14. Menvielle G, Luce D, Goldberg P, Bugel I, Leclerc A. Smoking, alcohol drinking and cancer risk for various sites of the larynx and hypopharynx. A case-control study in France. *Eur J Cancer Prev.* 2004;13(3):165-172.

15. Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(2):541-550.

16. Hwang E, Johnson-Obaseki S, McDonald JT, Connell C, Corsten M. Incidence of head and neck cancer and socioeconomic status in Canada from 1992 to 2007. *Oral Oncol.* 2013;49(11):1072-1076.

17. Conway DI, Brenner DR, McMahon AD, et al. Estimating and explaining the effect of education and income on head and neck cancer risk: INHANCE consortium pooled analysis of 31 case-control studies from 27 countries. *Int J Cancer.* 2015;136(5):1125-1139.

18. Grulich AE, van Leeuwen MT, Falster MO, Vajdic CM. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet*. 2007;370(9581):59-67.
19. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(9):709-720.
20. Tota JE, Chevarie-Davis M, Richardson LA, Devries M, Franco EL. Epidemiology and burden of HPV infection and related diseases: implications for prevention strategies. *Prev Med*. 2011;53 Suppl 1:S12-S21.
21. Gillison ML, Alemany L, Snijders PJ, et al. Human papillomavirus and diseases of the upper airway: head and neck cancer and respiratory papillomatosis. *Vaccine*. 2012;30 Suppl 5:F34-F54
22. Kreimer AR, Johansson M, Waterboer T, et al. Evaluation of human papillomavirus antibodies and risk of subsequent head and neck cancer. *J Clin Oncol*. 2013;31(21):2708-2715.
23. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. 2007;356(19):1944-1956.
24. Fakhry C, Gillison ML, D'Souza G. Tobacco use and oral HPV-16 infection. *JAMA*. 2014;312(14):1465-1467.
25. Laubenbacher C, Saumweber D, Wagner-Manslau C, et al. Comparison of fluorine-18-fluorodeoxyglucose PET, MRI and endoscopy for staging head and neck squamous-cell carcinomas. *J Nucl Med*. 1995;36(10):1747-1757.
26. Marur S, Forastiere AA. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc*. 2016;91(3):386-396.

27. Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol.* 2010;11(8):781-789.
28. Venuti A, Paolini F. HPV detection methods in head and neck cancer. *Head Neck Pathol.* 2012;6 Suppl 1(Suppl 1):S63-S74.
29. Smeets SJ, Hesselink AT, Speel EJ, et al. A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int J Cancer.* 2007;121(11):2465-2472.
30. AJCC Cancer Staging Manual, 8th ed.; Springer International Publishing; American Joint Commission on Cancer: New York, NY, USA, 2017.
31. Pfister DG, Ang KK, Brizel DM, et al. Head and neck cancers, version 2.2013. Featured updates to the NCCN guidelines [published correction appears in *J Natl Compr Canc Netw.* 2013 Dec 1;11(12):1458]. *J Natl Compr Canc Netw.* 2013;11(8):917-923.
32. Cohen EEW, Bell RB, Bifulco CB, et al. The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC). *J Immunother Cancer.* 2019;7(1):184.
33. Kofler B, Laban S, Busch CJ, Lörincz B, Knecht R. New treatment strategies for HPV-positive head and neck cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2014;271(7):1861-1867.
34. Ang KK, Zhang Q, Rosenthal DI, et al. Randomized phase III trial of concurrent accelerated radiation plus cisplatin with or without cetuximab for stage III to IV head and neck carcinoma: RTOG 0522. *J Clin Oncol.* 2014;32(27):2940-2950.
35. Giralt J, Trigo J, Nuyts S, et al. Panitumumab plus radiotherapy versus chemoradiotherapy in patients with unresected, locally advanced squamous-cell carcinoma of the head and neck (CONCERT-2): a randomised, controlled, open-label phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2015;16(2):221-232.

36. Gebre-Medhin M, Brun E, Engström P, et al. ARTSCAN III: A Randomized Phase III Study Comparing Chemoradiotherapy With Cisplatin Versus Cetuximab in Patients With Locoregionally Advanced Head and Neck Squamous Cell Cancer. *J Clin Oncol*. 2021;39(1):38-47.
37. Pulte D, Brenner H. Changes in survival in head and neck cancers in the late 20th and early 21st century: a period analysis. *Oncologist*. 2010;15(9):994-1001.
38. Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2018 May;18(5):269-282. doi: 10.1038/nrc.2018.11. Epub 2018 Mar 2. Erratum in: *Nat Rev Cancer*. 2018 Oct;18(10):662.
39. Lechner M, Frampton GM, Fenton T, et al. Targeted next-generation sequencing of head and neck squamous cell carcinoma identifies novel genetic alterations in HPV+ and HPV- tumors. *Genome Med*. 2013;5(5):49.
40. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*. 2015;517(7536):576-582.
41. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674.
42. Atkins MB, Larkin J. Immunotherapy combined or sequenced with targeted therapy in the treatment of solid tumors: Current Perspectives. *J Natl Cancer Inst*. 2016;108(6):d1v414.
43. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011;331(6024):1565-1570.
44. Wondergem NE, Nauta IH, Muijlwijk T, Leemans CR, van de Ven R. The Immune Microenvironment in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: on Subsets and Subsites. *Curr Oncol Rep*. 2020;22(8):81.

45. Kotoula V, Chatzopoulos K, Lakis S, et al. Tumors with high-density tumor infiltrating lymphocytes constitute a favorable entity in breast cancer: a pooled analysis of four prospective adjuvant trials. *Oncotarget*. 2016;7(4):5074-5087.
46. Geng Y, Shao Y, He W, et al. Prognostic Role of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Lung Cancer: a Meta-Analysis. *Cell Physiol Biochem*. 2015;37(4):1560-1571.
47. Ferris RL, Hunt JL, Ferrone S. Human leukocyte antigen (HLA) class I defects in head and neck cancer: molecular mechanisms and clinical significance. *Immunol Res*. 2005;33(2):113-133.
48. Whiteside TL. Tumor-induced death of immune cells: its mechanisms and consequences. *Semin Cancer Biol*. 2002;12(1):43-50.
49. Ferris RL, Whiteside TL, Ferrone S. Immune escape associated with functional defects in antigen-processing machinery in head and neck cancer. *Clin Cancer Res*. 2006;12(13):3890-3895.
50. Zandberg DP, Strome SE. The role of the PD-L1: PD-1 pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol*. 2014;50(7):627-632.
51. Bialoszewska A, Malejczyk J. Biological and clinical significance of human NKRP1A/LLT1 receptor/ligand interactions. *Crit Rev Immunol*. 2018;38(6):479-489.
52. Chen X, Yan B, Lou H, et al. Immunological network analysis in HPV associated head and neck squamous cancer and implications for disease prognosis. *Mol Immunol*. 2018;96:28-36.
53. Masucci MT, Minopoli M, Carriero MV. Tumor associated neutrophils. Their role in tumorigenesis, metastasis, prognosis and therapy. *Front Oncol*. 2019;9:1146.
54. Trellakis S, Bruderek K, Dumitru CA, et al. Polymorphonuclear granulocytes in human head and neck cancer: enhanced inflammatory activity, modulation by cancer cells and expansion in advanced disease. *Int J Cancer*. 2011;129(9):2183-2193.

55. Dumitru CA, Bankfalvi A, Gu X, et al. Neutrophils activate tumoral cortactin to enhance progression of orohypopharynx carcinoma. *Front Immunol*. 2013;4:33.
56. Moy JD, Moskovitz JM, Ferris RL. Biological mechanisms of immune escape and implications for immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer*. 2017;76:152-166.
57. Wagner S, Wittekindt C, Reuschenbach M, et al. CD56-positive lymphocyte infiltration in relation to human papillomavirus association and prognostic significance in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2016;138(9):2263-2273.
58. Reichert TE, Scheuer C, Day R, Wagner W, Whiteside TL. The number of intratumoral dendritic cells and zeta-chain expression in T cells as prognostic and survival biomarkers in patients with oral carcinoma. *Cancer*. 2001;91(11):2136-2147.
59. Yilmaz T, Gedikoglu G, Celik A, Onerci M, Turan E. Prognostic significance of Langerhans cell infiltration in cancer of the larynx. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005;132(2):309-316.
60. Jardim JF, Gondak R, Galvis MM, Pinto CAL, Kowalski LP. A decreased peritumoral CD1a+ cell number predicts a worse prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Histopathology*. 2018;72(6):905-913.
61. O'Donnell RK, Mick R, Feldman M, et al. Distribution of dendritic cell subtypes in primary oral squamous cell carcinoma is inconsistent with a functional response. *Cancer Lett*. 2007;255(1):145-152.
62. Hilly O, Strenov Y, Rath-Wolfson L, et al. The predictive value of dendritic cells in early squamous cell carcinoma of the tongue. *Pathol Res Pract*. 2016;212(12):1138-1143.

63. Nguyen N, Bellile E, Thomas D, et al. Tumor infiltrating lymphocytes and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2016;38(7):1074-1084.
64. Chen WY, Wu CT, Wang CW, et al. Prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with operable tongue cancer. *Radiat Oncol*. 2018;13(1):157.
65. Lu CF, Huang CS, Tjiu JW, Chiang CP. Infiltrating macrophage count: a significant predictor for the progression and prognosis of oral squamous cell carcinomas in Taiwan. *Head Neck*. 2010;32(1):18-25
66. Seminerio I, Kindt N, Descamps G, et al. High infiltration of CD68+ macrophages is associated with poor prognoses of head and neck squamous cell carcinoma patients and is influenced by human papillomavirus. *Oncotarget*. 2018;9(13):11046-11059.
67. Oguejiofor K, Galletta-Williams H, Dovedi SJ, Roberts DL, Stern PL, West CM. Distinct patterns of infiltrating CD8+ T cells in HPV+ and CD68 macrophages in HPV-oropharyngeal squamous cell carcinomas are associated with better clinical outcome but PD-L1 expression is not prognostic. *Oncotarget*. 2017;8(9):14416-14427.
68. Fujii N, Shomori K, Shiomi T, et al. Cancer-associated fibroblasts and CD163-positive macrophages in oral squamous cell carcinoma: their clinicopathological and prognostic significance. *J Oral Pathol Med*. 2012;41(6):444-451.
69. Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol*. 2009;182(8):4499-4506.
70. Ma X, Sheng S, Wu J, et al. LncRNAs as an intermediate in HPV16 promoting myeloid-derived suppressor cell recruitment of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(26):42061-42075.
71. Zhang N, Bevan MJ. CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity*. 2011;35(2):161-168.

72. 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.
73. Balermipas P, Michel Y, Wagenblast J, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes predict response to definitive chemoradiotherapy in head and neck cancer [published correction appears in *Br J Cancer*. 2014 Jan 21;110(2):547]. *Br J Cancer*. 2014;110(2):501-509.
74. Balermipas P, Rödel F, Rödel C, et al. CD8+ tumour-infiltrating lymphocytes in relation to HPV status and clinical outcome in patients with head and neck cancer after postoperative chemoradiotherapy: A multicentre study of the German cancer consortium radiation oncology group (DKTK-ROG). *Int J Cancer*. 2016;138(1):171-181.
75. de Ruiter EJ, Ooft ML, Devriese LA, Willems SM. The prognostic role of tumor infiltrating T-lymphocytes in squamous cell carcinoma of the head and neck: A systematic review and meta-analysis. *Oncoimmunology*. 2017;6(11):e1356148.
76. Spector ME, Bellile E, Amlani L, et al. Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma [published online ahead of print, 2019 Sep 5]. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2019;145(11):1012-1019.
77. Huang Z, Xie N, Liu H, et al. The prognostic role of tumour-infiltrating lymphocytes in oral squamous cell carcinoma: A meta-analysis. *J Oral Pathol Med*. 2019;48(9):788-798.
78. Hadler-Olsen E, Wirsing AM. Tissue-infiltrating immune cells as prognostic markers in oral squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer*. 2019;120(7):714-727.

79. Nordfors C, Grün N, Tertipis N, et al. CD8+ and CD4+ tumour infiltrating lymphocytes in relation to human papillomavirus status and clinical outcome in tonsillar and base of tongue squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer*. 2013;49(11):2522-2530.
80. Näsman A, Romanitan M, Nordfors C, et al. Tumor infiltrating CD8+ and Foxp3+ lymphocytes correlate to clinical outcome and human papillomavirus (HPV) status in tonsillar cancer. *PLoS One*. 2012;7(6):e38711.
81. Wansom D, Light E, Thomas D, et al. Infiltrating lymphocytes and human papillomavirus-16-associated oropharyngeal cancer. *Laryngoscope*. 2012;122(1):121-127.
82. Ward MJ, Thirdborough SM, Mellows T, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes predict for outcome in HPV-positive oropharyngeal cancer. *Br J Cancer*. 2014;110(2):489-500.
83. Hoesli R, Birkeland AC, Rosko AJ, et al. Proportion of CD4 and CD8 tumor infiltrating lymphocytes predicts survival in persistent/recurrent laryngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2018;77:83-89.
84. Chatzopoulos K, Kotoula V, Manoussou K, et al. Tumor Infiltrating Lymphocytes and CD8+ T Cell Subsets as Prognostic Markers in Patients with Surgically Treated Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Head Neck Pathol*. 2020;14(3):689-700.
85. Rodrigo JP, Sánchez-Canteli M, López F, et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes in the Tumor Microenvironment of Laryngeal Squamous Cell Carcinoma: Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomedicines*. 2021;9(5):486.
86. Kim HJ, Cantor H. CD4 T-cell subsets and tumor immunity: the helpful and the not-so-helpful. *Cancer Immunol Res*. 2014;2(2):91-98.
87. Fang J, Li X, Ma D, et al. Prognostic significance of tumor infiltrating immune cells in oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2017;17(1):375.

88. Mattox AK, Lee J, Westra WH, et al. PD-1 Expression in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Derives Primarily from Functionally Anergic CD4⁺ TILs in the Presence of PD-L1⁺ TAMs. *Cancer Res.* 2017;77(22):6365-6374.
89. Jung AC, Guihard S, Krugell S, et al. CD8-alpha T-cell infiltration in human papillomavirus-related oropharyngeal carcinoma correlates with improved patient prognosis. *Int J Cancer.* 2013;132(2):E26-E36.
90. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(7):490-500.
91. Badoual C, Hans S, Rodriguez J, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating CD4⁺ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin Cancer Res.* 2006;12(2):465-472.
92. Seminerio I, Descamps G, Dupont S, et al. Infiltration of FoxP3⁺ Regulatory T Cells is a Strong and Independent Prognostic Factor in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancers (Basel).* 2019;11(2):227.
93. Song JJ, Zhao SJ, Fang J, et al. Foxp3 overexpression in tumor cells predicts poor survival in oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2016;16:530.
94. Liang YJ, Liu HC, Su YX, et al. Foxp3 expressed by tongue squamous cell carcinoma cells correlates with clinicopathologic features and overall survival in tongue squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol.* 2011;47(7):566-570.
95. Deola S, Panelli MC, Maric D, et al. Helper B cells promote cytotoxic T cell survival and proliferation independently of antigen presentation through CD27/CD70 interactions. *J Immunol.* 2008;180(3):1362-1372.
96. Schwartz M, Zhang Y, Rosenblatt JD. B cell regulation of the anti-tumor response and role in carcinogenesis. *J Immunother Cancer.* 2016;4:40.

97. Lechner A, Schlößer HA, Thelen M, et al. Tumor-associated B cells and humoral immune response in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncoimmunology*. 2019;8(3):1535293.
98. Hladíková K, Koucký V, Bouček J, et al. Tumor-infiltrating B cells affect the progression of oropharyngeal squamous cell carcinoma via cell-to-cell interactions with CD8⁺ T cells. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):261.
99. Pretscher D, Distel LV, Grabenbauer GG, Wittlinger M, Buettner M, Niedobitek G. Distribution of immune cells in head and neck cancer: CD8⁺ T-cells and CD20⁺ B-cells in metastatic lymph nodes are associated with favourable outcome in patients with oro- and hypopharyngeal carcinoma. *BMC Cancer*. 2009;9:292.
100. Schneider K, Marbaix E, Bouzin C, et al. Immune cell infiltration in head and neck squamous cell carcinoma and patient outcome: a retrospective study. *Acta Oncol*. 2018;57(9):1165-1172.
101. Shiga K, Hara M, Nagasaki T, Sato T, Takahashi H, Takeyama H. Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth. *Cancers (Basel)*. 2015;7(4):2443-2458.
102. Harper J, Sainson RC. Regulation of the anti-tumour immune response by cancer-associated fibroblasts. *Semin Cancer Biol*. 2014;25:69-77.
103. Li H, Zhang J, Chen SW, et al. Cancer-associated fibroblasts provide a suitable microenvironment for tumor development and progression in oral tongue squamous cancer. *J Transl Med*. 2015;13:198
104. Choi SY, Oh SY, Kang SH, et al. NAB 2-Expressing Cancer-Associated Fibroblast Promotes HNSCC Progression. *Cancers (Basel)*. 2019;11(3):388.

105. Yu B, Wu K, Wang X, et al. Periostin secreted by cancer-associated fibroblasts promotes cancer stemness in head and neck cancer by activating protein tyrosine kinase 7. *Cell Death Dis.* 2018;9(11):1082.
106. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(4):252-264.
107. Dolan DE, Gupta S. PD-1 pathway inhibitors: changing the landscape of cancer immunotherapy. *Cancer Control.* 2014;21(3):231-237.
108. Ritprajak P, Azuma M. Intrinsic and extrinsic control of expression of the immunoregulatory molecule PD-L1 in epithelial cells and squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2015;51(3):221-228.
109. Bauman JE, Ferris RL. Integrating novel therapeutic monoclonal antibodies into the management of head and neck cancer. *Cancer.* 2014;120(5):624-632.
110. Teng MW, Ngiow SF, Ribas A, Smyth MJ. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Res.* 2015;75(11):2139-2145.
111. Gong J, Chehrazi-Raffle A, Reddi S, Salgia R. Development of PD-1 and PD-L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy: a comprehensive review of registration trials and future considerations. *J Immunother Cancer.* 2018;6(1):8.
112. Carbognin L, Pilotto S, Milella M, et al. Differential Activity of Nivolumab, Pembrolizumab and MPDL3280A according to the Tumor Expression of Programmed Death-Ligand-1 (PD-L1): Sensitivity Analysis of Trials in Melanoma, Lung and Genitourinary Cancers. *PLoS One.* 2015;10(6):e0130142.
113. Mehra R, Seiwert TY, Gupta S, 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(2):153-159.

114. Ferris RL, Blumenschein G Jr, Fayette J, et al. Nivolumab vs investigator's choice in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: 2-year long-term survival update of CheckMate 141 with analyses by tumor PD-L1 expression. *Oral Oncol.* 2018;81:45-51.
115. Li J, Wang P, Xu Y. Prognostic value of programmed cell death ligand 1 expression in patients with head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2017;12(6):e0179536.
116. Yang WF, Wong MCM, Thomson PJ, Li KY, Su YX. The prognostic role of PD-L1 expression for survival in head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol.* 2018;86:81-90.
117. Llibre A, Garner L, Partridge A, Freeman GJ, Klenerman P, Willberg CB. Expression of lectin-like transcript-1 in human tissues. *F1000Res.* 2016;5:2929.
118. Suto Y, Yabe T, Maenaka K, Tokunaga K, Tadokoro K, Juji T. The human natural killer gene complex (NKC) is located on chromosome 12p13.1-p13.2. *Immunogenetics.* 1997;46(2):159-162.
119. Germain C, Bihl F, Zahn S, et al. Characterization of alternatively spliced transcript variants of CLEC2D gene. *J Biol Chem.* 2010;285(46):36207-36215.
120. Gentles AJ, Newman AM, Liu CL, et al. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat Med.* 2015;21(8):938-945.
121. Rosen DB, Cao W, Avery DT, et al. Functional consequences of interactions between human NKR-P1A and its ligand LLT1 expressed on activated dendritic cells and B cells. *J Immunol.* 2008;180(10):6508-6517.
122. Menéndez ST, Rodrigo JP, Alvarez-Teijeiro S, et al. Role of HERG1 potassium channel in both malignant transformation and disease progression in head and neck carcinomas. *Mod Pathol.* 2012;25(8):1069-1078.

123. Balermipas P, Rödel F, Krause M, et al. The PD-1/PD-L1 axis and human papilloma virus in patients with head and neck cancer after adjuvant chemoradiotherapy: A multicentre study of the German Cancer Consortium Radiation Oncology Group (DKTK-ROG). *Int J Cancer*. 2017;141(3):594-603.
124. Ferris RL. Immunology and Immunotherapy of Head and Neck Cancer. *J Clin Oncol*. 2015;33(29):3293-3304.
125. Wu P, Wu D, Li L, Chai Y, Huang J. PD-L1 and Survival in Solid Tumors: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2015;10(6):e0131403.
126. Wang Q, Liu F, Liu L. Prognostic significance of PD-L1 in solid tumor: An updated meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(18):e6369.
127. Schneider S, Kadletz L, Wiebringhaus R, et al. PD-1 and PD-L1 expression in HNSCC primary cancer and related lymph node metastasis - impact on clinical outcome. *Histopathology*. 2018;73(4):573-584.
128. 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.
129. Badoual C, Hans S, Merillon N, et al. PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer. *Cancer Res*. 2013;73(1):128-138.
130. De Meulenaere A, Vermassen T, Aspeslagh S, et al. Tumor PD-L1 status and CD8⁺ tumor-infiltrating T cells: markers of improved prognosis in oropharyngeal cancer. *Oncotarget*. 2017;8(46):80443-80452.
131. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8⁺ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(9):3360-3365.

132. Lipson EJ, Vincent JG, Loyo M, et al. PD-L1 expression in the Merkel cell carcinoma microenvironment: association with inflammation, Merkel cell polyomavirus and overall survival. *Cancer Immunol Res.* 2013;1(1):54-63.
133. Vilain RE, Menzies AM, Wilmott JS, et al. Dynamic Changes in PD-L1 Expression and Immune Infiltrates Early During Treatment Predict Response to PD-1 Blockade in Melanoma. *Clin Cancer Res.* 2017;23(17):5024-5033.
134. Concha-Benavente F, Srivastava RM, Trivedi S, et al. Identification of the Cell-Intrinsic and -Extrinsic Pathways Downstream of EGFR and IFN γ That Induce PD-L1 Expression in Head and Neck Cancer. *Cancer Res.* 2016;76(5):1031-1043.
135. Ono T, Azuma K, Kawahara A, Sasada T, Hattori S, Sato F, Shin B, Chitose SI, Akiba J, Hirohito U. Association between PD-L1 expression combined with tumor-infiltrating lymphocytes and the prognosis of patients with advanced hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2017 Oct 6;8(54):92699-92714.
136. Hu C, Tian S, Lin L, Zhang J, Ding H. Prognostic and clinicopathological significance of PD-L1 and tumor infiltrating lymphocytes in hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2020;102:104560.
137. Shang B, Liu Y, Jiang SJ, Liu Y. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2015;5:15179.
138. Park K, Cho KJ, Lee M, Yoon DH, Kim SB. Importance of FOXP3 in prognosis and its relationship with p16 in tonsillar squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2013;33(12):5667-5673.
139. Gooden MJ, de Bock GH, Leffers N, Daemen T, Nijman HW. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br J Cancer.* 2011;105(1):93-103.

140. Mirza AH, Thomas G, Ottensmeier CH, King EV. Importance of the immune system in head and neck cancer. *Head Neck*. 2019;41(8):2789-2800.
141. Braud VM, Biton J, Becht E, et al. Expression of LLT1 and its receptor CD161 in lung cancer is associated with better clinical outcome. *Oncoimmunology*. 2018;7(5):e1423184.
142. Mathew SO, Chaudhary P, Powers SB, Vishwanatha JK, Mathew PA. Overexpression of LLT1 (OCIL, CLEC2D) on prostate cancer cells inhibits NK cell-mediated killing through LLT1-NKRP1A (CD161) interaction. *Oncotarget*. 2016;7(42):68650-68661.
143. Marrufo AM, Mathew SO, Chaudhary P, Malaer JD, Vishwanatha JK, Mathew PA. Blocking LLT1 (CLEC2D, OCIL)-NKRP1A (CD161) interaction enhances natural killer cell-mediated lysis of triple-negative breast cancer cells. *Am J Cancer Res*. 2018;8(6):1050-1063.
144. Sun Y, Malaer JD, Mathew PA. Lectin-like transcript 1 as a natural killer cell-mediated immunotherapeutic target for triple negative breast cancer and prostate cancer. *J Cancer Metastasis Treat*. 2019;5:80.
145. Santos-Juanes J, Fernández-Vega I, Lorenzo-Herrero S, et al. Lectin-like transcript 1 (LLT1) expression is associated with nodal metastasis in patients with head and neck cutaneous squamous cell carcinoma. *Arch Dermatol Res*. 2019;311(5):369-376.