



*Programa de Doctorado en Biomedicina y Oncología Molecular*

**“EXPRESIÓN DE LINFOCITOS INFILTRANTES DE  
TUMOR (TILS), PD-L1 E INESTABILIDAD DE  
MICROSATÉLITES EN TUMORES POBREMENTE  
DIFERENCIADOS DE SENOS PARANASALES”**

**Doctorando**

Eva Villanueva Fernández

Oviedo, octubre 2024



*Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias*  
*Programa de Doctorado en Biomedicina y Oncología Molecular*

**“EXPRESIÓN DE LINFOCITOS INFILTRANTES DE  
TUMOR (TILS), PD-L1 E INESTABILIDAD DE  
MICROSATÉLITES EN TUMORES POBREMENTE  
DIFERENCIADOS DE SENOS PARANASALES”**

**Doctorando**

Eva Villanueva Fernández

**Directores**

Prof. Dr. Fernando López Álvarez

Dr. Mario A. Hermsen

Oviedo, octubre 2024



Universidad de Oviedo

## AUTORIZACIÓN PARA LA PRESENTACIÓN DE TESIS DOCTORAL

Año Académico: 2024/2025

1.- Datos personales del autor de la Tesis		
Apellidos: Villanueva Fernández	Nombre: Eva	
DNI: 71456901H	Teléfono: 660315635	Correo electrónico: evaviva12@hotmail.com

2.- Datos académicos	
Programa de Doctorado cursado: Biomedicina y Oncología Molecular	
Órgano responsable: Centro Internacional de Postgrado	
Título definitivo de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Expresión de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs), PD-L1 e inestabilidad de microsatélites en tumores pobremente diferenciados de senos paranasales	Inglés: Expression of tumor infiltrating lymphocytes (TILs), PD-L1 and microsatellite instability in poorly differentiated sinonasal tumors
Rama de conocimiento	<input type="checkbox"/> Arte y Humanidades <input type="checkbox"/> Ciencias <input checked="" type="checkbox"/> Ciencias de la Salud <input type="checkbox"/> Ciencias Sociales y Jurídicas <input type="checkbox"/> Ingeniería y Arquitectura

3.- Autorización del Director/es y Tutor de la tesis	
D. Fernando López Álvarez	DNI: 09429591M
Departamento/Instituto: Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas	
D. Marinus A.J.A. Hermsen	NIE: X5040120S
Departamento/Instituto/Institución: Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias. Fundación para la Investigación Biosanitaria de Asturias.	
Autorización del Tutor de la tesis	
D. César Antonio Álvarez Marcos	DNI:10817811Z
Departamento/Instituto: Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas	

Autoriza la presentación de la tesis doctoral en cumplimiento de lo establecido en el Art. 32 del Reglamento de los Estudios de Doctorado, aprobado por el Consejo de Gobierno, en su sesión del día 20 de julio de 2018 (BOPA del 9 de agosto de 2018)

Oviedo, 6 de octubre de 2024

Director/es de la Tesis

Tutor de la Tesis

LOPEZ  
ALVAREZ  
FERNANDO -  
09429591M

Firmado digitalmente por LOPEZ ALVAREZ FERNANDO - 09429591M  
Fecha: 2024.10.14 21:25:11 +02'00'

Firmado por HERMSEN MARINUS ANTONIUS JACOBUS ARNOLDUS - \*\*\*\*0120\* el día 14/10/2024 con un certificado emitido por AC FNMT Usuarios

ALVAREZ  
MARCOS CESAR  
ANTONIO -  
10817811Z

Firmado digitalmente por ALVAREZ MARCOS CESAR ANTONIO - 10817811Z  
Fecha: 2024.10.14 20:42:07 +02'00'

Fdo.: Fernando López Álvarez

Mario A. Hermsen

Fdo.: César A. Álvarez Marcos

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



Universidad de Oviedo

## RESOLUCIÓN DE PRESENTACIÓN DE TESIS DOCTORAL

Año Académico: 2024/2025

1.- Datos personales del autor de la Tesis		
Apellidos: Villanueva Fernández	Nombre: Eva	
DNI/Pasaporte/NIE: 71456901H	Teléfono: 660315635	Correo electrónico: evaviva12@hotmail.com

2.- Datos académicos	
Programa de Doctorado cursado: Biomedicina y Oncología Molecular	
Órgano responsable: Centro Internacional de Postgrado	
Departamento/Instituto en el que presenta la Tesis Doctoral: Instituto Universitario de Oncología el Principado de Asturias (IUOPA)	
Título definitivo de la Tesis	
Español/Otro Idioma: "Expresión de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs), PD-L1 e inestabilidad de microsatélites en tumores pobremente diferenciados de senos paranasales"	Inglés: "Expression of tumor infiltrating lymphocytes (TILs), PD-L1 and microsatellite instability in poorly differentiated sinonasal tumors."
Rama de conocimiento:	
<input type="checkbox"/> Arte y Humanidades <input type="checkbox"/> Ciencias <input checked="" type="checkbox"/> Ciencias de la Salud <input type="checkbox"/> Ciencias Sociales y Jurídicas <input type="checkbox"/> Ingeniería y Arquitectura	
Señale si procede:	
<input type="checkbox"/> Mención Internacional <input type="checkbox"/> Mención Industrial <input type="checkbox"/> Idioma de presentación de la Tesis distinto al español <input type="checkbox"/> Presentación como compendio de publicaciones	

3.- Autorización del Presidente de la Comisión Académica	
D/Dª: Ana Fernández Somoano	DNI/Pasaporte/NIE: 71635187P
Departamento/Instituto: Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA) / Medicina	

**Resolución:** La Comisión Académica del Programa de Biomedicina y Oncología Molecular del Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA) en su reunión de fecha 24 de octubre de 2024 , acordó la presentación de la tesis doctoral a la Comisión de Doctorado, previa comprobación de que la tesis presentada y la documentación que la acompaña cumplen con la normativa vigente, según lo establecido en el Art.32.8 del Reglamento de los Estudios de Doctorado, aprobado por el Consejo de Gobierno, en su sesión del día 20 de julio de 2018 (BOPA del 9 de agosto de 2018)

Además, informa:

	Favorable	Desfavorable
• Mención Internacional	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• Mención Industrial	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• Idioma	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• Presentación como compendio de publicaciones	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

FOR-MAT-VOA-012 (Reg. 2018)



Universidad de Oviedo

### **Justificación**

Se estima que el presente trabajo de investigación, presentado como tesis doctoral, cumple todos los requisitos para su depósito y posterior defensa.

FOR-MAT-VOA-012 (Reg. 2018)

Oviedo, a 24 de octubre de 2024

Presidente de la Comisión Académica del Programa de Doctorado

FERNANDEZ  
SOMOANO ANA  
- 71635187P

Firmado digitalmente por  
FERNANDEZ SOMOANO  
ANA - 71635187P  
Fecha: 2024.10.24  
11:21:22 +02'00'

Fdo.: Ana Fernández Somoano.

Contra la presente Resolución, podrá interponer recurso de alzada ante el Rectorado, en el plazo de un mes, a partir del día siguiente al de la presente notificación, de conformidad con el art. 122 de la Ley 39/2015, de 1 de octubre, de Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas

**SR. DIRECTOR DEL CENTRO INTERNACIONAL DE POSTGRADO**



Universidad de Oviedo

## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Expresión de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs), PD-L1 e inestabilidad de microsatélites en tumores pobremente diferenciados de senos paranasales	Inglés: Expression of tumor infiltrating lymphocytes (TILs), PD-L1 and microsatellite instability in poorly differentiated sinonasal tumors

2.- Autor	
Nombre: Eva Villanueva Fernández	
Programa de Doctorado: Biomedicina y Oncología Molecular	
Órgano responsable: Centro Internacional de Postgrado	

### RESUMEN (en español)

**Introducción y Objetivos:** Los tumores originados en las fosas nasales y en los senos paranasales son un grupo de tumores poco frecuente, con una amplia diversidad histológica y unas características clínicas y genéticas específicas, lo cual dificulta mucho tanto su estudio como su diagnóstico y clasificación, impidiendo estandarizar su manejo para obtener unos resultados de tratamiento satisfactorios. A pesar de la utilización de un tratamiento multimodal agresivo que incluye tanto cirugía como (RT) y quimioterapia (QT), los resultados oncológicos son bastante pobres, con una tasa de supervivencia global a 5 años del 30-50%. Por este motivo es necesario desarrollar nuevas opciones de tratamiento, dentro de las cuales la inmunoterapia (IT), especialmente la basada en los inhibidores de los puntos de control inmunológicos, como los agentes anti-PD1 nivolumab y el Pembrolizumab, es especialmente interesante. La presencia de linfocitos infiltrantes de tumor CD8+ (TILs CD8+), la expresión tumoral de PD-L1 y la inestabilidad de microsatélites (MSI) han sido estudiados como posibles biomarcadores de respuesta al tratamiento con estos fármacos, pero su papel en el caso de los carcinomas pobremente diferenciados de senos paranasales no ha sido estudiado hasta la fecha. El objetivo de esta Tesis Doctoral es evaluar la presencia de TILs CD8+, PD-L1 y MSI en una serie de tumores pobremente diferenciados de senos paranasales, así como su relación con los parámetros clinicopatológicos y pronósticos.

**Método:** Se evaluó la presencia de TILs CD8+, así como la expresión de PD-L1 y los marcadores de MSI (MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2) en 69 casos de tumores pobremente diferenciados de 9 subtipos histológicos diferentes de pacientes que habían recibido tratamientos convencionales

**Resultados:** En nuestra serie se observó la presencia de TILs CD8+ en 23/69 (33%) de los casos, la expresión de PD-L1 en 23/69 (33%) de los casos y la presencia de MSI en 5/69 (7%) de los casos. La presencia de TILs CD8+ presentó correlación con la expresión de PD-L1 y ambas fueron mutuamente excluyentes con la presencia de MSI. Ninguno de estos marcadores se asoció con la edad, el sexo, el estadio tumoral o la presencia de recidivas. No observamos una relación estadísticamente significativa entre la presencia de TILs CD8+ y la SG, la SE o la SLE. Tampoco observamos una relación estadísticamente significativa entre la expresión de PD-L1 y la SG, la SE o la SLE, aunque los casos con expresión de PD-L1 mostraron una tendencia a presentar peor supervivencia específica.

**Conclusión:** Los inhibidores de puntos de control inmunológico han cobrado importancia como nuevas opciones para el tratamiento de muchos tipos de tumores. Nuestros resultados indican que también un subconjunto sustancial de pacientes con tumores pobremente diferenciados de senos paranasales pueden ser candidatos para ser tratados con esta nueva y prometedora terapia.



Universidad de Oviedo

## RESUMEN (en Inglés)

**Introduction and Objectives:** Tumours originating in the nasal cavities and paranasal sinuses are a rare group of tumours, with a wide histological diversity and specific clinical and genetic characteristics, which makes both their study and their diagnosis and classification very difficult, preventing standardisation of their management to obtain satisfactory treatment results. Despite the use of aggressive multimodal treatment that includes both surgery (RT) and chemotherapy (QT), oncological results are quite poor, with an overall 5-year survival rate of 30-50%. For this reason, new treatment options need to be developed, of which immunotherapy (IT), especially based on immune checkpoint inhibitors, such as the anti-PD1 agents nivolumab and Pembrolizumab, is of particular interest. The presence of CD8+ tumour infiltrating lymphocytes (CD8+ TILs), PD-L1 tumour expression and microsatellite instability (MSI) have been studied as possible biomarkers of response to treatment with these drugs, but their role in the case of poorly differentiated carcinomas of the paranasal sinuses has not been studied to date. The aim of this PhD Thesis is to evaluate the presence of CD8+ TILs, PD-L1 and MSI in a series of poorly differentiated paranasal sinus tumours, as well as their relationship with clinicopathological and prognostic parameters.

**Methods:** We evaluated the presence of CD8+ TILs, as well as the expression of PD-L1 and MSI markers (MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2) in 69 cases of poorly differentiated tumours of 9 different histological subtypes in patients who had received conventional treatments.

**Results:** In our series we observed the presence of CD8+ TILs in 23/69 (33%) of cases, PD-L1 expression in 23/69 (33%) of cases and the presence of MSI in 5/69 (7%) of cases. The presence of CD8+ TILs correlated with PD-L1 expression and both were mutually exclusive with the presence of MSI. None of these markers were associated with age, sex, tumour stage or the presence of recurrence. We did not observe a statistically significant association between the presence of CD8+ TILs and OS, ES or SLE. We also did not observe a statistically significant association between PD-L1 expression and OS, SE or SLE, although cases with PD-L1 expression showed a tendency to have worse specific survival.

**Conclusion:** Immune checkpoint inhibitors have gained importance as new options for the treatment of many tumour types. Our results indicate that also a substantial subset of patients with poorly differentiated sinus tumours may be candidates for treatment with this promising new therapy.

## ÍNDICE

<b>Abreviaturas</b>	9
<b>1. Introducción</b>	12
<b>1.1 Presentación del problema</b>	13
<b>1.2 Tumores nasosinusales</b>	17
1.2.1 Epidemiología	17
1.2.2 Etiopatogenia	17
1.2.3 Histopatología	19
1.2.4 Presentación clínica	27
1.2.5 Diagnóstico	28
1.2.6 Estadificación	30
1.2.7 Tratamiento	30
1.2.8 Pronóstico	32
<b>1.3 Aspectos inmunológicos</b>	33
1.3.1 El sistema inmune y el cáncer	33
1.3.2 Mecanismos de evasión de la respuesta inmune	37
1.3.3 El microambiente tumoral	42
1.3.4 Inmunoterapia	45
1.3.5 El receptor PD-1 y su ligando PD-L1	47
1.3.5.1 Papel en inmunoterapia	49
1.3.6 Utilidad clínica del análisis de la expresión de PD-1/PD-L1	52
1.3.6.1 Análisis de la expresión de PD-1/PD-L1	53
1.3.7 Papel de PD-L1 en los tumores de senos paranasales	53
<b>1.4 Inestabilidad de microsatélites</b>	55
1.4.1 Inestabilidad genómica y cáncer	55
1.4.2 Sistema mismatch repair (MMR)	56
1.4.3 Inestabilidad de microsatélites y sistema mismatch repair	57
1.4.4 Análisis de MSI	58
1.4.5 Utilidad en inmunoterapia	60
1.4.6 MSI en el cáncer nasosinusal	61
<b>2. Hipótesis</b>	62
<b>3. Objetivos</b>	64
<b>3.1 Objetivo principal</b>	65



<b>3.2 Objetivos específicos</b>	65
<b>4. Material y método</b>	66
<b>4.1 Pacientes estudiados</b>	67
<b>4.2 Recogida de la muestra</b>	67
<b>4.3 Técnica de los “Tissue Arrays”</b>	68
4.3.1 Selección de las zonas a muestrear	68
4.3.2 Elaboración de la base de datos y esquema del “Tissue Array”	69
4.3.3 Elaboración del “Tissue Array”	69
4.3.4 Secciones del bloque	69
4.3.5 Requerimientos mínimos estándar del “Tissue Array”	70
<b>4.4 Análisis mediante IHQ</b>	70
4.4.1 Interpretación de las técnicas IHQs	72
4.4.2 Secuenciación para detección de IDH2	74
<b>4.5 Descripción de las variables</b>	75
<b>4.6 Análisis estadístico</b>	75
<b>5. Resultados</b>	77
<b>5.1 Aspectos clínico-patológicos</b>	78
<b>5.2 Relaciones entre la supervivencia y las variables clínico-patológicas</b>	83
5.2.1 Relación entre la supervivencia y la edad	83
5.2.2 Relación entre la supervivencia y el estadio tumoral	85
5.2.3 Relación entre la supervivencia y el subtipo histológico	86
5.2.4 Relación entre la supervivencia y presencia de recidivas locorreionales	89
<b>5.3 Valoración de la presencia de linfocitos TILs CD8+</b>	90
5.3.1 Significado clínico-patológico de la presencia de TILs CD8+	91
5.3.2 Relación entre la presencia de TILs CD8+ y el curso de la enfermedad	92
<b>5.4 Valoración de la expresión IHQ de PD-L1</b>	93
5.4.1 Significado clínico-patológico de la expresión de PD-L1	94
5.4.2 Relación entre la expresión de PD-L1 y el curso de la enfermedad	96
<b>5.5 Valoración de la presencia de MSI</b>	97
5.5.1 Significado clínico-patológico de la presencia de MSI	98
5.5.2 Relación entre la presencia de MSI y el curso de la enfermedad	99
<b>6. Discusión</b>	100
<b>6.1 Justificación</b>	101

<b>6.2 Historia natural de la cohorte estudiada de pacientes con tumores pobremente diferenciados de senos paranasales</b>	102
<b>6.3 Presencia de TILs CD8+</b>	105
<b>6.4 Expresión de PD-L1</b>	107
<b>6.5 Presencia de MSI</b>	112
<b>6.6 Otros biomarcadores en investigación</b>	115
<b>6.7 Futuras perspectivas para el tratamiento de los tumores de senos paranasales</b>	117
<b>7. Conclusiones</b>	119
<b>8. Bibliografía</b>	122
<b>9. Anexos</b>	144

## **ABREVIATURAS**

- AJCC:** American Joint Committee on Cancer
- CAR-T:** linfocitos T con receptor de antígeno quimérico
- CD:** células dendríticas
- CD8+ TIL:** células T citotóxicas CD8 positivas
- CECC:** carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello
- CPA:** células presentadoras de antígeno
- CPH:** complejo principal de histocompatibilidad
- CSF:** factor estimulante de colonias
- CTLA-4:** receptor del antígeno 4 del linfocito T citotóxico
- d-MMR:** MMR deficiente
- EGFR:** factor de crecimiento epidérmico
- FDA:** Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
- GEP:** expresión genética inflamada por células T
- GITR:** proteína relacionada con el receptor del factor de necrosis tumoral inducido por corticoides
- GM-CS:** Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos
- HG-non-ITAC:** adenocarcinoma de tipo no intestinal de alto grado
- IDO:** indolamina 2,3-dioxigenasa
- IFN- $\alpha$ :** interferón alfa
- IFN- $\gamma$ :** interferón gamma
- IHC:** inmunohistoquímica
- IL:** interleucina
- IMRT:** radioterapia de intensidad modulada
- IT:** inmunoterapia
- ITAC:** adenocarcinoma de tipo intestinal
- LAG-3:** gen 3 de activación de linfocitos I
- LG-non-ITAC:** adenocarcinoma de tipo no intestinal de bajo grado
- LMP:** proteínas latentes de la membrana
- MDSC:** células supresoras derivadas de mieloides
- MMR:** *mismatch repair*

**MPS:** firma de plasticidad melanocítica

**MSI-H:** alta inestabilidad de microsatélites (MSI “high”)

**MSI-L:** baja inestabilidad de microsatélites (MSI “low”)

**MSI:** inestabilidad de microsatélites

**NF-κB:** factor nuclear potenciador de cadena k-ligera de células B activadas

**NGS:** secuenciación de nueva generación

**NK:** células *Natural Killer*

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**ONB:** neuroblastoma olfatorio

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**PD-1:** receptor del ligando tipo 1 de muerte programada

**PD-SNSCC:** carcinomas nasosinuales de células escamosas pobremente diferenciados

**PET:** tomografía por emisión de positrones

**PGE<sub>2</sub>:** prostaglandina E2

**QRT:** quimio-radioterapia

**QT:** quimioterapia

**RM:** resonancia magnética

**RT:** radioterapia

**SI:** sinapsis inmunológica

**SE:** supervivencia específica

**SG:** supervivencia global

**SLE:** supervivencia libre de enfermedad

**SNEC:** carcinoma neuroendocrino de senos paranasales

**SNSCC:** Carcinoma de células escamosas de senos paranasales

**SNTCS:** teratocarcinosarcoma nasosinusal

**SNUC:** carcinoma indiferenciado de senos paranasales

**STAT:** factor transductor de señal y activador de la transcripción  
suppressor cells”)

**T-Vec:** *talimogene laherparepvec*

**TAP:** transportador asociado al procesamiento de antígenos

**Tc:** células T citotóxicas

**TC:** tomografía computerizada

**TCR:** receptor de células T

**TGF- $\beta$ :** factor de crecimiento transformante beta

**Th:** células T *helper*

**TIDE:** firma de disfunción inmune y exclusión de células T

**TIL:** linfocitos infiltrantes de tumor

**TIM-3:** mucina 3 de inmunoglobulina de células T

**TMB:** carga mutacional tumoral (*"tumoral mutational burden"*)

**TME:** microambiente tumoral

**TNF:** factor de necrosis tumoral

**Treg:** linfocitos T reguladores

**UICC:** Organización Internacional contra el Cáncer

**VEB:** virus de Epstein-Barr

**VEGF:** factor de crecimiento del endotelio vascular

**VMAT:** arcoterapia modulada volumétricamente

**VPH:** virus del papiloma humano

1

---

# INTRODUCCIÓN

## 1.1 Presentación del problema

Los tumores originados en las fosas nasales y en los senos paranasales son un grupo de tumores poco frecuente, representando aproximadamente un 3,6% de los tumores de cabeza y cuello y menos de un 0,2% del total de tumores malignos (1-3). Estos tumores representan una amplia diversidad histológica, cada uno con su etiología, epidemiología, características clínicas y genéticas específicas (2). Estas premisas dificultan mucho su estudio, obstaculizando su diagnóstico y clasificación e impidiendo estandarizar el manejo de los pacientes para obtener unos resultados de tratamiento satisfactorios.

A pesar de los avances en los tratamientos quirúrgicos, de radioterapia (RT) y de quimioterapia (QT) y utilizando un tratamiento multimodal agresivo, los resultados oncológicos son bastante pobres (4). Independientemente del tipo de tratamiento utilizado, el pronóstico de los pacientes con carcinomas de senos paranasales es malo, con una tasa de supervivencia global a los 5 años del 30-50% (2). Para intentar mejorar estos resultados, es necesario desarrollar nuevas opciones de tratamiento. Dentro de estas nuevas opciones de tratamiento, la inmunoterapia (IT), especialmente los inhibidores de los puntos de control inmunitario, podría ser una opción terapéutica para el tratamiento de los tumores en estadios más avanzados.

Dentro de los puntos de control inmunitario, uno de los más estudiados es la interacción entre el receptor del ligando 1 de muerte programada o PD-1 (en inglés: *Programmed Death 1*) con su ligando PD-L1 (en inglés: *Programmed Death-ligand 1*), que bloquea los linfocitos T activados, disminuyendo su activación y proliferación y protege a las células tumorales de la apoptosis (5). Esta interacción es utilizada por diversos tipos de tumores como mecanismo de evasión de la respuesta inmune antitumoral (6-8). Es por ello por lo que se han desarrollado anticuerpos monoclonales que bloquean esta vía para intentar restaurar la actividad de los linfocitos T y aumentar así la respuesta inmune antitumoral (9,10). Los inhibidores de puntos de control funcionan liberando un freno natural en el sistema inmunitario para que las células inmunitarias reconozcan y ataquen a los tumores. La inmunoterapia ha surgido como una prometedora estrategia de tratamiento para redirigir las respuestas inmunitarias del huésped y ya es una realidad en el arsenal actual para el tratamiento tumoral.

Desde que en 2014 la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) aprobó el pembrolizumab, un anticuerpo monoclonal anti-PD-1, para el tratamiento del melanoma avanzado, el número de agentes que interfieren con esta vía de señalización ha aumentado rápidamente y ya se han incorporado al tratamiento de un amplio espectro de neoplasias (5,11-14). En 2016, la FDA aprobó el uso de pembrolizumab y nivolumab para los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (CECC) metastásicos o recurrentes y en 2019 la FDA aprobó el pembrolizumab para el tratamiento de primera línea de pacientes con CECC recurrente o metastásico irresecable (15).

Para seleccionar a los pacientes susceptibles de beneficiarse de este tipo de terapias, algunos estudios han demostrado la utilidad de la expresión de PD-L1 en las células tumorales (16). Sin embargo, la expresión de PD-L1 puede no ser el único factor predictivo, pues se ha observado que no todos los pacientes PD-L1 positivos medidos por inmunohistoquímica (IHQ) responden bien a estas terapias (17).

Específicamente, en los CECC la expresión tumoral de PD-L1 se correlaciona generalmente con una mayor eficacia a los bloqueantes anti-PD-1/PD-L1 y el valor predictivo aumenta al considerar tanto la expresión de PD-L1 como los niveles de células inmunitarias infiltrantes del tumor. Sin embargo, el valor predictivo de la expresión de PD-L1 tiene limitaciones, ya que algunos pacientes PD-L1 negativos también responden al tratamiento con estos agentes inmunoterápicos (18,19). Además del papel potencial de PD-L1 como biomarcador predictivo para la respuesta del CECC al tratamiento anti-PD-1/PD-L1, la relevancia pronóstica en estos tumores sigue siendo controvertida. Dos metaanálisis no lograron demostrar un impacto claro de la expresión de PD-L1 en el pronóstico de los CECC (20,21), aunque la heterogeneidad entre los estudios fue significativa. Estos resultados contradictorios pueden deberse a diferencias metodológicas en la tinción inmunohistoquímica para PD-L1, incluidos los anticuerpos específicos y los valores de corte utilizados en cada estudio. Además, la heterogeneidad de la localización de los tumores, la estadificación, los regímenes de tratamiento, así como el estado del virus del papiloma humano (VPH) de los pacientes incluidos en los estudios también pueden haber contribuido a estos resultados variables.



En los tumores de senos paranasales se ha estudiado el impacto de la expresión de PD-L1 en carcinomas de células escamosas (o SNSCC, por sus siglas en inglés) y en adenocarcinomas de tipo intestinal (o ITAC, por sus siglas en inglés). En estos tumores, si bien globalmente la positividad de PD-L1 no parece tener valor pronóstico, un subgrupo de pacientes podría beneficiarse de la terapia con inhibidores de este punto de control inmunitario debido a la sobreexpresión observada de PD-L1 (22).

Un estudio más refinado y cuidadoso de los microambientes inmunitarios asociados a la expresión de PD-L1 puede ser útil para definir mejor la función pronóstica de este biomarcador (23). Diversos estudios se han centrado en el estudio de la presencia de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs), un grupo de células inmunitarias que presentan una mayor reactividad inmunológica específica en el entorno tumoral, siendo las células (linfocitos) T citotóxicas CD8 positivas (TILs CD8+) el subconjunto más importante. Otros de los linfocitos presentes en el microambiente tumoral son los linfocitos T reguladores (Treg). Estudios previos sobre TILs han demostrado que el aumento de la infiltración por TILs CD8+ o Treg se asocia a resultados favorables (24). En los CECC, una alta infiltración por TILs CD8+ se asocia con mejores resultados de supervivencia. Además, la expresión positiva de PD-L1 se correlaciona con una alta infiltración por TILs, explicando su asociación con un mejor pronóstico (23,25). Desafortunadamente, hasta ahora, las interacciones entre PD-L1, PD-1, y los diferentes subgrupos de TILs, así como el impacto de estas interacciones en los resultados clínicos, han sido escasamente documentadas en los tumores de senos paranasales. Los SNSCC, al igual que el resto de los CECC, son tumores inmunogénicos y se ha observado, de modo análogo a aquellos, que hay un subgrupo de pacientes con elevada expresión de PD-L1 y un alto índice de TILs CD8+ en los que podría ser de utilidad la IT (26). Por el contrario, los ITAC son tumores poco inmunogénicos y muy pocos pacientes presentan positividad para los TILs CD8+ y, por tanto, resultan menos susceptibles a este tipo de tratamiento (27).

Por otra parte, el papel de la epigenética en la génesis y el desarrollo tumoral ha cobrado importancia en los últimos años (28,29). Los cambios epigenéticos son modificaciones dinámicas y hereditarias del genoma que se producen independientemente de la secuencia del ADN. Las alteraciones epigenéticas pueden

conducir a una inestabilidad genómica en las células que favorece la aparición y acumulación de mutaciones que pueden inducir el desarrollo tumoral. La inestabilidad genómica más estudiada y mejor caracterizada es la inestabilidad de microsatélites (o MSI, por sus siglas en inglés) (29). La MSI es una situación en la cual la longitud de un microsatélite, secuencia corta y repetitiva de ADN, ha aumentado o disminuido en el tejido tumoral. Los microsatélites son particularmente susceptibles a errores en la replicación, debido a que su estructura repetitiva propicia que la ADN polimerasa se equivoque al copiar la hebra molde del ADN. Por ello, en la MSI, el número de repeticiones en el tejido tumoral y el normal es diferente. La MSI se debe a defectos en los genes (generalmente por mutaciones, pero se han descrito también cambios epigenéticos) implicados en el sistema MMR (*mismatch repair*) de reparación de emparejamientos erróneos, como MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2, entre otros. Aunque inicialmente se describió en pacientes con cáncer de colon esporádico y cáncer colorrectal hereditario no polipósico, actualmente ha sido demostrada en muchos tipos de tumores (29). Dentro de los carcinomas de senos paranasales se ha visto en los SNSCC, pero no en los ITAC (30). Los tumores con una elevada MSI y mutaciones en los genes de reparación se caracterizan por una elevada carga mutacional y de neoantígenos y una frecuente infiltración de células inmunitarias. Por tanto, en estos tumores, los inhibidores de puntos de control inmunitario muestran altas tasas de respuesta y supervivencia en comparación con los tumores estables en microsatélites (31). La FDA ha aprobado la presencia de MSI, analizada por IHQ o por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) multiplex como predictor de la eficacia de la inmunoterapia del cáncer irreseccable o metastásico, independientemente de su localización (32,33).

En esta **Tesis Doctoral** se ha estudiado la expresión de PD-L1, el microambiente tumoral y la MSI en una serie de pacientes con carcinomas pobremente diferenciados de senos paranasales, incluyendo en la muestra 9 estirpes diferentes, con el objetivo final de investigar nuevas opciones terapéuticas para estos tumores.

## **1.2 Tumores nasosinusales**

### **1.2.1 Epidemiología**

Los tumores de las fosas nasales y senos paranasales representan entre un 3 y un 5% de los tumores de cabeza y cuello, con una incidencia entre 0,5-1,0 casos/100.000 habitantes (1-3). Son tumores más frecuentes en los varones, con una relación entre el sexo masculino/sexo femenino de 1,2-2,7:1 (34-36). Este aspecto marca una diferencia especialmente significativa con respecto al resto de tumores de cabeza y cuello, en los que la preponderancia masculina es mucho más elevada, sobrepasando el 90%. Globalmente, el 75% de los tumores nasosinusales se diagnostican en personas alrededor de los 50 años, aun cuando pueden presentarse en cualquier edad (37). Los tumores de estirpes histológicas menos diferenciadas, como el carcinoma indiferenciado (o SNUC, por sus siglas en inglés), el neuroblastoma olfatorio (u ONB, por sus siglas en inglés), el carcinoma NUT o el adenocarcinoma de tipo no intestinal de alto grado (o HG-non-ITAC, por sus siglas en inglés) suelen presentarse a edades más tempranas (38).

Con respecto a la localización tumoral, la incidencia ha aumentado en las fosas nasales, representando hasta un 45% de los tumores nasosinusales, mientras que en los senos paranasales la incidencia se mantiene similar (55%) (39,40). Dentro de los senos paranasales el seno más frecuentemente afectado es el maxilar (60-80%), seguido del etmoides, aunque, en ocasiones, es difícil de definir exactamente dado que la gran mayoría al momento del diagnóstico afecta a más de un seno paranasal (41). La incidencia de tumores primarios del seno frontal y esfenoidal es muy baja (2).

### **1.2.2 Etiopatogenia**

En general, no se conocen con exactitud los mecanismos etiopatogénicos que dan lugar a los tumores de senos paranasales, si bien se han descrito diferentes carcinógenos ambientales, virus y agentes físicos que podrían estar implicados. El mecanismo etiopatogénico de estos tumores no se conoce con exactitud, aunque se cree que están involucrados varios factores, entre los que destacan la inflamación y genotoxicidad desencadenados por las partículas carcinógenas. La genotoxicidad se divide en primaria y secundaria; la primaria es la producida directamente sobre las

células diana del organismo y la secundaria es la producida por la respuesta inflamatoria crónica del individuo en respuesta a la exposición a diferentes partículas (42-44). Actualmente, cada vez cobra más importancia el estroma en la progresión de los tumores y actualmente muchos estudios se centran en el microambiente tumoral, sus células inflamatorias y las vías activadas (45-47).

Los SNSCC y especialmente los ITAC son tumores etiológicamente relacionados con la exposición ocupacional al polvo de madera y cuero y a otros compuestos industriales como el níquel y el cromo (48). Los trabajadores de la industria de la madera tienen hasta 500-900 veces más riesgo de desarrollar un ITAC y 20 veces más riesgo de desarrollar un SNSCC respecto a la población general. Los trabajadores de la industria peletera tienen un riesgo 10 veces superior al de la población general de desarrollar un ITAC (2,49).

En algunos casos de tumores de senos paranasales, el VPH y el virus de Epstein-Barr (VEB) se han visto implicados en la oncogénesis (50,51). Se ha demostrado la presencia de VPH 16 y 18 predominantemente en los SNSCC (51). En un metaanálisis se observó una prevalencia de VPH del 30% en los tumores de senos paranasales (52). La presencia de un papiloma invertido también se considera un factor de riesgo ya que se ha observado una tasa de malignización a SNSCC del 5% (53,54).

Aunque de manera menos evidente que en los carcinomas faringolaríngeos, hay evidencia suficiente de que el humo del tabaco puede contribuir a la aparición de tumores de senos paranasales, preferentemente SNSCC (55-57).

En el caso de los tumores pobremente diferenciados de senos paranasales no se han encontrado agentes etiológicos claros. Los SNUC son típicamente negativos para el VEB y se ha notificado el desarrollo de algunos casos tras el tratamiento radioterápico para el carcinoma nasofaríngeo (41).

### **1.2.3 Histopatología**

El tracto nasosinusal está recubierto de un epitelio pseudoestratificado ciliado de tipo respiratorio en el que predominan cuatro tipos de células diferentes: células cilíndricas ciliadas, células cilíndricas no ciliadas, células basales y células caliciformes. Además, el vestíbulo nasal está recubierto por un epitelio poliestratificado plano queratinizado, mientras que el techo de las fosas nasales está recubierto por un epitelio olfatorio sensorial (2). Mientras que la gran mayoría de la mucosa de la vía aerodigestiva superior deriva del endodermo, la mucosa de las fosas nasales deriva del ectodermo. Esta mucosa además tiende a crear invaginaciones, dando lugar a la presencia de numerosas glándulas.

Aunque el tracto nasosinusal es una región anatómica relativamente pequeña, es muy compleja y las particularidades antes mencionadas hacen que esta región sea el origen de una amplia variedad de tumores benignos y malignos, tanto epiteliales como no epiteliales, a menudo con morfología de alto grado y/o indiferenciada (58), cada uno con su etiología, epidemiología, características clínicas y genéticas distintivas (1,2). Por centímetro cúbico, el tracto nasosinusal da lugar a una diversidad de neoplasias mayor que cualquier otra región del cuerpo humano (59). Esta diversidad se debe en parte a su complejidad anatómica y a la gran variedad de tejidos diferentes que están presentes en esta área (60,61). Además, en los últimos años, con el aumento de las pruebas moleculares, se han identificado subconjuntos de tumores basados en alteraciones genético-moleculares específicas, como son la expresión de proteínas específicas, alteraciones cromosómicas, infección por virus oncogénicos o mutaciones genéticas específicas (62).

Entre el 50 y el 90% de los tumores de senos paranasales son de estirpe epitelial, siendo los SNSCC los más frecuentes (60-75%), seguidos de los ITAC (10-20%) (3,39,62,63). El resto de los tumores epiteliales está constituido por una miscelánea. La 4ª edición de la clasificación de los tumores de senos paranasales de la Organización Mundial de la Salud (OMS) incluye los siguientes grupos principales de neoplasias epiteliales malignas: carcinomas de células escamosas queratinizantes y no queratinizantes, carcinomas de células escamosas fusiformes, carcinomas linfoepiteliales, carcinomas indiferenciados o SNUC, carcinomas neuroendocrinos (o

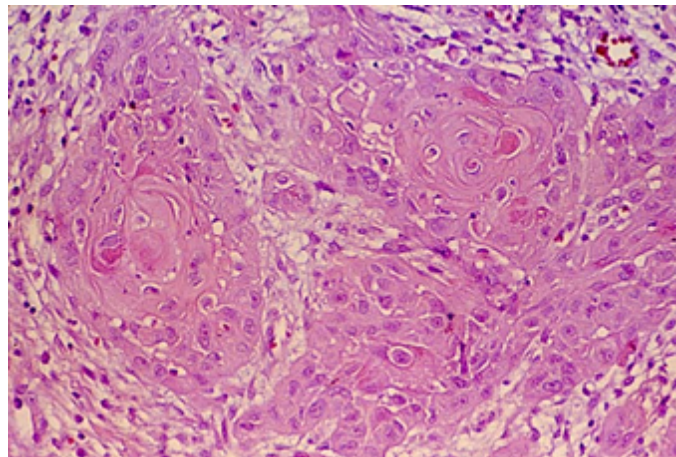
SNEC, por sus siglas en inglés), adenocarcinomas (incluidos subtipos intestinales o ITAC y no intestinales o non-ITAC) y teratocarcinosarcomas (o SNTCS, por sus siglas en inglés). Sin embargo, algunas de estas categorías tumorales, como por ejemplo los adenocarcinomas de tipo no intestinal, los SNUC y los SNEC, aún no están completamente caracterizados y actualmente son diagnósticos de exclusión, lo que da lugar a una colección heterogénea de tumores con escaso significado clínico (64-67).

El análisis genético-molecular permite que actualmente puedan ser diagnosticados un mayor número de variantes que antes estaban englobadas dentro de los tumores más o menos diferenciados. Dentro de los tumores diferenciados, entre los SNSCC se ha caracterizado un grupo de tumores con características distintivas que presentan una mutación del exón 20 del gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y dentro de los carcinomas de células escamosas no queratinizantes, los tumores que portan una fusión DEK-AFF2 forman una categoría tumoral distinta (61,66-69). Otros ejemplos de tumores caracterizados por una marca genético-molecular distintiva serían el carcinoma NUT (así denominado por la presencia de una translocación cromosómica t(15;19) que produce el oncogén de fusión BRD4–NUT) (70), el carcinoma multifenotípico relacionado con el VPH en casos de VPH de alto riesgo en ausencia de la t(6;9) y reordenamiento de MYB-NFIB (71). Finalmente, existen nuevos subtipos histológicos previamente clasificados como SNUC, como el carcinoma SMARCB1-deficiente, el carcinoma SMARCA4-deficiente y, posiblemente, también SNUC IDH2-mutado (62,72-74).

A continuación, describiremos brevemente las características diferenciales de algunos de los subtipos histológicos en los que se centra el presente trabajo.

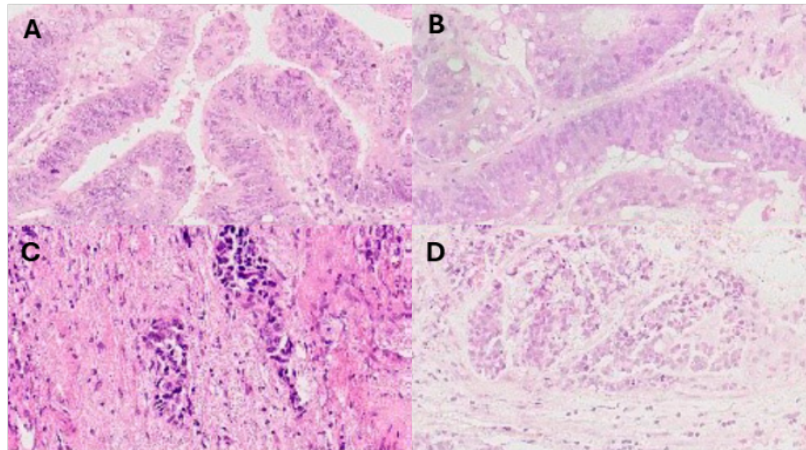
El **carcinoma de células escamosas (SNSCC)** es la forma más frecuente de carcinoma de senos paranasales (*Figura 1*). Histológicamente está constituido por trabéculas o nidos de tamaño variable, formados por células similares a las del epitelio plano poliestratificado, con distinto grado de atipia, si bien en la mayoría de las ocasiones los tumores son de alto grado, con elevado grado de atipia y dediferenciación (75). Existen formas queratinizantes y no queratinizantes. La forma más frecuente es la queratinizante, constituida por nidos y cordones irregulares de células neoplásicas que muestran grados variables de diferenciación escamosa y queratinización tanto en forma

de disqueratosis individuales como formando globos córneos y a menudo se asocian con una reacción desmoplásica del estroma circundante. La forma no queratinizante está constituida por células de aspecto más basaloide. Puede clasificarse según su grado de diferenciación en formas bien (G1), moderadamente (G2) y pobremente diferenciadas (G3) (76), lo cual tiene implicaciones clínicas evidentes, pues los tumores peor diferenciados suelen ser más agresivos y responder mejor a los tratamientos no quirúrgicos.



**Figura 1.** Carcinoma epidermoide bien diferenciado. Obsérvense los globos córneos. Hematoxilina-Eosina (X200)

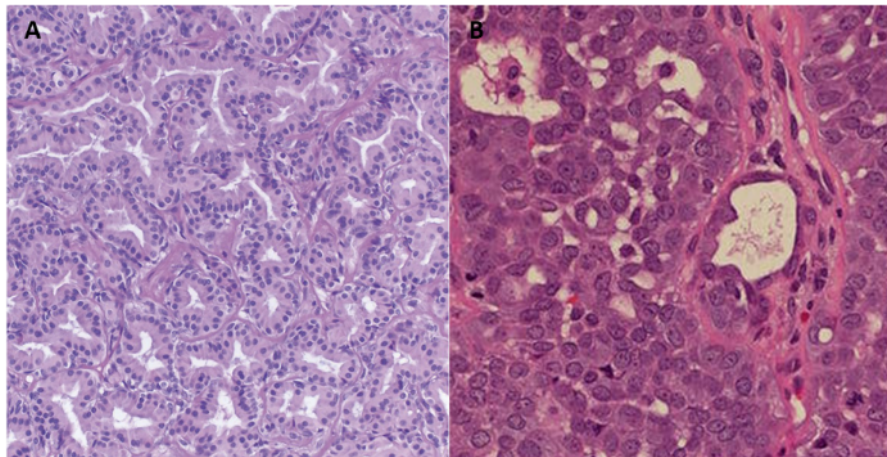
Según la clasificación de Barnes (77) los **adenocarcinomas de tipo intestinal (ITAC)** pueden clasificarse en 5 categorías principales: papilar (18%), colónico (40%), sólido (20%), mucinoso (22%) y mixto (*Figura 2*). Estos subtipos muestran diferentes patrones de crecimiento: el papilar está formado por finos tallos conectivos que sustentan varios estratos de células cuboideas o cilíndricas con escasa atipia citológica; el colónico crece con arquitectura túbulo-glandular; el sólido muestra pérdida de diferenciación con mayor atipia citológica y el mucinoso muestra abundante componente mucoso extracelular e intracelular (78,79). Todos estos tumores se subdividen en alto y bajo grado, según el grado de atipia citológica, siendo el pronóstico relativamente bueno para los tumores bien diferenciados, mientras que en los tumores pobremente diferenciados el pronóstico se asemeja al de los carcinomas de células escamosas.



**Figura 2.** Distintos subtipos histológicos de adenocarcinoma de tipo intestinal. **A.** Papilar; **B.** Colónico; **C.** Sólido; **D.** Mucinoso. Hematoxilina-Eosina (X20)

Sin embargo, también se hallan entre los tumores de senos paranasales los **adenocarcinomas de tipo no-intestinal (non-ITAC)**: son un grupo heterogéneo de tumores con diferenciación glandular sin diferenciación intestinal y que no se asemejan a ningún tipo de tumor de glándulas salivales. En cuanto a sus características histológicas, la mayoría muestra un patrón sólido, con glándulas en roseta intercaladas (*Figura 3*). Las células neoplásicas son de tamaño pequeño a mediano y con escaso citoplasma ligeramente eosinofílico (80). Los adenocarcinomas de tipo no-intestinal se pueden subdividir en tumores de **bajo grado (LG-non-ITAC)** y **alto grado (HG-non-ITAC)**. Los LG-non-ITAC son muy indolentes y se definen por glándulas de tipo seromucinoso con atipia arquitectónica (glándulas fusionadas, cribiformes y formaciones papilares). Por el contrario, los HG-no-ITAC son tumores agresivos, poco diferenciados, con ocasional evidencia focal de diferenciación glandular. Los estudios moleculares sugieren que algunos casos de LG-no-ITAC albergan mutaciones (por ejemplo, CTNNB1) o fusiones (por ejemplo, ETV6:NTRK3) (78).

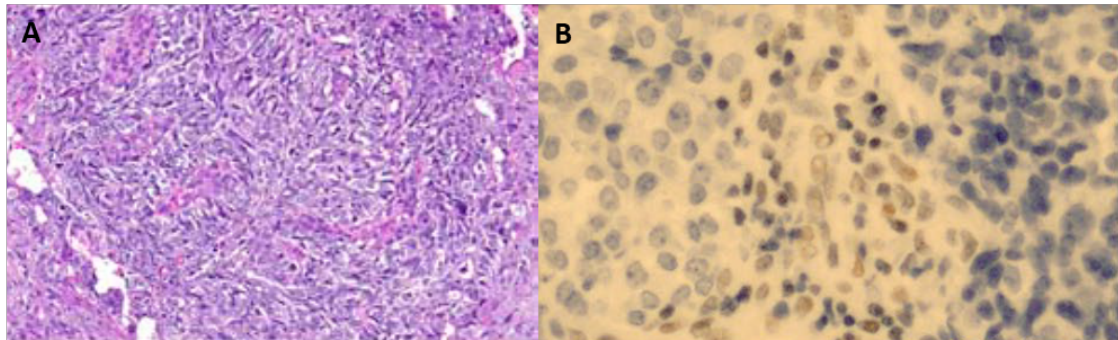




**Figura 3.** Distintos subtipos histológicos de adenocarcinoma de tipo no intestinal. **A.** Bajo grado; **B.** Alto grado. Hematoxilina-Eosina (X20)

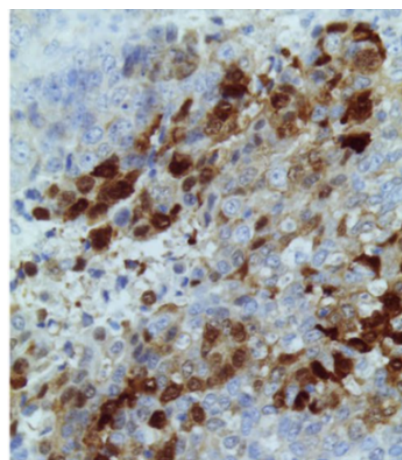
El **carcinoma indiferenciado de senos paranasales (SNUC)** es un diagnóstico de exclusión, consistente en un carcinoma de alto grado que carece de cualquier diferenciación escamosa, glandular o neuroendocrina significativa por histología y/o IHQ. El SNUC es un carcinoma de alto grado con una elevada agresividad local y sistémica. Está constituido por láminas, nidos, lóbulos o cintas de células de tamaño pequeño a mediano, sin evidencia de diferenciación escamosa o glandular. Sus células son poligonales con núcleos redondeados u ovoides, hipercromáticos, con nucléolos discretos o poco prominentes y un citoplasma moderadamente eosinofílico (*Figura 4A*). A menudo presenta numerosas mitosis y es frecuente observar tanto necrosis como invasión vascular (41). Los estudios moleculares han permitido independizar recientemente algunos subtipos caracterizados por una marca molecular específica, los cuales presentan un comportamiento clínico característico. El **carcinoma SMARCB1-deficiente**, denominado así por la pérdida de la expresión nuclear de esta proteína, es un subtipo de SNUC (61) que histológicamente está constituido por células basalioides indiferenciadas con núcleos redondos que contienen cromatina dispersa y nucleolos prominentes (*Figura 4B*). Las células neoplásicas se organizan en láminas sólidas y nidos, a menudo con empalizada periférica, rodeadas de estroma desmoplásico. Al igual que en el SNUC, las mitosis y los fenómenos de necrosis son hallazgos frecuentes (81). Estudios genéticos recientes han demostrado también que un subconjunto significativo de los SNUC alberga mutaciones de *IDH2* y estos tumores parecen tener un mejor pronóstico (82). Estos tumores no se distinguen fácilmente de los SNUC sin mutaciones

en *IDH2* por histología rutinaria o IHQ, aunque en un futuro pueden constituir una entidad tumoral independiente.



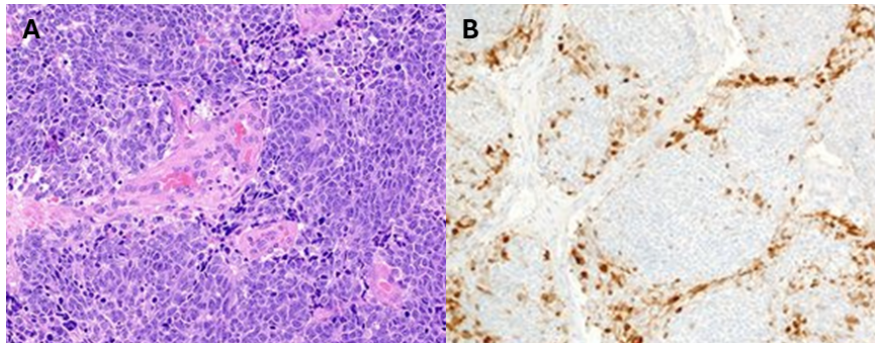
**Figura 4. A.** Carcinoma indiferenciado. Hematoxilina-Eosina (X20); **B.** Carcinoma SMARCB1-deficiente. El análisis inmunohistoquímico con anticuerpo anti-INI-1 muestra ausencia de expresión de SMARCB1, mientras que los linfocitos infiltrantes son positivos

El **carcinoma NUT** es un tumor agresivo poco diferenciado, en ocasiones con evidencia de diferenciación escamosa, que se define genéticamente por el reordenamiento del gen de la proteína nuclear en los testículos (*NUTM1*) en el cromosoma 15q14. Microscópicamente está constituido por las características “células redondas azules” que consisten en láminas, nidos y cordones de células con citoplasma eosinofílico, núcleos ovalados con uno o más nucléolos prominentes (*Figura 5*). En los casos en los que presenta diferenciación escamosa se evidencian células escamosas queratinizadas adyacentes a células indiferenciadas. Al igual que el SNUC, es frecuente observar una actividad mitótica alta, así como fenómenos de necrosis y apoptosis e invasión tanto linfovascular como ósea (83).



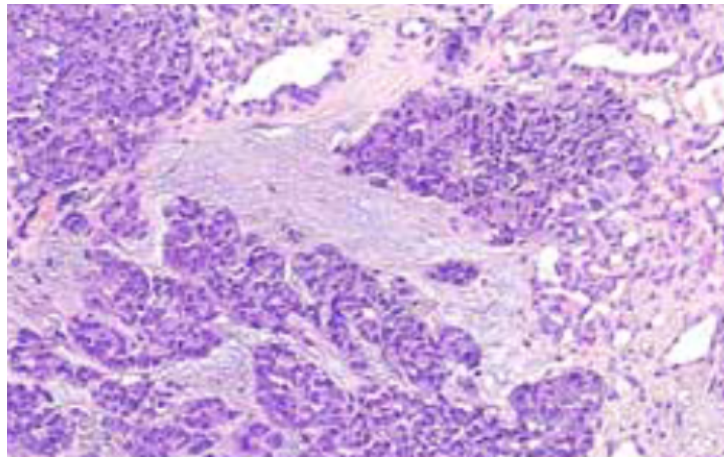
**Figura 5.** Carcinoma NUT Tinción IHQ con el anticuerpo anti-NUT-1 (X20)

El **carcinoma indiferenciado SMARCA4-deficiente** es un subtipo de SNUC constituido histológicamente por células redondeadas de pequeño tamaño, con cromatina condensada y citoplasma eosinofílico, con frecuentes fenómenos de necrosis, apoptosis y mitosis (*Figura 6*) (84).



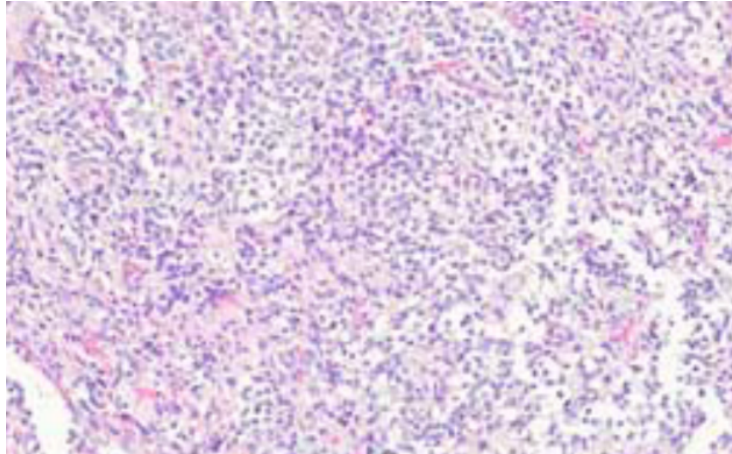
**Figura 6.** Carcinoma indiferenciado SMARCA4-deficiente. Hematoxilina-Eosina (X20); **B.** La pérdida completa de SMARCA4 es la característica definitoria de estos tumores.

El **carcinoma neuroendocrino de senos paranasales o SNEC** es un tumor epitelial que muestra diferenciación neuroendocrina, con grado histológico variable, siendo en la mayoría de los casos un tumor pobremente diferenciado (*Figura 7*) (85). La última clasificación de los tumores de senos paranasales de la OMS de 2017 (86) diferencia 2 subtipos histológicos dentro del carcinoma indiferenciado neuroendocrino: el carcinoma neuroendocrino de célula pequeña (o *small cell*), constituido por células de tamaño pequeño a intermedio con una alta proporción núcleo/citoplasma, cromatina hipercromática y actividad mitótica intensa, con frecuentes fenómenos de apoptosis y necrosis; y el carcinoma neuroendocrino de célula grande (o *large cell*), constituido por células de mayor tamaño organizadas en nidos, trabéculas y rosetas, con abundante citoplasma, núcleos ricos en cromatina, nucléolos prominentes y frecuentes fenómenos de mitosis y necrosis (87).



**Figura 7.** Carcinoma neuroendocrino. Hematoxilina-Eosina (X20)

El **estesioneuroblastoma o neuroblastoma olfatorio (ONB**, por sus siglas en inglés) es un tumor maligno con diferenciación neuroblástica derivado de la membrana olfatoria. Basado en su grado de diferenciación, se distinguen 4 grados (I-IV) según la clasificación de Hyams (88). Independientemente del grado histológico, los ONB son neoplasias con crecimiento lobulillar. Sin embargo, en los tumores de mayor grado, la estructura lobulillar a menudo se ve sustituida por un patrón de crecimiento sólido. Los ONB de grado 3 y grado 4 se caracterizan por una proliferación neoplásica hiper celular en la que las células son más anaplásicas e hiper cromáticas y tienen una actividad mitótica aumentada. Los tumores de grado 4 son más indiferenciados y anaplásicos y se caracterizan por núcleos pleomórficos, a menudo con nucléolos eosinofílicos prominentes (89). Las células neoplásicas están separadas por una matriz neurofibrilar formada por procesos de células neuronales en la que los axones pueden apreciarse mejor con tinciones de plata convencionales; esta característica es considerada de gran utilidad para su diagnóstico. Las rosetas tipo Homer-Wright también son bastante características de los ONB, pero se ven con menos frecuencia y aún menos frecuentes son las rosetas olfativas de Flexner-Wintersteiner, en las que las células se disponen formando glándulas (*Figura 8*) (90).



**Figura 8.** Estesioneuroblastoma. Hematoxilina-Eosina (X20)

#### **1.2.4 Presentación clínica**

Los tumores nasosinuales en estadios iniciales suelen ser asintomáticos o presentarse con síntomas inespecíficos, como secreción nasal, epistaxis, hiposmia o molestias locales, pudiendo simular un proceso infeccioso nasosinusal (2). Sin embargo, estos tumores suelen ser diagnosticados en estadios avanzados, en los cuales pueden asociar dolor, parestesia o anestesia, aumento del tamaño del paladar o la cara y dolor dental, debido a su alta propensión a la diseminación perineural y a causar lesión ósea. Pueden aparecer además síntomas como proptosis, diplopia, pérdida de agudeza visual y síndrome conjuntival en caso de invasión orbitaria. También puede producirse afectación de la base del cráneo durante su crecimiento, así como extensión intracraneal, incluidos el seno cavernoso y la fosa craneal anterior y media (91). La alteración o pérdida del olfato puede ser un síntoma clínico de subtipos como el ONB, aunque no es tan frecuente como cabría esperar, en parte debido a la conservación del olfato en el lado contralateral (92). En casos muy avanzados puede producirse invasión de la fosa infratemporal, afectación de la mucosa oral y piel de la mejilla y producirse deformidades faciales, *trismus* o lesiones intraorales (93).

La afectación ganglionar es infrecuente en el momento del diagnóstico, variando entre un 2-20% según la histología tumoral y las estructuras afectadas. También las metástasis a distancia son infrecuentes, variando su incidencia entre un 2-10% (60,94).

### 1.2.5 Diagnóstico

A menudo el diagnóstico de los tumores de senos paranasales se realiza de forma tardía, en estadios avanzados, lo cual ensombrece el pronóstico. Por ello es importante sospechar esta patología en pacientes con clínica nasal unilateral refractaria al tratamiento.

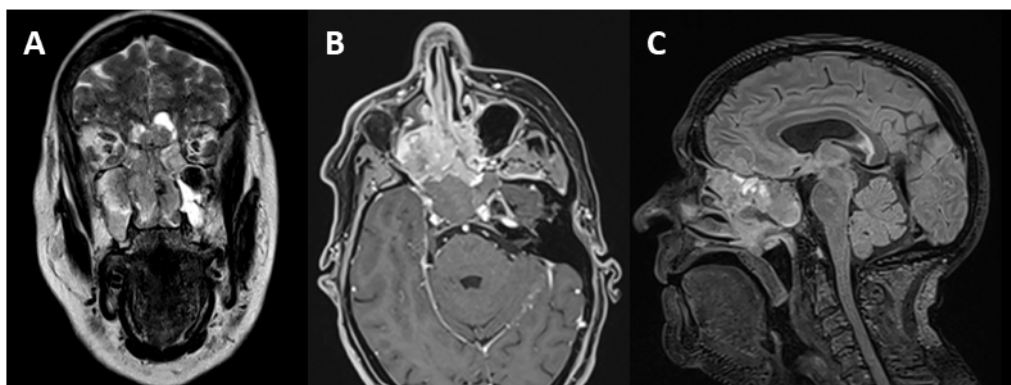
Ante la sospecha de un tumor de senos paranasales, es imprescindible realizar una historia clínica completa y una anamnesis que incluya una exploración otorrinolaringológica exhaustiva. Realizaremos una exploración nasal cuidadosa, utilizando para ello el endoscopio flexible o el rígido, pues la información que nos aporta la rinoscopia anterior en este caso es muy limitada. Es importante realizar además una exploración cervical para comprobar la presencia de metástasis ganglionares y una exploración neurológica que incluya todos los pares craneales.

Como es evidente, el diagnóstico deberá de ir apoyado siempre con pruebas de imagen, de cara a estudiar la extensión tumoral y planificar el tratamiento. Las pruebas de elección serán la tomografía computarizada (TC) (*Figura 9*), útil para valorar el compromiso de estructuras óseas y planificar tanto el tratamiento quirúrgico como el tratamiento radioterápico y la resonancia magnética (RM) (*Figura 10*), útil para valorar la afectación de tejidos blandos, así como la afectación orbitaria e intracraneal y de elección para realizar el seguimiento de estos tumores (95-97) En cuanto a la tomografía por emisión de positrones (PET) (*Figura 11*), se realizará en aquellos casos en los que se sospecha recurrencia tumoral o afectación a distancia (98).

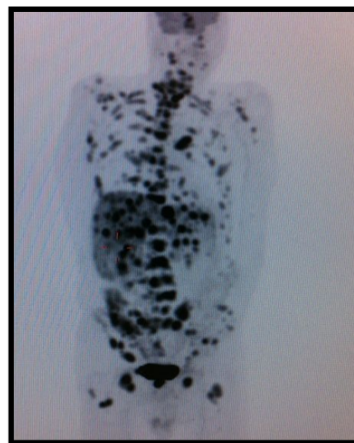
Una vez obtenida la información clínica y radiológica, es imprescindible realizar una toma de biopsia guiada por endoscopia para filiar bien el tipo histológico y el patrón molecular del tumor, de cara a orientar así el tipo de tratamiento más adecuado, pudiendo realizarse la toma de la muestra en la propia consulta o en el quirófano bajo anestesia general en caso de un eventual riesgo de sangrado importante. El estudio anatomopatológico debe ser realizado por un patólogo experto en este tipo de tumores debido a la complejidad histológica antes mencionada. En algunos casos las discrepancias entre patólogos pueden llegar a cifras del 80%.



**Figura 9.** Imágenes de TC de un carcinoma neuroendocrino de senos paranasales en las que se aprecia la afectación nasosinusal en un corte coronal (A), la probable extensión intracraneal en un corte axial (B), así como las presencia de adenopatías cervicales en corte axial (C)



**Figura 10.** RM de un carcinoma neuroendocrino de senos paranasales. A. Secuencia coronal ponderada en T2 en las que se aprecia la presencia de invasión intracraneal; B. Secuencia axial ponderada en T1 en la que se aprecia una tumoración nasosinusal con captación de contraste, permitiendo delimitar la afectación de las estructuras nasosinuales; C. Secuencia sagital ponderada en T1 que delimita la afectación intracraneal



**Figura 11.** Imagen de PET de un paciente con un ITAC con afectación metastásica ósea múltiple

### **1.2.6 Estadificación**

Para la estadificación de los tumores de senos paranasales, la clasificación utilizada en la actualidad es la correspondiente a la 8ª edición del American Joint Committee on Cancer (AJCC) y de la Organización Internacional contra el Cáncer (UICC) de 2016 (*Anexo 1*) (99).

Los tumores se clasifican de forma diferente según estén localizados en el seno maxilar o en las fosas nasales y el seno etmoidal; los tumores localizados en los senos esfenoidales o frontales no cuentan con una clasificación propia debido a su escasa incidencia.

La clasificación TNM se basa en la extensión tumoral (T), la afectación ganglionar regional (N) y la presencia de metástasis a distancia (M).

Para la estadificación de los ONB existen además otras dos clasificaciones adicionales, la clasificación de Dulguerov y la clasificación de Kadish, siendo esta última la más utilizada (*Anexo 2*) (100).

### **1.2.7 Tratamiento**

El tratamiento de estos tumores se llevará a cabo de forma individualizada en cada paciente, atendiendo a su estadio tumoral, a la histología del tumor, así como a factores propios del paciente como su edad y sus comorbilidades (2). También es importante la experiencia del equipo multidisciplinar, así como las preferencias del paciente. El manejo de estos tumores suele ser complejo y multimodal, siendo recomendable que tenga lugar en centros con experiencia que traten un número notable de pacientes.

De forma general, el tratamiento de elección para estos tumores es la cirugía, pero debido a su alta tendencia a presentar recidivas locales, se suele combinar con RT postoperatoria incluso en caso de resecciones completas con márgenes libres (2), salvo en casos excepcionales como tumores T1-T2 limitados a fosa nasal y etmoides que cumplan esta última premisa (101). En algunos subtipos histológicos seleccionados, la QT se considera útil dentro del tratamiento multimodal con fines curativos, pero en la mayoría de los casos es utilizada en tumores avanzados que no son susceptibles de



tratamiento local o en el caso de la presencia de metástasis a distancia con intención paliativa.

En cuanto a la resección quirúrgica, la técnica de elección dependerá de la localización y la extensión de la tumoración, así como del defecto resultante que habrá de ser reconstruido, pudiendo llevarse a cabo abordajes endoscópicos, abiertos o combinados (2). En los últimos años, los avances en la cirugía endoscópica han supuesto un cambio en el manejo de estas lesiones, pues mientras la mayoría requerían antes abordajes abiertos, ahora son susceptibles de resección puramente endoscópica, siendo una cirugía menos invasiva y con menor morbilidad, con resultados oncológicos comparables en términos de supervivencia (102,103). Los abordajes abiertos pueden realizarse mediante incisiones pequeñas o mediante *degloving*, evitando así secuelas estéticas y funcionales. Cuando la resección sea amplia, se requerirá en muchas ocasiones realizar una técnica reconstructiva con un colgajo regional o libre.

El tratamiento selectivo de los ganglios linfáticos del cuello no se realiza de forma rutinaria en los tumores de senos paranasales debido al bajo riesgo de metástasis regionales. Sin embargo, en el caso de los tumores indiferenciados de senos paranasales, por su mayor riesgo de dar metástasis ganglionares, se debe considerar la disección concomitante del cuello y/o la RT postoperatoria debido a la mayor frecuencia de metástasis cervicales (104).

Al igual que en el resto de los tumores de cabeza y cuello, la RT es un pilar fundamental del tratamiento de esta patología, ya sea como terapia adyuvante o en el caso de recidiva. Las nuevas técnicas de RT de intensidad modulada (IMRT), como la terapia de arco volumétrico modulado (VMAT), disminuyen en gran parte los efectos derivados de la toxicidad de este tratamiento (105). En el caso de tumores T1-T2 N0, después de cirugía radical, se recomienda RT cuando hay factores de riesgo, como márgenes positivos, invasión perineural o vascular, o en caso de histologías desfavorables (106) como es el caso de los tumores indiferenciados. Para tumores T3-T4 N0 y N+ resecables, la cirugía seguida de RT se considera el tratamiento de elección (107,108). En el caso de tumores irresecables o pacientes inoperables, la RT o la quimiorradioterapia (QRT) es el tratamiento de elección (109).

La QT neoadyuvante combinada con cirugía y/o RT es una opción en pacientes con tumores avanzados de senos paranasales. La elección del tipo de QT según el tipo histológico del tumor no está hasta el momento bien establecida, pero la pauta más utilizada es la terapia basada en platino en combinación con 5-fluorouracilo, taxanos, ifosfamida o vincristina (110,111). Dado que los tumores indiferenciados de senos paranasales son tumores muy agresivos, con frecuente fracaso del tratamiento quirúrgico locorregional y gran tendencia a metastatizar tanto a ganglios regionales como a distancia, la terapia sistémica puede tener un papel importante. El SNUC es un tumor quimiosensible, en el que la QT de inducción basada en platino combinado con doxorubicina/vincristina o docetaxel/5-fluorouracilo, seguida de cirugía y RT posoperatoria, parece el tratamiento más adecuado (112). De forma similar, se ha objetivado que esta terapia en los SNEC ha sido eficaz, con resultados casi idénticos en cuanto a supervivencia (113). En los ONB, los tumores más indiferenciados (mayor grado Hyams) son sensibles al tratamiento sistémico (114); al igual que en los anteriores, son tumores quimio y radiosensibles, por lo que se recomienda también el tratamiento multimodal (115); con respecto al régimen de quimioterapia, parece que la terapia basada en platino es útil (116) aunque también la combinación de ciclofosfamida, vincristina y doxorubicina ha demostrado utilidad (117).

Aunque el tratamiento con IT se acepta actualmente como una modalidad terapéutica en los carcinomas de células escamosas recurrentes/metastásicos, pocos estudios han investigado su papel en los tumores de senos paranasales y no se ha aprobado ninguna terapia dirigida, en parte porque estos tumores suelen excluirse de los principales ensayos clínicos. Los datos sobre la eficacia de los agentes dirigidos y los inhibidores de puntos de control inmunitario son escasos (118). Se ha publicado algún caso de SNUC (119) y de melanoma nasosinusal (120) tratados con IT, con resultados dispares.

### **1.2.8 Pronóstico**

El pronóstico de estos tumores es pobre, presentando de forma general supervivencias menores a 50% a los 5 años, pues la mayoría se diagnostican en estadios avanzados y presentan altas tasas de recurrencia loco-regional y metástasis a distancia (2). Si hablamos de cifras, los pacientes con SNUC tienen unas tasas de supervivencia a

largo plazo entre 20 y 40% (121). Más desalentador es incluso el pronóstico del carcinoma NUT, con una supervivencia global media menor de un año (6,7 meses de media) (122), aunque recientemente se ha evidenciado buena respuesta clínica a tratamientos dirigidos con inhibidores de bromodominio en este tipo de tumores (123). Para los carcinomas deficientes en SMARC-B1 se ha documentado menos de un 20% de supervivencia libre de enfermedad a los dos años aproximadamente, presentando recurrencias locorregionales aproximadamente el 30% de los pacientes y metástasis a distancia el 35% de los pacientes (124). Los SNEC a menudo presentan metástasis sistémicas al diagnóstico (hígado, pulmón, cerebro, hueso, riñón y páncreas) y presentan una supervivencia global media entre el 35-50% a los 5 años y aquellos localizados en las fosas nasales parecen tener mejor pronóstico que los localizados en el seno maxilar o etmoidal (125). La supervivencia global a los 5 y 10 años de los ITAC oscila entre el 50-60% y el 45-50% respectivamente, siendo los tumores sólidos más indiferenciados y por lo tanto los que presentan peor pronóstico (77,126); por otro lado, en los HG-non-ITAC se ha documentado una supervivencia global a los 3 años del 20% (127). Los ONB presentan una supervivencia global a los 5 años de aproximadamente el 45% (128); la recurrencia local ocurre aproximadamente en el 30%, la diseminación regional se observa en el 15-20% y las metástasis a distancia en menos del 10% de los pacientes. El riesgo de afectación ganglionar y metástasis a distancia sigue siendo alto incluso después de 5 años y se recomienda un seguimiento a largo plazo (129).

### **1.3 Aspectos inmunológicos**

#### **1.3.1 El sistema inmune y el cáncer**

Varios son los mecanismos de tumorigénesis conocidos, propuestos por Hanahan y Weinberg en 2000 (130) y 2011 (131) y recientemente actualizados en 2022 (132) (*Figura 12*). Las características distintivas incluyen: la perpetuación de la proliferación tumoral, la evasión de los supresores del crecimiento tumoral, la inmortalidad replicativa, la resistencia a la apoptosis, la inducción de la angiogénesis, así como de la adquisición de la capacidad de invasión y metastatización. Junto a todos estos mecanismos subyacen tanto la inflamación como la inestabilidad genómica (131).



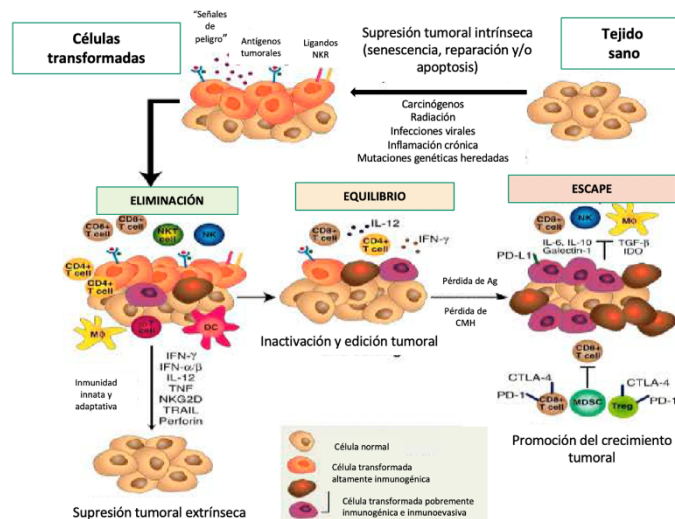
**Figura 12. Las características distintivas del cáncer.** A la izquierda, se muestran las 8 capacidades distintivas y 2 características habilitadoras. A la derecha, otras características emergentes propuestas (132).

Una de las características del proceso de oncogénesis es la capacidad que tienen los tumores para evadir la respuesta inmune del huésped, siendo el papel del sistema inmune en el crecimiento y la progresión tumoral indiscutible. La teoría de Burnet y Thomas sobre la capacidad del sistema inmune para interactuar con el tejido tumoral, detectando y destruyendo las células tumorales durante todo el proceso de desarrollo y progresión de la enfermedad es universalmente aceptada (133). Esta interacción puede tanto potenciar como inhibir el crecimiento tumoral y el equilibrio entre estas dos posibilidades determinará el desarrollo o no de la enfermedad. En general, las células T citotóxicas (Tc) CD8+ y las células T helper (Th) CD4+ inhiben la tumorigénesis a través de mecanismos que comúnmente involucran la producción de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y citotoxinas, pero otros factores, como la inflamación crónica, pueden interferir en este proceso, favoreciendo el desarrollo de la enfermedad (134,135).

La respuesta del sistema inmune estaría iniciada por señales producidas por la célula tumoral (antígenos tumorales específicos o neoantígenos) y sostenida por las células efectoras del sistema inmune, tanto innato como adaptativo. A pesar de este primer control inmune tumoral, el tumor es capaz de evolucionar y continuar su crecimiento hasta llegar a matar al huésped. Por ello, se ha planteado que la ineficacia de la respuesta inmune pueda ser debida a la selección de células tumorales con mecanismos de resistencia inmunológicos que le proporcionen una ventaja evolutiva.

El desarrollo del cáncer se caracteriza por la acumulación de un número variable de alteraciones genéticas y la pérdida de los procesos naturales de regulación del ciclo

celular. Así, en el proceso de transformación maligna, las células sanas sometidas a situaciones de estrés, como radiaciones ionizantes, carcinógenos, procesos inflamatorios crónicos o infecciones virales, pueden sufrir cambios en su genoma, con la modificación de la expresión de proteínas clave para el control de la proliferación celular y con la aparición de mutaciones. Estos cambios pueden propiciar la aparición de neoantígenos, la expresión de antígenos de diferenciación de la línea germinal o la expresión diferencial de proteínas, que podrán ser presentados en la superficie celular unidos a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (CPH), distinguiéndolos de las células normales. Estas moléculas pueden ser vistas como antígenos por el sistema inmune, lo que permite entender el potencial que la inmunoterapia tiene en el tratamiento del cáncer. Es decir, podemos considerar las células tumorales como inmunogénicas y podemos clasificar antígenos tumorales en base a su especificidad y selectividad para expresarse y distinguir a las células tumorales del resto de células sanas. Los complejos péptido(antígenos)-CPH-I específicos de las células cancerosas pueden ser reconocidos por las células T CD8 +. Esto permitiría la eliminación de la célula transformada y la protección del organismo. Sin embargo, a veces, a pesar de que el sistema inmunitario reconoce al tumor y lo combate, no es capaz de eliminarlo por completo, llegando a una situación de equilibrio en la que el tumor, aunque no es eliminado, no crece de forma descontrolada. Este equilibrio puede romperse a favor del crecimiento del tumor, por una inestabilidad genética, por la aparición de mutaciones de escape, permitiendo el escape tumoral. A este proceso de transformación maligna y curación o de progresión tumoral se le conoce como el proceso de las 3E (Eliminación, Equilibrio, Escape) (136) (*Figura 13*).



**Figura 13.** Proceso de transformación oncogénica y evasión del sistema inmune (136)

De modo un poco más pormenorizado, para que una respuesta inmune contra el cáncer consiga la muerte efectiva de células cancerosas, se han de iniciar una serie de eventos a los que nos referiremos como el ciclo de cáncer-inmunidad (137). En el primer paso, los neoantígenos generados en el proceso de oncogénesis puede ser liberados y capturados por las células dendríticas (CD) para su procesamiento (paso 1) y presentación a los linfocitos T y la activación de una respuesta T tumor específica. Para que este paso pueda producir una respuesta antitumoral, debe estar acompañado por señales pro-inmunitarias y no tolerogénicas. Tales señales inmunogénicas pueden incluir citoquinas proinflamatorias y factores liberados por las células tumorales. A continuación, las células presentadoras de antígeno (CPA) presentan los antígenos capturados en las moléculas CPH-I y CPH-II a las células T (paso 2), lo que resulta en la activación de las células T efectoras frente a los antígenos específicos del cáncer (paso 3) que son vistos como extraños y no han sido eliminados en el proceso de tolerancia central. La naturaleza de la respuesta inmune se determina en esta etapa, con un balance crítico que representa la relación de células efectoras T frente a las células T reguladoras que son clave para el resultado final. Finalmente, el linfocito T activado inicia su tráfico por el organismo (paso 4) y se infiltra en el lecho tumoral (paso 5) para reconocer y unirse específicamente a las células cancerosas a través de la interacción entre su receptor de células T (TCR) y el antígeno unido a CPH-I (paso 6) y matar a la célula tumoral (paso 7). La muerte del tumor promueve la liberación de más antígenos

adicionales que pueden favorecer la activación de más linfocitos T contra otros antígenos tumorales (paso 1 de nuevo) para aumentar la amplitud y profundidad de la respuesta (2) (Figura 14).

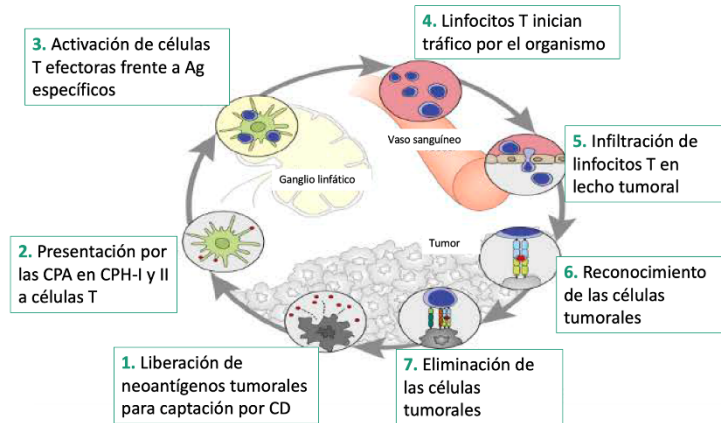


Figura 14. El ciclo "inmunidad-cáncer" (137)

### 1.3.2 Mecanismos de evasión de la respuesta inmune

En los pacientes con cáncer, el ciclo de inmunidad-cáncer no funciona de manera óptima en uno o varios de los pasos, conduciendo a que las células tumorales desarrollen mecanismos de evasión de la respuesta inmune, favoreciendo la oncogénesis (Figura 15) (138).

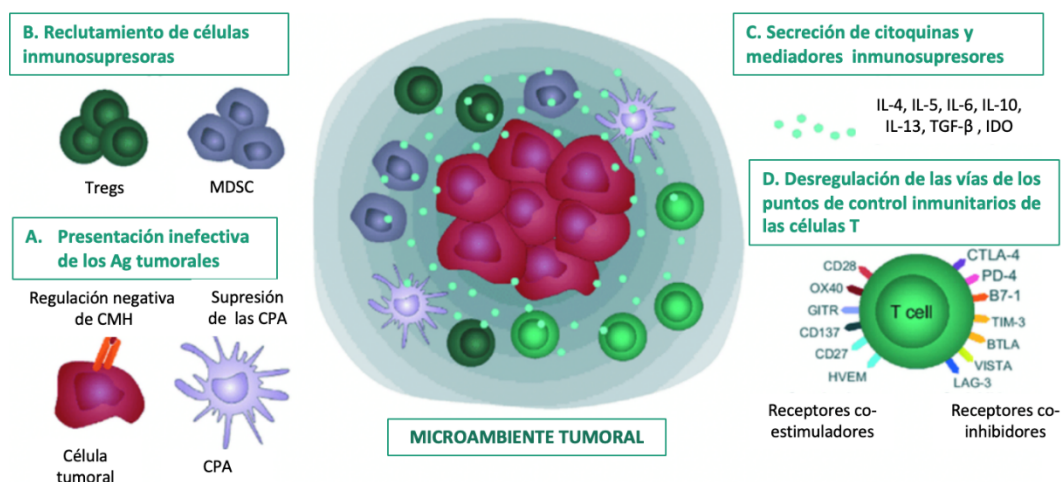


Figura 15. Mecanismos de evasión tumoral (138)

Los mecanismos utilizados por las células tumorales para evadir al sistema inmune son varios: la alteración de las CPA, la inhibición mediada por las células

reguladoras, la generación de mediadores que inhiben esta respuesta inmune, el desarrollo de tolerancia inmune y la inhibición de la acción de los linfocitos Tc y otras células efectoras (139).

En primer lugar, los antígenos tumorales pueden no ser detectados por las CPA o no ser correctamente presentados y las células T pueden tratar a estos antígenos como auto-antígenos y activar respuestas de células T reguladoras en lugar de respuestas T efectoras, provocando un ambiente inmunosupresor en el tumor (140). Para tratar de modificar esta respuesta, algunos quimioterápicos favorecen la expresión de antígenos y una muerte inmunogénica y proinflamatoria.

La presentación de péptidos en la superficie es crítica para la activación y función de los linfocitos T CD8 + y las células *Natural Killer* (NK), incluyendo aquellos contra los tumores. Un mecanismo de evasión del sistema inmune es la alteración de las CPA. Algunos factores, como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), la interleucina (IL)-10 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) se ven implicados en la alteración de la maduración de las células dendríticas (141). Las células dendríticas inmaduras son un tipo de CPA que presentan bajos niveles de CD80, CD86 y CD40 y una expresión aumentada de indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), contribuyendo a la supresión de la inmunidad mediada por los linfocitos Tc (142). Además, los tumores son capaces de interferir en el proceso de presentación de antígenos alterando la vía del CPH-I, las subunidades del proteosoma, las proteínas latentes de la membrana tipo 2 (LMP2) y tipo 7 (LMP7), el transportador asociado al procesamiento de antígenos (TAP) y la tapasina. Todas estas alteraciones conllevarán una disminución de la presentación de antígenos tumorales a los linfocitos T citotóxicos, lo que puede producir una mayor incidencia de tumores y metástasis (139). Estos fenómenos se han observado en muchos tumores, aunque su función como factor pronóstico no ha sido establecida (142).

Una vez que el antígeno ha sido presentado en la superficie de la CPA o en la célula tumoral, éste debe ser reconocido por el linfocito T e iniciarse el proceso de activación del linfocito T y ulterior proliferación. La unión entre las membranas de ambas células es lo que se conoce como sinapsis inmunológica (SI). La SI ayuda a la activación de los linfocitos T y media la proliferación linfocitaria y la secreción de las citoquinas por los CD4+ o gránulos efectoras por los linfocitos CD8+. Para la activación completa de las



células T se requieren 2 señales, tanto una señal específica de antígeno proporcionada por la unión al TCR (primera señal) como una señal coestimuladora mediada por las CPA (segunda señal) (143). Sin embargo, las células tumorales pueden evadir la respuesta inmune mediante el desarrollo de una tolerancia inmunitaria. La mayoría de las células tumorales no van a expresar moléculas coestimuladoras, lo que puede inducir anergia o tolerancia a los linfocitos T al producirse la unión a su receptor en ausencia de coestimulación (143,144). Además, la presencia de señales co-inhibidoras (como PD-L1) en la SI puede dificultar o frenar totalmente este reconocimiento antigénico y la funcionalidad de los linfocitos, produciendo una situación de anergia (145). Para que haya una respuesta efectiva debe haber un equilibrio de las señales de co-estímulo/co-inhibición y una producción de citoquinas que favorezcan la activación y proliferación celular. Existe además un mecanismo de “desviación inmunitaria” mediante el cual las células tumorales alteran el equilibrio de Th1 a Th2 a través de mediadoras como el TGF- $\beta$  y la IL-10 (146). Por otro lado, la menor expresión de receptores de muerte celular va a prevenir la apoptosis mediada por los linfocitos T citotóxicos y por las células NK (147). Todos estos factores que promueven la tolerancia y la desviación inmunitaria contribuyen significativamente a la evasión de la respuesta inmune. En la actualidad se han diseñado diversas estrategias terapéuticas dirigidas a inhibir las señales de co-inhibición para favorecer la estimulación en la SI.

Los linfocitos han de entrar en contacto físico con las células cancerosas. Para ello, estos linfocitos interactúan con moléculas de adhesión presentes en las células de un endotelio inflamado y se inicia el proceso de extravasado del linfocito al tejido tumoral. Existen evidencias de que los tumores pueden exhibir el fenómeno de privilegio inmune, en el cual el tejido está protegido de la entrada y el ataque inmunológico. Una presión intersticial elevada, una permeabilidad heterogénea y el flujo sanguíneo irregular junto con la expresión reducida de moléculas de adhesión, IL y otras moléculas, tanto en las células endoteliales como en las células intersticiales (como la prostaglandina E<sub>2</sub> o PGE<sub>2</sub>, VEGF, IL10) limitan la penetración de linfocitos al tumor, favoreciendo la inmunosupresión. Además, la producción de algunos factores tumorales reduce la expresión de moléculas de adhesión, dificultando la interacción entre los linfocitos y el endotelio (148), por lo que el acceso de los linfocitos al tumor se ve

dificultado. Por lo anteriormente expuesto, se sabe que existe un enriquecimiento de algunos tipos celulares en el tumor y una ausencia de otros, lo que indica que hay una discriminación en el reclutamiento y la entrada de células. Además, las condiciones de hipoxia en el lecho tumoral provocan la apoptosis de los linfocitos. El IFN- $\beta$  favorece la expresión de la enzima IDO, que metaboliza el triptófano generando kinureninas que son inmunosupresoras y la expresión de PD-L1, que no sólo impiden la proliferación, sino que pueden provocar la apoptosis celular.

Una vez que el linfocito ha sido activado y expresa los receptores de quimiocinas adecuados, deberá migrar a los sitios de inflamación o a los tejidos tumorales e infiltrarse en el tejido para escanear la presencia de un antígeno específico. Esto puede estar dificultado por aspectos ya mencionados, como la falta de presentación antigénica por parte de la célula tumoral debida a la pérdida de expresión o la regulación a la baja de la maquinaria presentadora de antígeno. A estos problemas de presentación antigénica hay que sumarle la presencia de proteínas inhibidoras de los puntos de control, la presencia de células Treg y células mieloides supresoras, o las moléculas inmunosupresoras IDO, arginasa, IL-10, PGE<sub>2</sub> o TGF- $\beta$ , que harán todavía más difícil la llegada de los linfocitos T al lecho tumoral, así como su funcionalidad. La supresión inmunitaria mediada por células Tregs (CD4+, CD25+), una subpoblación linfocitaria que se caracteriza por expresar factores como Foxp3, CTLA4 o GITR (proteína relacionada con el receptor del factor de necrosis tumoral inducido por corticoides), es un mecanismo importante en la evasión de la respuesta inmune (149,150). Se ha observado que las células Tregs inducidas por los tumores tienen mayor actividad supresora que las células Tregs naturales (151). Estas células Tregs inducidas por el tumor van a inhibir a los linfocitos T citotóxicos de forma directa o mediante la liberación de sustancias, como la IL-10 o el TGF- $\beta$ . El TGF- $\beta$ , además, induce la expresión de CD73 en la superficie de las Tregs, lo cual contribuye también a la inhibición de la respuesta inmune (152). Diversos estudios han demostrado la presencia de un mayor número de Tregs en pacientes con diferentes tipos de tumores, como tumores ováricos y pulmonares (153). Sin embargo, su papel como factor pronóstico no está aclarado, pues mientras que parecen conferir un peor pronóstico en algunos tumores, como los tumores ováricos (154), también podrían conferir mejor pronóstico en algunos tipos de tumores

gastrointestinales, como el cáncer colorrectal (155). Por otro lado, la supresión inmunitaria mediada por las células supresoras derivadas de la serie mieloide (MDSC) favorece la creación de un microambiente inflamatorio y pueden favorecer tanto la tumorigénesis como los procesos de angiogénesis y metastatización (156). Además, el aumento de los niveles de mediadores inflamatorios confiere cierta resistencia a la apoptosis de las MDSC, que en condiciones normales está regulada por los linfocitos T CD8+ (157); estas células además favorecen la inducción de Tregs (158) y la inhibición de algunas CPA como las células dendríticas (159). Se ha demostrado la presencia de un número aumentado de estas células en tumores como el melanoma (160). Otras células reguladoras implicadas en el mecanismo de evasión de la respuesta inmune son los macrófagos fenotipo M2, que son los predominantes en las condiciones de acidosis e hipoxia del microambiente tumoral (161). Estos macrófagos producen altos niveles de TGF- $\beta$ , IL-10 y VEGF, promoviendo el crecimiento tumoral (162).

Los mediadores liberados por los tumores o el endotelio tumoral para evadir la respuesta inmune son diversos (139). El TGF- $\beta$  cobra un papel importante a este respecto (152,163). Otros mediadores solubles importantes son el factor de necrosis tumoral (TNF), el factor estimulante de colonias (CSF) (164) y algunas IL como IL-1, IL-6 e IL-10, PGE<sub>2</sub> y adenosina, que puede directamente inhibir a los linfocitos T, los IFN tipo I y factores como STAT1 (factor transductor de señal y activador de la transcripción 1) y STAT3 o factores de transcripción inflamatorios como NF- $\kappa$ B (factor nuclear potenciador de cadena k-ligera de células B activadas) (165-168). Además, muchos tumores expresan moléculas de superficie como FasL y TRAIL, que pueden matar directamente a las células T. También pueden presentar proteínas como PD-L1, PD-L2 y B7-H4, que pueden suprimir las funciones de las células T y detener el rechazo del tumor. Adicionalmente, el microambiente de las células tumorales puede ser muy tóxico para la función de las células T. La privación de sustratos metabólicos como resultado del consumo competitivo por las células tumorales y/o el agotamiento activo por enzimas tales como laIDO y arginasa puede atenuar aún más la función efectora de estas células. Finalmente, las condiciones de hipoxia y el pH extracelular relativamente más bajo del intersticio del tumor pueden afectar negativamente a la función linfocitaria.

### **1.3.3 El microambiente tumoral**

El microambiente tumoral (TME, del inglés “tumor microenvironment”) se compone de varios tipos de células: células tumorales, células del estroma tumoral (células mesenquimales, células endoteliales, fibroblastos y pericitos) y células inmunes (linfocitos T y B, células NK, macrófagos, polimorfonucleares, células plasmáticas), además de factores inmunomoduladores. Todos estos componentes son influidos por el tumor para favorecer su progresión, protegiendo a las células tumorales de la respuesta inmune. Por lo tanto, el TME es un conjunto de células y factores solubles que actúa como una especie de reóstato inmune, contribuyendo a la progresión tumoral (169). El reto ahora es utilizar este conocimiento para desarrollar medicamentos e implementar nuevas estrategias clínicas.

Uno de los componentes principales del TME son los linfocitos infiltrantes asociados al tumor (TILs; del inglés “tumor infiltrating lymphocytes”). Los TILs son linfocitos Tc que se encuentran en el interior del tumor. Estos linfocitos presentan una mayor reactividad inmunológica específica en el entorno tumoral, siendo los linfocitos Tc CD8+ (TILs CD8+) el subconjunto más importante. Los TILs CD8+ pueden ejercer su función de forma directa mediante su efecto citotóxico sobre las células tumorales o de forma indirecta mediante la liberación de citoquinas como el IFN- $\gamma$  o el TNF- $\alpha$  (169). De igual manera, la acción de estos linfocitos puede ser inhibida al interaccionar con las células tumorales de forma directa o de forma indirecta mediante exosomas como FasL liberados por estas células (170). Diversos estudios han demostrado que un mayor número de TILs CD8+ confiere un mejor pronóstico en algunos tipos de tumores, como en algunos tipos de cáncer de mama, el cáncer colorrectal, el melanoma o el cáncer de ovario (171-174). Además, se ha comprobado que los TILs CD8+ juegan un papel importante en la respuesta inmune en los cánceres de cabeza y cuello (175) y algunos tumores de senos paranasales como el SNSCC y el ITAC (22,176).

Otras células del TME son las células NK, capaces de actuar contra las células tumorales de forma directa o indirecta mediante la activación de otras células como linfocitos T, macrófagos o células dendríticas. Su función también podrá ser inhibida por las células tumorales de forma directa o indirecta mediante la liberación de quimiocinas como CXCL2 o el mismo TGF- $\beta$  (177). El papel como factor pronóstico de las células NK

intratumorales no ha sido claramente dilucidado, confiriendo mejor pronóstico en algunos tumores (entre ellos en tumores de cabeza y cuello) y peor en otros (178).

En base a la presencia de TILs y a la expresión de PD-L1 se ha propuesto una clasificación de los tumores en diferentes inmunofenotipos (179). El fenotipo *inmuno-inflamado* se caracteriza por presentar en el parénquima tumoral TILs tanto CD4+ como CD8+, células mieloides y monocitos en proximidad a las células tumorales. Tiene una alta expresión de PD-L1 y gran cantidad de citoquinas pro-inflamatorias. Este fenotipo implica probablemente que hubiera previamente una respuesta inmune tumoral que se encuentra regulada negativamente debido a factores inmunosupresores del microambiente. Aunque los pacientes con este fenotipo son los más propensos a presentar una respuesta a la inhibición de PD-1, no todos se benefician del tratamiento, por lo que debe haber otros mecanismos co-inhibitorios que dificulten la restitución de la capacidad inmunitaria. El segundo fenotipo, *inmuno-excluido*, se caracteriza también por la presencia de células inmunes, pero éstas se encuentran en el estroma que rodea al tumor sin infiltrarlo. En este caso, se postula que habría habido igualmente una respuesta inmune tumoral, pero que por las características del estroma o por bloqueo tumoral los linfocitos no son capaces de infiltrarse en las células tumorales. El tratamiento de estos tumores con anti-PD-1 muestra activación de linfocitos T, pero no promueve su infiltración en el tumor. El último fenotipo sería el *inmuno-desértico*, caracterizado por una leve o nula infiltración de linfocitos T tanto en el parénquima tumoral como en el estroma. Probablemente estos tumores no hayan promovido previamente una respuesta inmune antitumoral en el paciente. Los fenotipos *inmuno-excluido* e *inmuno-desértico* se consideran tumores “no inflamados”. Se caracterizan por presentar un ambiente inmunosupresor y de tolerancia, con infiltración de Tregs, MDSC y macrófagos M2. Aunque los Tregs no son exclusivos de los tumores no inflamados, ya que son células que acompañan a los linfocitos T efectores y las podemos encontrar igualmente en los tumores inflamados regulando la homeostasis inmune.

El microambiente tumoral no va a ser el mismo para todos los tumores; varios estudios ponen de manifiesto que cada tumor crea su propio TME diferenciándolo de tumores con su misma histopatología (180). De hecho, aunque la mayoría de los tumores de cabeza y cuello comparten su origen epidermoide, al localizarse en diversas

regiones anatómicas (laringe, cavidad oral, orofaringe, nariz, senos paranasales, etc.), son tumores muy heterogéneos y su microambiente tumoral es diferente. Se ha especulado incluso que una de las causas de que los tumores relacionados con el VPH tengan un mejor pronóstico es de hecho la interacción de este virus con el microambiente tumoral (181). También se ha comprobado que los tratamientos antitumorales (ya sea QT o RT) alteran este microambiente, por lo que se presupone que los cambios inducidos por las terapias convencionales podrían ser útiles como biomarcadores para el uso de inmunoterapia (182).

El microambiente tumoral de los carcinomas escamosos de cabeza y cuello es llamativamente inmunosupresor. Presenta diversos factores inhibidores secretados por el tumor, como TGF- $\beta$ , IL-6, IL-10, PD-L1 y JAG-1, pero escasa cantidad de sustancias con efecto antitumoral como IL-2 e IFN- $\gamma$ . En este microambiente tumoral, las células T se diferencian mayoritariamente en Treg o Th17 y no en linfocitos efectores Th1 productores de IFN- $\gamma$ , favoreciendo así la progresión de la enfermedad. Además, estos Treg van a sobreexpresar factores que como CTLA-4, PD-1, TIM-3 y LAP asociado con TGF- $\beta$ , potenciando las funciones inmunosupresoras y disminuyendo por tanto la inmunidad antitumoral (183). Los mecanismos moleculares que utilizan estas Treg u otras células reguladoras para mediar la supresión inmunitaria en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1. Mecanismos que utilizan las células inmunes para mediar la supresión inmunitaria en los CECC**

Rutas de señalización alteradas	Efecto sobre las células
<b>EGF/EGFR</b>	↑ Resistencia tumoral a la respuesta inmune ↑ Producción de citoquinas / factores con efecto inhibidor ↑ Función supresora de los Tregs
<b>IL-6, EGF, VEGF/STAT3</b>	↑ Resistencia tumoral a la respuesta inmune ↑ Producción de citoquinas / factores con efecto inhibidor ↓ Maduración de las células dendríticas ↓ Actividad citolítica de linfocitos T citotóxicos y células NK
<b>Cox-2/PGE2 PI3K/COX-2/PGE2</b>	↑ Resistencia tumoral a la respuesta inmune ↓ Funciones de las células inmunes mediante la ruta cAMP ↓ Supervivencia de las células inmunes
<b>PD-1/PD-L1</b>	↑ Señales autocrinas tumorales y supervivencia ↓ Funciones antitumorales de linfocitos T, B, células NK y monocitos ↑ Tregs y funciones supresoras
<b>TGF-β/ TGF-βRI+RII</b>	↑ Crecimiento tumoral ↓ Funciones de linfocitos T CD8+, diferenciación de linfocitos CD4+ a Tregs y Th17
<b>Adenosina/A2AR Ectoenzimas CD39/CD73</b>	↓ Funciones de linfocitos T mediante la ruta cAMP ↑ Producción de adenosina ↑ Señalización A2AR ↓ Funciones de las células inmunes
<b>Fas/FasL</b>	↑ Apoptosis de linfocitos T CD8+ activados
<b>JAG-1/NOTCH-1</b>	↑ Resistencia tumoral a la respuesta inmune ↓ Funciones de las células inmunes ↑proliferación de Tregs

#### 1.3.4 Inmunoterapia

La inmunoterapia, cuyo fundamento es aumentar la inmunidad natural del individuo para eliminar las células tumorales, ha supuesto un gran avance en el tratamiento del cáncer (184). Cuando hablamos de inmunoterapia nos referimos a dos tipos: activa y pasiva. La primera se fundamenta en la estimulación *in vivo* de las células inmunes mediante la administración de células que activen el sistema inmune o de mediadores inmunológicos, mientras que la segunda se basa en la utilización de agentes obtenidos *in vitro* dirigidos frente a antígenos específicos (185). Las principales modalidades de inmunoterapia son las siguientes (*Figura 16*):

- Terapias con virus oncolíticos: utilizan virus genéticamente modificados para infectar las células tumorales y generar un ambiente proinflamatorio que aumenta la inmunidad antitumoral. Por ejemplo, talimogene laherparepvec (T-Vec), un virus del herpes simple modificado genéticamente, ha demostrado gran utilidad para el tratamiento del melanoma metastásico no resecable (186).
- Vacunas contra el cáncer: utilizan antígenos específicos de tumores para desencadenar respuestas inmunitarias antitumorales mediadas por células T. También la vacunación basada en células dendríticas ha demostrado buenos resultados clínicos, como en el caso de sipuleucel-T, una terapia aprobada para el tratamiento del cáncer de próstata avanzado (187). Además, las propias células tumorales también se pueden utilizar para provocar inmunidad espontánea, como en el caso de GVAX, una vacuna contra el cáncer compuesta por tumor autólogo cuyas células han sido genéticamente modificadas para secretar factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y ha mostrado eficacia en varios tipos de tumores (188,189).
- Terapias con citoquinas: las citoquinas son liberadas en condiciones normales en respuesta a situaciones de estrés celular. Van a permitir una propagación rápida de la señalización inmunitaria, generando una respuesta inmune potente dirigida contra los antígenos diana (190). Cabe destacar aquí la utilización de IL-2 (191) o interferón alfa (IFN- $\alpha$ ) (192).
- Terapia celular “adoptiva”: utiliza células inmunitarias autólogas, en particular células T, que se modifican genéticamente *ex vivo* y se reinfunden a los pacientes para eliminar las células tumorales (193). Actualmente, las dos terapias de este tipo más utilizadas son las terapias de células CAR-T (linfocitos T con receptor de antígeno quimérico), que utilizan fragmentos de anticuerpos para reconocer antígenos específicos expresados en la superficie de las células tumorales (194) y la transfección del TCR, que se basa en la transferencia del gen del TCR a la sangre periférica para generar células T efectoras con reactividad antitumoral (195).
- Inhibidores de los “checkpoin” o puntos de control inmunitario. Estos puntos de control inmunitario, como el receptor del antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4), el gen 3 de activación de linfocitos (LAG3), la mucina 3 de



inmunoglobulina de células T (TIM-3) y PD-1, regulan la función de los linfocitos T citotóxicos. Cuando estas moléculas se unen a sus respectivos ligandos, van a bloquear la función de los linfocitos T y con ello la respuesta inmune contra las células tumorales. Los más conocidos son el receptor del antígeno 4 del linfocito T citotóxico CTLA-4 y PD-1 (134,184). Existen anticuerpos monoclonales específicos que inhiben estos puntos de control inmunitario. El primero en ser aprobado fue el ipilimumab, un anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4; posteriormente se aprobaron algunos anticuerpos anti-PD-1 como el nivolumab y el pembrolizumab y anti-PD-L1 como el atezolizumab. Ambos anticuerpos anti-PD-1, nivolumab y pembrolizumab fueron aprobados por la FDA en 2016 para el tratamiento del CECC avanzado (196,197).

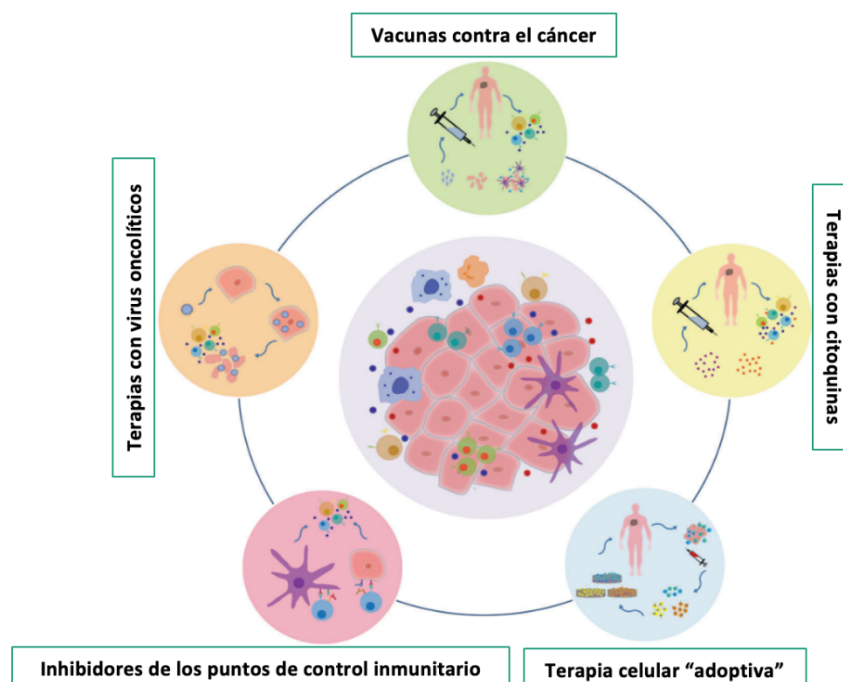


Figura 16. Modalidades de inmunoterapia (185)

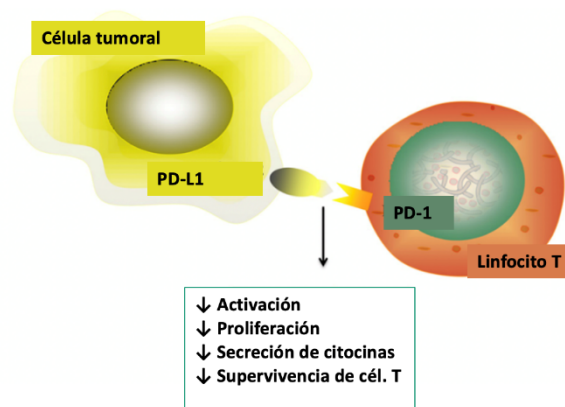
### 1.3.5 El receptor PD-1 y su ligando PD-L1

El receptor de PD-1, también llamado receptor CD279, es una proteína transmembrana de 55 kDa que contiene 288 aminoácidos con un dominio N-terminal extracelular (similar a IgV), un dominio transmembrana y una cola citoplásmica ubicada en los extremos N y C, respectivamente, con dos bases de tirosina (198). Es un inhibidor

tanto de la respuesta adaptativa como de la respuesta innata y se expresa en linfocitos T activados, linfocitos B, células NK, macrófagos, células dendríticas y monocitos (199). Es de destacar que la expresión de PD-1 es especialmente alta en células T tumorales (200).

Su ligando PD-L1, también conocido como CD279 o B7-H1, es una glicoproteína transmembrana tipo 1 de 33 kDa que contiene 290 aminoácidos con dominios Ig- e IgC en su región extracelular (201). Generalmente se expresa en macrófagos, algunos linfocitos T activados, linfocitos B, células dendríticas y algunas células epiteliales, particularmente en condiciones inflamatorias (202). Además, las células tumorales expresan PD-L1 como un “mecanismo inmunitario adaptativo” para evadir la respuesta inmune. PD-L1 se relaciona con un microambiente tumoral rico en linfocitos T CD8 (203).

La vía PD-1/PD-L1 controla la inducción y el mantenimiento de la tolerancia inmune dentro del microambiente tumoral. La interacción entre el receptor PD-1 en los linfocitos T CD8+ y el ligando PD-L1 de las CPA evita tanto reacciones autoinmunes como daños tisulares secundarios a la respuesta inmune desencadenada tras un proceso inflamatorio o una infección (204,205) mediante la inhibición de la activación y la proliferación de las células T efectoras, la disminución de la supervivencia de estas células T y la disminución de la secreción citotóxica dentro de la célula tumoral (*Figura 17*) (7).



**Figura 17.** Interacción PD-1 y PD-L1 (7)

La interacción entre el ligando PD-L1 de las células neoplásicas y el receptor PD-1 de los linfocitos T CD8+ supone un mecanismo importante de evasión de la respuesta

inmune. Además, la expresión de PD-L1 en las células inmunes y tumorales está fuertemente asociada con la expresión de PD-1 en los TILs, lo que indicaría la presencia de un microambiente inmunológico reactivo (206).

#### **1.3.5.1 Papel en inmunoterapia**

En los últimos años el desarrollo de anticuerpos monoclonales dirigidos contra PD-1 y PD-L1 ha supuesto un avance importante en la terapia de los tumores en estadio avanzado. La unión de estos anticuerpos monoclonales bloquea esta interacción receptor-ligando, restaurando la actividad de los linfocitos T y con ello la respuesta inmune antitumoral (205).

Hasta hoy, han sido aprobados a nivel mundial en total diez anticuerpos anti-PD-1 (nivolumab, pembrolizumab, cemiplimab, sintilimab, camrelizumab, toripalimab, tislelizumab, zimberelimab, prolgolimab y dostarlimab) y tres anticuerpos anti-PD-L1 (atezolizumab, durvalumab y avelumab) para el tratamiento de varios tipos de tumores en estadio avanzado (207) (Tabla 2).

Tabla 2. Anticuerpos monoclonales dirigidos contra PD-1 y PD-L1 y sus indicaciones (207)

Diana	Fármaco	Año de aprobación y país	Indicación
PD-1	Nivolumab	2014 (EEUU)	Melanoma
		2015 (UE)	Carcinoma pulmonar célula no pequeña
		2018 (RPC)	Carcinoma pulmonar célula pequeña
			Carcinoma renal
			Linfoma Hodking
			<b>Carcinoma de cabeza y cuello</b>
			Carcinoma urotelial
			Carcinoma colorrectal
			Carcinoma hepatocelular
			Carcinoma esofágico
	Mesotelioma pleural		
	Cáncer gástrico		
	Carcinoma unión esofagogástrica		
	2014 (EEUU)	Melanoma	
	2015 (UE)	Carcinoma pulmonar célula no pequeña	
	2018 (RPC)	Carcinoma pulmonar célula pequeña	
		Carcinoma renal	
		Linfoma Hodking	
		<b>Carcinoma de cabeza y cuello</b>	
		Carcinoma urotelial	
		Carcinoma colorrectal	
		Carcinoma hepatocelular	
		Carcinoma esofágico	
		Cáncer gástrico	
		Carcinoma unión esofagogástrica	
		Cáncer de mama triple negativo	
		Cáncer de vejiga	
		Cáncer de cérvix	
		Cáncer de endometrio	
	Cemiplimab	2018 (EEUU)	Carcinoma cutáneo de célula escamosa
		2019 (UE)	Carcinoma pulmonar célula no pequeña
	Toripalimab	2018 (RPC)	Melanoma
			<b>Carcinoma de cabeza y cuello</b>
			Carcinoma urotelial
	Sintilimab	2018 (RPC)	Carcinoma pulmonar célula no pequeña
			Linfoma Hodking
			<b>Carcinoma de cabeza y cuello</b>
	Camrelizumab	2019 (RPC)	Carcinoma pulmonar célula no pequeña

		Linfoma Hodking <b>Carcinoma de cabeza y cuello</b> Carcinoma hepatocelular Carcinoma esofágico
	<b>Tislelizumab</b>	2019 (RPC) Carcinoma pulmonar célula no pequeña Linfoma Hodking Carcinoma urotelial
	<b>Zimberelimab</b>	2021 (RPC) Linfoma Hodking
	<b>Prolgolimab</b>	2020 (UE) Melanoma
	<b>Dostarlimab</b>	2021 (UE) 2021 (EEUU) Cáncer de endometrio
	<b>Atezolizumab</b>	2016 (EEUU) 2017 (UE) 2020 (RPC) Melanoma Carcinoma pulmonar célula no pequeña Carcinoma pulmonar célula pequeña Carcinoma Urotelial Carcinoma hepatocelular Carcinoma unión esofagogástrica
<b>PD-L1</b>	<b>Durvalumab</b>	2017 (EEUU) 2018 (UE) 2019 (RPC) Carcinoma pulmonar célula no pequeña Carcinoma pulmonar célula pequeña Cáncer de vejiga
	<b>Avelumab</b>	2017 (UE) 2017 (EEUU) Melanoma Carcinoma renal Carcinoma urotelial

**EEUU** (Estados Unidos), **UE** (Unión Europea), **RPC** (República Popular China)

Como ya hemos mencionado, pocos estudios hasta la fecha han investigado el papel de la IT en los tumores de senos paranasales y no se ha aprobado ninguna terapia dirigida, al excluirse habitualmente estos tumores de los principales ensayos clínicos, por lo que los datos sobre la eficacia de estas terapias en este tipo concreto de tumores son escasos (118). En un estudio publicado por Denaro *et al.* en 2021 (119), se administró tratamiento con nivolumab a un paciente con un SNUC que tras ser tratado con cirugía y QRT presentó extensión intracraneal y metástasis pulmonares; el paciente logró una respuesta completa con dicho tratamiento, permaneciendo libre de enfermedad en el momento de la publicación de dicho estudio, aunque dicha respuesta no se relacionó con la expresión de PD-L1 ni la presencia de TILs CD8+. Sin embargo, en otro estudio realizado por Klebaner *et al.* en 2020 (120), en el que se incluyeron 704 pacientes con melanoma nasosinusal, 94 de los cuales fueron tratados con IT, no se demostró un aumento en la supervivencia respecto al tratamiento standard.

### **1.3.6 Utilidad clínica del análisis de la expresión de PD-1/PD-L1**

Hoy en día el estudio inmunohistoquímico o molecular a la hora de seleccionar aquellos casos más susceptibles de beneficiarse de los agentes dirigidos contra la vía PD-1/PD-L1 es una práctica habitual, sobre todo teniendo en cuenta los posibles efectos adversos autoinmunes de estos fármacos. Si bien hasta ahora no se ha dilucidado un marcador con verdadero poder predictivo a la hora de estimar la eficacia de los tratamientos con agentes anti-PD-1/PD-L1, parece que la expresión de PD-L1 en las células tumorales podría predecir una respuesta clínica favorable a estos agentes (207-209) y actualmente es el biomarcador más comúnmente utilizado. Además, se ha observado que la presencia de TILs CD8+ en el microambiente tumoral induce la expresión de PD-L1 mediante la liberación de IFN- $\gamma$  (16,17). De hecho, actualmente se reconocen cuatro tipos de microambiente tumoral basados en la expresión de PD-L1 y la presencia de TILs CD8+: tipo I (PD-L1+ TILs+), tipo II (PD-L1- TILs-), tipo III (PD-L1+ TILs-) y tipo IV (PD-L1- TILs+), siendo los tumores con un TME de tipo I los que tienen mayor probabilidad de responder a las terapias anti-PD-1/PD-L1 (210). Hay que tener en cuenta que PD-L1 puede estar presente tanto en las células tumorales como en las células inmunes, ya sea en los TILs o en los macrófagos asociados al tumor.

En un estudio realizado en 2019 acerca de las 45 indicaciones de fármacos anti-PD-1/PD-L1 aprobadas hasta ese momento (16), se objetivó que la expresión de PD-L1 había sido estudiada en 9 casos, incluyendo 3 casos de cáncer de vejiga, 3 casos de carcinoma pulmonar de célula no pequeña, 1 caso de cáncer de mama triple negativo y 1 caso de cáncer gástrico/unión gastroesofágica. De los 45 casos incluidos, la expresión de PD-L1 resultó tener un valor predictivo en el 28,9% de las aprobaciones, mientras que no fue predictiva en el 53,3% de los casos y no fue analizada en el 17,8% de los casos restantes. Este estudio pone de manifiesto que la expresión de PD-L1 como biomarcador predictivo de respuesta a agentes inmunoterápicos tiene limitaciones por el momento al no estar estandarizada, pues los niveles para considerar positiva dicha expresión fueron variables (1, 5 y 50%) tanto entre diferentes tipos de tumor como dentro del mismo tipo de tumor en diferentes estudios; además, las células en las que se midió la expresión de PD-L1 (células tumorales, TILs o ambas) también diferían entre los diferentes estudios.

### **1.3.6.1 Análisis de la expresión de PD-1/PD-L1**

La detección de PD-L1 mediante IHQ es actualmente la única prueba predictiva de respuesta a fármacos dirigidos contra PD-1/PD-L1 aprobada (211). El estudio inmunohistoquímico de PD-L1 debe realizarse sobre tejido tumoral fijado en formol e incluido en parafina y las muestras tumorales deben de contener al menos 100 células viables (208,211). Existen diferentes anticuerpos anti-PD-L1 utilizados para el estudio inmunohistoquímico, cada uno de los cuales identifica diferentes epítomos de la molécula. Estos antígenos pueden estar dirigidos frente al dominio extracelular (SP263, 22C3 y 28-8) o intracelular (E1L3N y SP142) y el empleo de antígenos diferentes puede generar resultados diferentes. Igualmente, la tinción también puede verse modificada según el sistema químico de visualización empleado. Por estos motivos, para cada uno se utiliza un test de detección IHQ concreto (212,213).

El resultado se valora mediante el porcentaje de células tumorales positivas para PD-L1. El porcentaje mínimo de células que expresan PD-L1 para poder considerar la tinción positiva no está establecido; los puntos de corte utilizados varían entre  $\geq 1\%$ ,  $\geq 5\%$ ,  $\geq 10\%$  y  $\geq 50\%$  de las células tumorales, según diferentes estudios (214-216). Dos estudios clínicos recientes en el campo de la inmunoterapia en tumores de cabeza y cuello consideran el punto de corte  $\geq 5\%$  el más apropiado (196,217).

Existen dos principales patrones de tinción, el membranoso y el citoplasmático. El patrón membranoso se considera positivo cuando se observa una tinción completa de la membrana celular y es considerado como el biomarcador principal para predecir la respuesta a las terapias anti-PD-1/PD-L1 según algunos autores (218).

### **1.3.7 Papel de PD-L1 en los tumores de senos paranasales**

El papel de la expresión de PD-L1 en los tumores de senos paranasales no ha sido claramente dilucidado hasta la fecha debido a la escasa cantidad de estudios publicados, si bien en los últimos años el número de publicaciones acerca de este tema se está viendo incrementado. Existen algunos estudios que estudian la expresión de PD-L1 en los SNSCC y en los ITAC. No obstante, las publicaciones centradas en tumores pobremente diferenciados de senos paranasales siguen siendo muy escasas.

En el estudio de Riobello *et al.* (22) realizado por nuestro grupo de investigación en 2018, se analizó la expresión de PD-L1 en 53 casos de SNSCC y 126 ITAC, observando una expresión positiva de PD-L1 en el 34% de los SNSCC y en el 17% de los ITAC, si bien esta expresión no se correlacionaba con parámetros clinicopatológicos ni actuaba como factor pronóstico. García-Marín *et al.* (27) en 2020 estudiaron la expresión de PD-L1 y la presencia de TILs CD8+ en una serie de 133 ITACS, demostrando una positividad para PD-L1 en el 26% de los casos, aunque no demostró valor pronóstico. La expresión de PD-L1 tanto en macrófagos como en células tumorales se correlacionaba positivamente con la presencia de TILs CD8+. En otro estudio realizado por García-Marín *et al.* (26) en 2021 se analizaron también la expresión de PD-L1 y la presencia de TILs CD8+ en una serie de 57 SNSCC, demostrando positividad de PD-L1 en el 46% de los casos; además, se vio también que dicha expresión se presentaba juntamente con la presencia de TILs CD8+, conformando el denominado microambiente tumoral tipo I, presentando sin embargo los pacientes peores resultados en cuanto a supervivencia.

En el estudio realizado por Quan *et al.* en 2019 (176), se observó la expresión de PD-L1 en un 30,2% de los pacientes con SNSCC. Dicha expresión se correlacionó también de forma significativa con niveles altos de TILs CD8+ y con un peor pronóstico. También Hongo *et al.* (219) demostraron en su estudio realizado en 2021 una expresión positiva de PD-L1 en el 45,8% de 131 SNSCC de su serie, confirmando peores resultados de supervivencia.

En el estudio llevado a cabo por London *et al.* (220) en 2019, se estudió la expresión de PD-L1 en una serie de 10 ONB primarios y 4 metástasis cervicales de dicho tumor, que resultó positiva en 4/10 de los primarios y en 3/4 de las metástasis. Esta expresión no mostró diferencias significativas en la supervivencia y no se observó correlación con el grado histológico de Hyams. Se objetivó una correlación positiva entre la expresión de PD-L1 y la presencia de TILs CD8+, sugiriendo que al igual los SNSCC, estos tumores pobremente diferenciados podrían ser inmunogénicos y beneficiarse del tratamiento con fármacos inmunoterápicos.



## **1.4 Inestabilidad de microsatélites**

### **1.4.1 Inestabilidad genómica y cáncer**

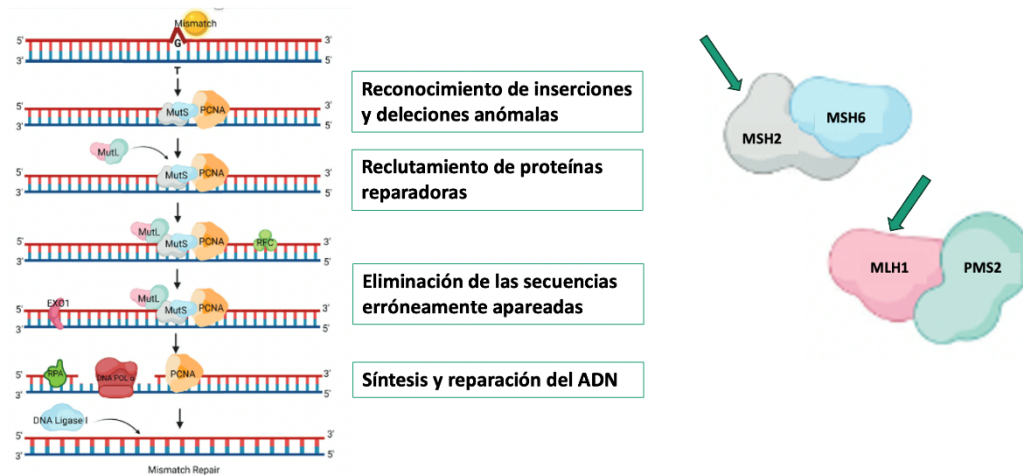
Los microsatélites son secuencias cortas de ADN que pueden ser mono-, di-, tri-, tetra- o pentanucleótidos de bases repetidas a lo largo del genoma. En el genoma humano hay aproximadamente medio millón de microsatélites distribuidos en regiones tanto codificantes como no codificantes. Precisamente esta naturaleza repetitiva es la que va a hacer de estas regiones unas regiones altamente susceptibles de sufrir errores en el apareamiento por fallos de la ADN polimerasa (221). La MSI se define como un aumento o disminución de la longitud de los microsatélites en el ADN de las células tumorales en comparación con el ADN de las células no tumorales. Las mutaciones en los genes del sistema de reparación de apareamiento erróneos o “mismatch repair” (MMR) impiden que los errores de replicación cometidos por la ADN polimerasa sean reparados, lo que dará lugar a la aparición de un fenotipo mutador y con ello una elevada tasa de mutación celular, causando la MSI. El cáncer será el resultado de la acumulación estas alteraciones genéticas que permiten el crecimiento de las células tumorales (222). La MSI secundaria a mutaciones germinales en el ADN de las proteínas reparadoras del sistema MMR es la principal alteración molecular en el síndrome de Lynch, una enfermedad tumoral de herencia autosómica dominante; por otro lado, la inactivación epigenética de los genes de este sistema es más habitual en el caso de tumores esporádicos (223).

La MSI se ha asociado clásicamente con los cánceres colorrectales, en los que su eficacia clínica ha sido bien establecida (224). Sin embargo, en los últimos años también se ha demostrado la implicación de la MSI en otros tipos de tumores, como los tumores endometriales, ováricos, gástricos y prostáticos (225-227). Estudios recientes sugieren que la MSI podría ser un biomarcador útil para seleccionar a aquellos pacientes más susceptibles de beneficiarse del tratamiento con fármacos bloqueadores de los puntos de control inmunitario (228-230). Este beneficio probablemente se deba al reconocimiento de neoantígenos por parte de los linfocitos T fomentado por mutaciones somáticas, que por otro lado también podrían favorecer la oncogénesis al inactivar genes supresores de tumores (231).

#### **1.4.2 Sistema Mismatch Repair (MMR)**

El sistema de reparación de apareamientos erróneos o “mismatch repair” (MMR) se encarga de mantener la estabilidad del genoma. Las células del organismo tienden a acumular errores en su genoma a lo largo del tiempo como resultado de agentes tanto endógenos como exógenos; además, también se producen errores en el procesamiento normal del ADN, tanto en la recombinación como en la replicación, induciendo inestabilidad genómica. Este sistema “mismatch repair” (MMR) es un sistema altamente conservado entre las diferentes especies y es una vía importante para proteger al ADN de los efectos deletéreos de todas estas mutaciones, corrigiendo los errores que se producen y con ello previniendo el desarrollo y la progresión tumoral (232). Esto ha sido demostrado clínicamente, pues se ha visto que la inactivación de este sistema MMR se asocia a una mayor tasa de mutaciones en las células tumorales y que la inactivación hereditaria de este sistema se asocia a una mayor predisposición al desarrollo de neoplasias a edades tempranas (233).

Las acciones llevadas a cabo por este sistema MMR incluyen el reconocimiento de las inserciones y las deleciones anómalas, el reclutamiento de proteínas reparadoras, la eliminación de estas secuencias erróneamente apareadas y la síntesis y reparación del ADN. Los efectores de tal labor van a ser los heterodímeros de proteínas reparadoras MSH2-MSH6 y MLH1-PMS2. El dímero MSH2-MSH6 reconoce la secuencia en la que se ha producido ese apareamiento erróneo, se une a la cadena de ADN e inicia el reclutamiento del dímero MLH1-PMS2. Posteriormente se producirá el reclutamiento de otras proteínas reparadoras, como el antígeno nuclear de proliferación celular, el factor de replicación C, la exonucleasa 1, la proteína de replicación A o la ADN ligasa 1, que completarán el proceso de reparación del ADN (*Figura 18*) (221). En cada heterodímero hay una proteína dominante que se encarga de estabilizar a la complementaria e impide la degradación prematura; estas proteínas “dominantes” son MLH1 y MSH2. Además, todas estas acciones llevadas a cabo por el sistema MMR tienen lugar durante la fase G2 del ciclo celular durante la recombinación meiótica y mitótica, lo que facilita que aquellas secuencias erróneas irreparables sean eliminadas por apoptosis (233).



**Figura 18.** Representación gráfica del sistema MMR de reparación del ADN (221)

La presencia de un sistema MMR deficiente (d-MMR) será causada por mutaciones o deleciones en las citadas proteínas o en el promotor de metilación MLH1. Los genes MSH3 y MLH3 forman parte del sistema MMR en otras especies; sin embargo, a día de hoy existe una falta de evidencia sobre el potencial patogénico de la alteración de estos genes, por lo que no son estudiados de rutina en la práctica clínica (221).

### 1.4.3 MSI y MMR

En la práctica clínica, se considera que existe una alta inestabilidad de microsatélites (MSI “high” o MSI-H) según el límite de apareamientos erróneos que se observen en los diferentes paneles utilizados si se realiza su análisis mediante PCR. Por ejemplo, el panel Bethesda, uno de los más utilizados, consta de dos loci mononucleotídicos (BAT-25 y BAT-26) y tres loci trinucleotídicos (D2S123, D5S346 y D17S250); los tumores en los que se objetiva alteración en dos o más loci serán considerados como tumores con una alta inestabilidad de microsatélites, mientras que aquellos con alteración en un solo loci se considerará que tienen una baja tasa de inestabilidad de microsatélites (MSI “low” o MSI-L). Según estudios recientes, los tumores MSI-low se consideran tumores con estabilidad de microsatélites, y no con MSI (234).

Por lo tanto, en la práctica clínica, una alta tasa de inestabilidad de microsatélites (MSI-H) se corresponderá con la pérdida de función o la inactivación de las proteínas del

sistema mismatch repair (MMR deficiente o d-MMR), aunque ambos términos no son exactamente equivalentes y sus diferencias se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3. Diferencias entre una elevada MSI y una alteración en el mecanismo MMR (234)**

d-MMR	MSI-H
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Se define como la inactivación del sistema de reparación de apareamientos erróneos o MMR</li> <li>● Predispone a la presencia de una alta tasa de MSI (MSI-H)</li> <li>● Analizado mediante técnicas IHQs que detecten la pérdida de expresión de las proteínas que componen este sistema (MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2) o por técnicas de secuenciación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Se define como una alteración molecular que confiere un fenotipo hipermutador</li> <li>● Se produce como resultado de errores en el sistema de reparación de apareamientos erróneos o MMR</li> <li>● Caracterizada por secuencias altamente repetitivas de ADN que no están presentes en el ADN germinal</li> <li>● Su presencia representa una evidencia fenotípica de un funcionamiento anómalo del sistema MMR</li> <li>● Analizada mediante la comparación de la longitud de los diferentes microsatélites mediante PCR o técnicas de secuenciación</li> </ul>

#### 1.4.4 Análisis de MSI

Existen diversas técnicas para estudiar la presencia de MSI, que pueden dividirse en dos grupos principales: el estudio de la expresión defectuosa de las proteínas del sistema MMR mediante IHQ o la determinación de la MSI mediante técnicas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) previamente descrita o las técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS) (223,234).

Por su amplia disponibilidad y su relativa sencillez tanto a la hora de ser realizada como de ser interpretada, la IHQ es actualmente la técnica más recomendada para el estudio de la MSI (nivel de recomendación A) (233). Como se ha mencionado anteriormente, las proteínas reparadoras del sistema MMR funcionan como heterodímeros con una proteína dominante en cada pareja, por lo que durante un tiempo se especuló que el estudio de la expresión de PMS2 y MSH6 podría ser suficiente; sin embargo, en algunas publicaciones se ha observado la presencia de la pérdida aislada de expresión de MSH2, casos con expresión muy leve de MSH6 y pérdida completa de MSH2 y casos con pérdida heterogénea de la expresión de MSH6 (235-237), por lo que

actualmente se recomienda el estudio inmunohistoquímico de las cuatro proteínas involucradas en este sistema. La mayoría de las mutaciones en los genes del sistema MMR interfieren en la dimerización de las proteínas, lo que dará lugar a la degradación proteolítica de los heterodímeros con la consiguiente pérdida de ambas proteínas (tanto “dominante” como “secundaria”). Las mutaciones en las proteínas “dominantes” (MLH1 y MSH2) darán lugar a la pérdida de expresión de ambas proteínas al degradarse el heterodímero; sin embargo, cuando se producen mutaciones en los genes de las proteínas “secundarias” (PMS2 y MSH6), los heterodímeros pueden permanecer estables al suplirse la acción de estas proteínas secundarias por otras como MSH3 en lugar de MSH6 y MLH3 o PMS1 en lugar de PMS2. Ya que esta unión con estas proteínas alternativas también dará lugar a un funcionamiento defectuoso del sistema MMR, la recomendación actual es utilizar los cuatro anticuerpos para el estudio inmunohistoquímico y en caso de duda en la interpretación del resultado, hacer uso de la PCR para estudiar la MSI (nivel de recomendación B) (238,239). Para la interpretación de la IHQ, es preferible realizar el estudio sobre muestras quirúrgicas que sobre biopsias, ya que así se analizará un mayor número de células, se podrá realizar una selección más adecuada de la muestra, podremos obtener también material de control procedente de tejido sano e, incluso, de cara al tratamiento inmunoterápico, nos permitirá realizar también un estudio inmunohistoquímico para la detección de la expresión de PD-L1 en el mismo material (234).

La técnica de PCR para la detección de MSI tiene un nivel de recomendación B (234). Estará indicada en caso de resultados indeterminados en el estudio IHQ, discrepancias entre observadores o en caso de pérdida de expresión de una sola proteína del heterodímero (por ejemplo, sólo MLH1 o sólo PMS2). La técnica tradicional, como se mencionó anteriormente, se basa en la amplificación de los marcadores de los microsatélites con dos posibles paneles: uno que utiliza cinco microsatélites que comprenden dos mononucleótidos (BAT-25 y BAT-26) y tres dinucleótidos (D5S346, D2S123 y D17S250) y otro que utiliza cinco repeticiones de mononucleótidos poli-A (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24, NR-27), siendo este último el más recomendado por su mayor sensibilidad y especificidad. La MSI se define como la pérdida de estabilidad en dos de los cinco marcadores de microsatélites.

En cuanto a las técnicas de NGS, se basan en la secuenciación dirigida de genes específicos o del exoma/genoma completo. Son capaces de detectar la MSI o el déficit de proteínas del sistema MMR comparando la secuenciación de los microsatélites tanto en el tejido tumoral como en el tejido de control o cuantificando las mutaciones identificadas en los exones, respectivamente (223,240). A pesar de ofrecer diversas ventajas, como la posibilidad de detectar varios biomarcadores simultáneamente y de poder ser utilizada en diferentes tipos de tumores, actualmente tienen un nivel de recomendación C para el estudio de la MSI, debido a su menor disponibilidad y a su coste más elevado (221).

#### **1.4.5 Utilidad en inmunoterapia**

Recientemente, la MSI se ha postulado como un biomarcador potencialmente útil para predecir la respuesta a la inmunoterapia independientemente de la histología y la localización del tumor (241). Diversos ensayos clínicos han demostrado una respuesta satisfactoria al tratamiento con pembrolizumab en tumores con MSI-H/dMMR que habían progresado tras tratamiento con QT (242,243). Dados estos hallazgos, en 2017 la FDA agilizó la aprobación de este fármaco como tratamiento de segunda línea en tumores sólidos con MSI/dMMR irresecables o metastásicos, independientemente de la localización del tumor primario y la estirpe histológica, siendo la primera vez que un fármaco era indicado independientemente de la localización (32,33). Del mismo modo, el nivolumab fue aprobado por la FDA para el tratamiento del carcinoma colorrectal metastásico MSI-H/dMMR que presenta progresión al tratamiento quimioterápico tras demostrarse su eficacia significativa y duradera en el estudio CheckMate 142 (244). En un estudio llevado a cabo por Le DT *et al.* se demostró un promedio de 1782 mutaciones somáticas y 578 neoantígenos potenciales en tumores que presentaban MSI frente a 73 mutaciones somáticas y 21 neoantígenos en pacientes que no la presentaban ( $p=0.007$ ). Se observó que un mayor número de estas mutaciones somáticas y neoantígenos se correlacionaba con mejores respuestas al tratamiento con inhibidores de los puntos de control inmunitario y supervivencias libres de progresión más duraderas (245). Además, diversos estudios han observado que los tumores con MSI presentan también una mayor tasa de CD8+ TILs (244) y una mayor tasa de expresión de PD-L1 (246,247).

#### **1.4.6 MSI en el cáncer nasosinusal**

La MSI en el caso de los tumores de senos paranasales ha sido poco estudiada hasta el momento. En dos estudios recientes en los que se analizó la expresión de MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2, se observó que un 3,2% (4/125 casos) y un 2,3% (3/131 casos) respectivamente presentaban MSI por pérdida o reducción de expresión de PMS2 y MLH1 (219,248). Además, en el estudio realizado por Hieggelke *et al.* (248), tras analizar 10 SNSCC utilizando PCR múltiple con el panel de cinco mononucleótidos (BAT25, BAT26, D5S346, D2S123, D17S250), se objetivó una línea celular con alteración en el sistema MMR (248). En otro estudio llevado a cabo por nuestro grupo, García-Martínez *et al.* demostraron la presencia de MSI en el 21% (5/24 casos) de SNSCC y en un 2% (1/41 casos) de ITAC (30).

2

---

# HIPÓTESIS



Los tumores de senos paranasales son tumores poco frecuentes con mal pronóstico a pesar de los diversos tratamientos disponibles. Las terapias dirigidas para los tumores en estadios avanzados o que han recidivado podrían desempeñar un papel importante en la mejora del pronóstico.

Se ha demostrado la utilidad de la expresión tumoral de PD-L1 y del número de TILs CD8+ como biomarcadores de respuesta a la inmunoterapia anti-PD-1 tanto en los carcinomas de células escamosas de laringe y faringe como en otras estirpes histológicas de senos paranasales como los SNSCC y los ITAC, por lo que podrían suponer una opción terapéutica también para los tumores pobremente diferenciados.

Aunque hasta la fecha la MSI ha sido poco estudiada en tumores de senos paranasales, también podría ser un biomarcador potencialmente útil para predecir la respuesta a la inmunoterapia independientemente de la histología y la localización del tumor.

El conocimiento tanto de la expresión de PD-L1 y del microambiente tumoral como de la presencia de MSI en los tumores pobremente diferenciados de senos paranasales permitiría establecer relaciones con algunas variables clínico-patológicas y seleccionar aquellos pacientes susceptibles de ser tratados con los anticuerpos monoclonales anti-PD-1/PD-L1.

3

---

# OBJETIVOS

### **3.1 Objetivo principal**

- Determinar la presencia de TILs CD8+, la expresión de PD-L1 y la presencia de MSI como posibles biomarcadores para la selección de pacientes susceptibles de beneficiarse del tratamiento con inmunoterapia en tumores pobremente diferenciados de senos paranasales.

### **3.2 Objetivos específicos**

- Describir las variables clínico-patológicas más reseñables de nuestra serie de pacientes con tumores pobremente diferenciados de senos paranasales.
- Determinar el nivel de TILs CD8+, mediante IHQ, en las muestras tumorales de los pacientes de nuestra serie.
- Determinar la expresión de PD-L1, mediante IHQ, en las muestras tumorales de los pacientes de nuestra serie.
- Determinar la presencia de MSI, entendida como pérdida de expresión de las proteínas del sistema MMR, mediante IHQ, en las muestras tumorales de los pacientes de nuestra serie.
- Relacionar el nivel de TILs CD8+, la expresión de PD-L1 y la presencia de MSI con las variables clínico-patológicas estudiadas y con la supervivencia.

4

---

**MATERIAL y  
MÉTODO**

#### **4.1 Pacientes estudiados**

Se estudiaron de forma retrospectiva 69 casos de tumores pobremente diferenciados de senos paranasales, incluyendo 14 ONB, 25 SNUC, 6 SNEC, 6 carcinomas de células escamosas pobremente diferenciados (PD-SNSCC), 5 HG-no-ITAC, 10 ITAC con patrón sólido, 1 carcinoma deficiente en SMARCB1, 1 carcinoma deficiente en SMARCA4 y 1 carcinoma NUT.

Las muestras fueron obtenidas de pacientes tratados en el Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Central de Asturias, (HUCA), Oviedo, España; del Centro Médico VU (VUmc), Ámsterdam, Países Bajos y del Centro Médico Universitario de Utrecht (UMC), Utrecht, Países Bajos.

Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Ético Institucional del Hospital Universitario Central de Asturias y por el CEIC Regional del Principado de Asturias (números de aprobación 07/16 para el proyecto CICPF16008-HERM, 83/17 para el proyecto PI17/00763 y 2020.048 para el proyecto PI19/00191). Se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes.

El diagnóstico inicial de todos los casos fue revisado por un patólogo experimentado en el diagnóstico de tumores de senos paranasales. En cada caso se revisaron todas las muestras disponibles y se utilizaron los criterios diagnósticos descritos en la cuarta edición de la Clasificación de la Organización Mundial de la Salud (86). Cuando fue necesario, se aplicaron tinciones IHQ adicionales de CK5/6, CK20, CDX2, p40, p16, sinaptofisina, cromogranina, NUT, SMARCB1 y SMARCA4. Como ninguno de los tumores fue positivo para p16, no se realizaron más pruebas de detección del VPH. Además, también se estudió la presencia de la mutación IDH2 mediante IHQ y secuenciación Sanger.

#### **4.2 Recogida de la muestra**

Las muestras estudiadas procedían de 69 tumores pobremente diferenciados primarios, procedentes de los bancos de tumores de los centros anteriormente descritos. El trabajo de laboratorio se realizó en el Laboratorio de Otorrinolaringología del Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA).

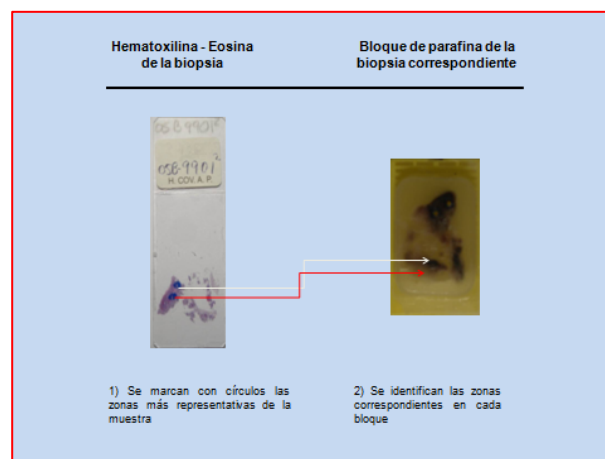
Para realizar los estudios mediante IHQ se utilizaron muestras de tejido tumoral fijado en formol e incluido en parafina.

### 4.3 Técnica de los “Tissue Arrays”

Se empleó la técnica conocida como “Tissue Arrays”, introducida en 1998 por Kononen *et al.* (249), en la cual se extrae un cilindro de tejido tumoral con una aguja de 1 mm de diámetro y se coloca en el bloque “receptor”, en el que se disponen de forma matricial un gran número de cilindros. Las principales ventajas de esta técnica son la reducción del tiempo empleado, el menor consumo de tejido y el menor coste del material, así como la posibilidad de realizar un análisis simultáneo y estandarizado de múltiples muestras tumorales. Entre los inconvenientes destacan el reducido tamaño de la muestra, la heterogeneidad de la tinción, la eventual pérdida de cilindros y la selección incorrecta del tejido.

#### 4.3.1 Selección de las zonas a muestrear

Se realizan cortes de los bloques incluidos en el estudio y se tiñen con hematoxilina-eosina. Las láminas correspondientes a cada bloque son analizadas por el patólogo, que elige las áreas más representativas y las marca con al menos 3 círculos de 1 mm de diámetro para poder identificar las zonas correspondientes en cada bloque (Figura 19).



**Figura 19.** Selección de la zona en los “tissue-arrays”

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

Se elabora el esquema topográfico del “Tissue Array” en una Tabla de Microsoft Office Word que dispone de tantas casillas como cilindros de tejido. En cada casilla se añade el número de biopsia identificativo.

Se realizan bloques de “Tissue Array” de 2 x 2,5 cm, con pocillos de tumor de 1 mm separados por 1,5 mm (Figura 20).

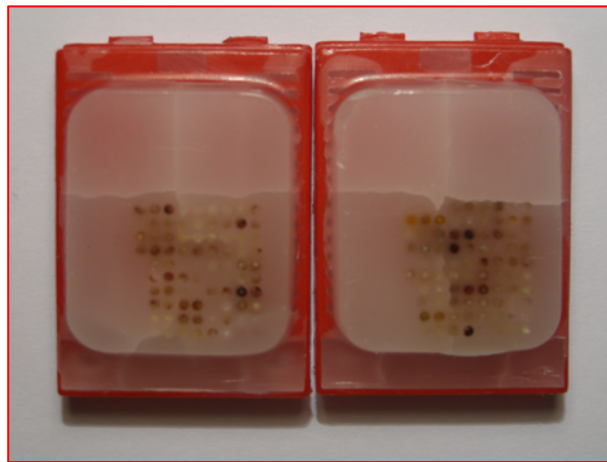


Figura 20. Bloques “tissue arrays” de 2 x 2,5 cm con 87 muestras por bloque

#### 4.3.3 Elaboración del “Tissue Array”

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

#### 4.3.4 Secciones del bloque

Se realizan las secciones de una sola tanda, para evitar la pérdida de tejido que supone reorientar el bloque. Se realizan cortes de 3  $\mu$ m y en el primer corte útil se realiza una tinción de hematoxilina-eosina de control. Si son necesarias más de 20 secciones,

se debe realizar un corte de control por cada 20 secciones y se tiñe con hematoxilina-eosina (Figura 21).

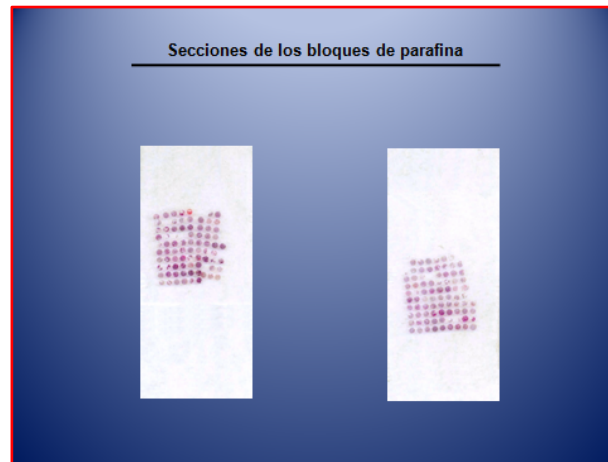


Figura 21. Tinción hematoxilina-eosina de control

#### 4.3.5 Requerimientos mínimos estándar del "Tissue Array"

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

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

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

#### 4.4 Análisis mediante IHQ

Para el análisis inmunohistoquímico se utiliza un anticuerpo marcado con un enzima que se unirá a un antígeno específico. Esta unión antígeno-anticuerpo se visualiza mediante la actividad enzimática, lo que nos permite identificar la localización tisular o citológica de una sustancia específica.

Las muestras tumorales obtenidas mediante toma de biopsia o cirugía se fijaron con formalina y se incluyeron en parafina. Cuando se disponía de varios bloques de parafina para un mismo tumor, se seleccionó el bloque más representativo. Los bloques de microarrays de tejido se prepararon utilizando Beecher Tissue Microarray (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, EE. UU.). En total, se construyeron 4 bloques que contenían tres núcleos de 1 mm de diferentes áreas de los 69 tumores.



La técnica IHQ se realizó en el inmunoteñidor automático (Dako Autostainer Plus; DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca). Se introducen las muestras en un buffer de lavado y en una solución bloqueante de peroxidasa durante 5 minutos y se añade el anticuerpo monoclonal primario dirigido hacia la proteína que deseamos detectar durante un tiempo variable, dependiendo del tipo de anticuerpo utilizado. Para el estudio del microambiente tumoral, se estudió la presencia de TILs CD8+ utilizando el anticuerpo monoclonal anti-CD8 de ratón clon C8/144B, IR623 (Monoclonal Mouse Anti-Human CD8, DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca). Para el estudio de la expresión de PD-L1 se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 de conejo clon E1L3N (1/100 Monoclonal Rabbit, Cell Signalling Technology, Cambridge UK). En cuanto al estudio de las proteínas del sistema MMR, se utilizaron los siguientes marcadores: clon anti-MLH1 M1, clon anti-PMS2 A16-4, clon anti-MSH2 G219-1129 y clon anti-MSH6 SP93 (Ventana Roche, Tucson, Arizona). La expresión de IDH2 mutado se determinó mediante IHQ con el anticuerpo multiespecífico de ratón anti-IDH1/2 mutante R132/172 clon MsMab-1 en una dilución 1:100 (Millipore, Darmstadt, Alemania).

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

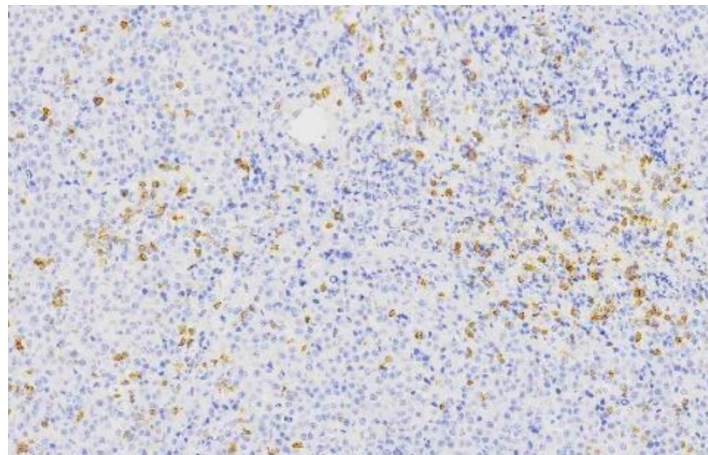
Por último, se contrasta la preparación mediante hematoxilina durante un minuto. Tras la tinción, las preparaciones se deshidratan mediante alcoholes de graduación ascendente y se montan con un cubreobjetos.

Las muestras fueron evaluadas de forma doble ciego por tres observadores (EVF, BV y MAH) y las discrepancias entre los observadores se resolvieron mediante una revisión consensuada después de una reevaluación simultánea.

#### 4.4.1 Interpretación de las técnicas IHQs

- **TILs CD8+** (Figura 22)

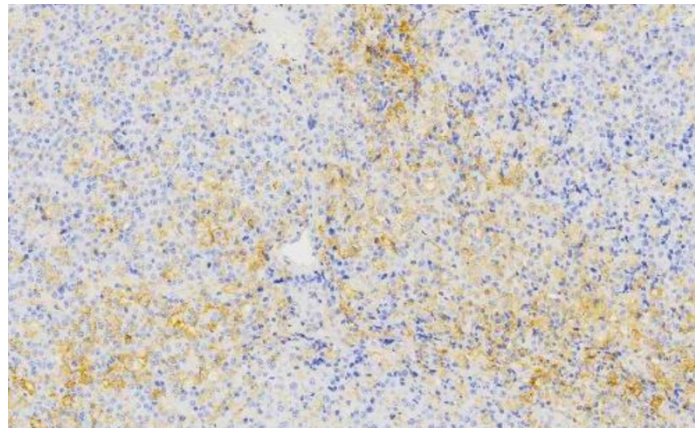
- Localización de los TILs CD8+: se evaluaron los TILs CD8+ en el estroma y en el interior de los nidos tumorales. Se observó que la mayoría de los casos con TILs CD8+ intratumorales también presentaban positividad para TILs CD8+ estromal, por lo que nos centramos en analizar los TILs CD8+ intratumorales.
- Expresión IHQ de CD8+: la tinción citoplasmática y membranosa de CD8 fue clasificada en 3 grados: 0%, 1-10% y >10% de las células presentes en el estroma o intratumoral. Posteriormente los agrupamos en 2 grupos: CD8 bajo (CD8-*low*) para 0% o 1-10%, y CD8 alto (CD8-*high*) para >10%.



**Figura 22.** Tinción IHQ de linfocitos TILs CD8+

- **PD-L1** (Figura 23)

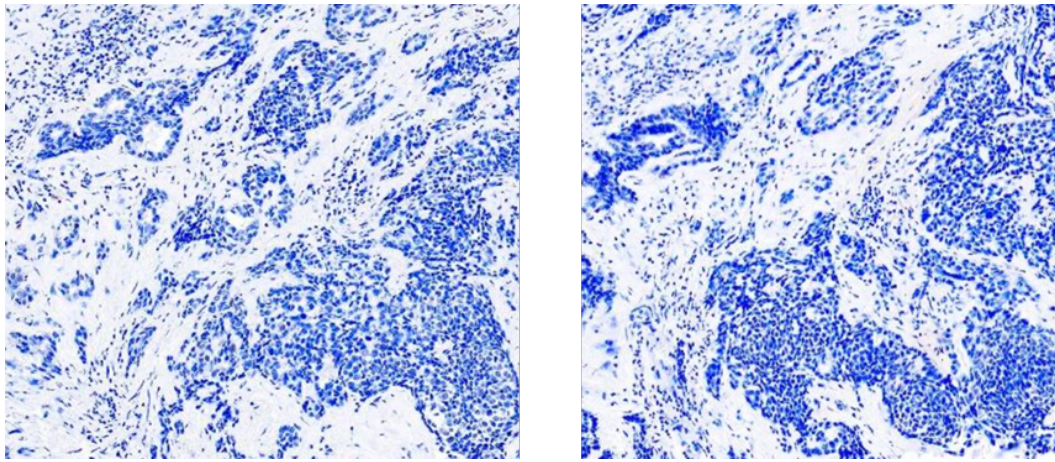
- Porcentaje de células tumorales PD-L1+: se evaluó la expresión IHQ de PD-L1 en las células tumorales y el porcentaje fue estimado sobre el total de células tumorales presentes en el área examinada. Se valoró como positiva la tinción membranosa y/o citoplasmática en >5% de las células tumorales.



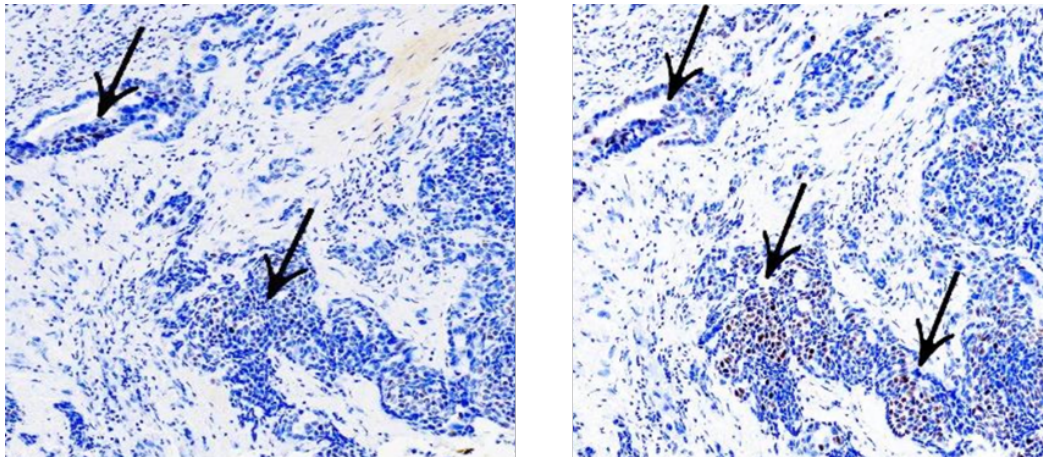
**Figura 23.** Tinción IHQ de PD-L1

- **MSI (Figuras 24 y 25)**

- Expresión IHQ de proteínas MMR: los tumores que mostraron una tinción nuclear significativamente reducida en comparación con las células inmunitarias intratumorales o los tumores que mostraron una pérdida completa de una proteína MMR se clasificaron como MSI.



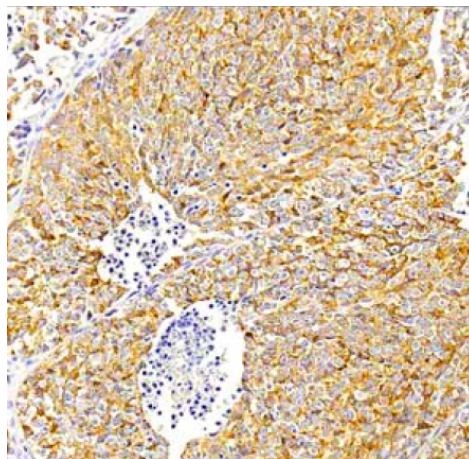
**Figura 24.** Tinción IHQ de PMS2 (izquierda) y MLH1 (derecha), expresión ausente en ambas



**Figura 25.** Tinción IHQ de MSH2 (izquierda) y MSH6 (derecha), expresión reducida en ambos casos

- **IDH2** (Figura 26)

- Porcentaje de células tumorales: se consideraron positivos aquellos casos con una tinción citoplasmática granular fuerte o débil en > 10% de las células tumorales.



**Figura 26.** Tinción IHQ de IDH2 en un SNUC

#### 4.4.2 Secuenciación para detección de IDH2

Además, se secuenció el exón 4 de IDH2 para investigar la presencia de mutaciones en puntos críticos (hotspot). Se realizó una PCR amplificando un fragmento de nucleótidos de 182 pb del exón 4 de IDH2 con el cebador directo FW 5'-AGCCATCATCTGCAAAAAC-3' y el cebador inverso RV 5'-TGTGGCCTTGTACTGCAGAG-3', ejecutado en un ciclador térmico Simplicon VXA24811 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: [5 min/95°C+(30'' 95°C/45'' 57°C/1

min 72°C)×32 ciclos+7min/72°C+4°C]. Los productos de PCR se purificaron con Exo-BAP Mix (EURx Ltd, Gdansk, Polonia) y se analizaron mediante secuenciación Sanger utilizando el analizador genético ABI PRISM 3100 y 3730 (Applied Biosystems).

Parte de los casos de la presente cohorte han sido analizados y publicados previamente por Riobello *et al.* (82).

#### 4.5 Descripción de las variables

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

- Subtipo histológico (ONB, SNUC, SNEC, PD-SNSCC, HG-no-ITAC, ITAC sólidos, SMARCB1-def, SMARCA4-def, NUT y subconjunto IDH-2 mutado)
- Edad de los pacientes (media y rango)
- Sexo de los pacientes (hombre o mujer)
- Estadio TNM (I, II, III, IVa, IVb)
- Recurrencia de la enfermedad
- Tiempo de seguimiento (media y rango)
- Supervivencia global
- Supervivencia específica para tumor
- Supervivencia libre de enfermedad
- Estado del paciente (vivo, muerto por tumor, muerto por otra causa)

#### 4.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico sobre las distintas variables numéricas y descriptivas estudiadas fue realizado con el programa informático SPSS (“Statistical Package for Social Science”), mediante las versiones SPSS Base, versión 15.0 y SPSS Advanced, versión 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.).

Se aplicaron la prueba de la Chi-Cuadrado de Pearson ( $\chi^2$ ) y la prueba exacta de Fisher para probar las posibles asociaciones entre los TILs CD8+, la expresión de PD-L1 y

la presencia de MSI y varios factores clinicopatológicos. El nivel de significación se fijó para una  $p \leq 0,05$ .

Para evaluar las relaciones de la presencia de TILs CD8+, la expresión de PDL-1 y la presencia de MSI con la supervivencia global, específica para tumor y libre de enfermedad se utilizaron las curvas Kaplan-Meier, comparando las distribuciones de supervivencia mediante la Prueba de Logaritmo del Rango "Log-Rank Test". Los valores con una  $p \leq 0,05$  fueron considerados significativos.

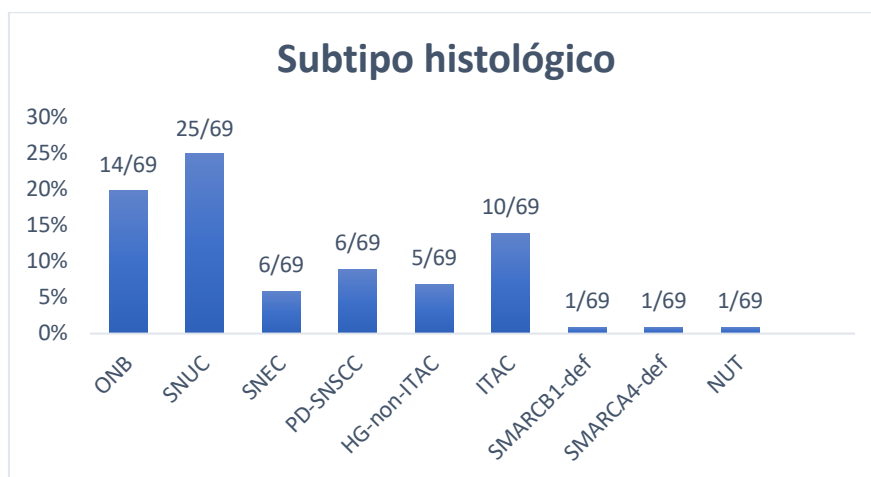
5

---

# RESULTADOS

### 5.1. Aspectos clínico-patológicos

Las muestras estudiadas correspondían a un total de 69 casos de tumores pobremente diferenciados de senos paranasales, donde se incluían 14 ONB, 25 SNUC, 6 SNEC, 6 PD-SNSCC, 5 HG-non-ITAC, 10 ITAC de patrón sólido, 1 carcinoma deficiente en SMARCB1, 1 carcinoma deficiente en SMARCA4 y 1 carcinoma NUT (Figura 27).



**Figura 27.** Distribución de los subtipos histológicos estudiados

El 54% de los pacientes eran hombres y el 46% restante mujeres. La edad media del total de la muestra fue de 56 años (rango 20-83 años). Con respecto al estadio tumoral, 8 pacientes (12%) presentaban tumores en estadio I, 24 pacientes (38%) presentaban tumores en estadio II, 8 pacientes (12%) presentaban tumores en estadio III, 20 pacientes (31%) presentaban tumores en estadio IVa y 4 pacientes (6%) presentaban tumores en estadio IVb (Figura 28).



**Figura 28.** Distribución por estadios de los tumores estudiados



Todos los pacientes fueron tratados con cirugía y 15 de los 22 pacientes de los que disponemos de información completa acerca del tratamiento realizado también recibieron RT adyuvante. El seguimiento medio disponible de 33 pacientes fue de 31 meses (rango 1-172 meses). Durante este período, 22 pacientes (67%) desarrollaron una recurrencia local o presentaron metástasis a distancia. En el momento de redactar esta memoria, de los 33 pacientes de los que disponemos información sobre su estado, 17 pacientes (52%) seguían vivos, 13 pacientes (39%) habían fallecido debido a la enfermedad tumoral y 3 pacientes (9%) habían fallecido por otras causas.

Los datos clínico-patológicos según la histología se muestran en la Tabla 4.

<b>Tabla 4. Características clínico-patológicas de los pacientes, según la histología tumoral</b>										
	<b>Total (N=69)</b>	<b>ONB (N=14)</b>	<b>SNEC (N=6)</b>	<b>SNUC (N=25)</b>	<b>PD-SNSCC (N=6)</b>	<b>HG-non- ITAC (N=5)</b>	<b>ITAC (N=10)</b>	<b>SMARCB1 -def (N=1)</b>	<b>SMARCA4 -def (N=1)</b>	<b>NUT (N=1)</b>
<b>Edad</b>	56 (20-83)	47 (20-69)	60 (49-77)	56 (34-83)	67 (57-87)	37 (29-47)	67 (49-82)	59	NA	40
<b>Sexo</b>										
<b>Hombre</b>	35/65 (54)	3/13 (23)	2/6 (33)	13/25 (52)	4/5 (80)	3/4 (75)	9/10 (90)	1 (100)	NA	0 (0)
<b>Mujer</b>	30/65 (46)	10/13 (77)	4/6 (67)	12/25 (48)	1/5 (20)	1/4 (25)	1/10 (10)	0 (0)	NA	1 (100)
<b>Estadio</b>										
<b>I</b>	8/64 (12)	0/13 (0)	0/6 (0)	0/25 (0)	4/5 (80)	2/3 (67)	2/10 (20)	0 (0)	NA	0 (0)
<b>II</b>	24/64 (38)	7/13 (54)	4/6 (67)	10/25 (40)	1/5 (20)	1/3 (33)	3/10 (30)	0 (0)	NA	1(100)
<b>III</b>	8/64 (12)	2/13 (15)	1/6 (17)	2/25 (8)	0/5 (0)	0/3 (0)	2/10 (20)	0 (0)	NA	0 (0)
<b>IVa</b>	20/64 (31)	4/13 (31)	0/6 (0)	13/25 (52)	0/5 (0)	0/3 (0)	3/10 (30)	1 (100)	NA	0 (0)
<b>IVb</b>	4/64 (6)	0/13 (0)	1/6 (17)	0/25 (0)	0/5 (0)	0/3 (0)	0/10 (0)	0 (0)	NA	0 (0)
<b>Estado</b>										
<b>Vivo</b>	17/33 (52)	6/7 (86)	1/2 (50)	7/12 (58)	1/1 (100)	0/1 (0)	2/10 (20)	NA	NA	NA
<b>Muerto</b>	13/33(39)	1/7 (14)	1/2 (50)	3/12 (25)	0/1 (0)	0/1 (0)	7/10 (70)	NA	NA	NA
<b>MOC</b>	3/33(9)	0/7 (0)	0/2 (0)	2/12 (17)	0/1 (0)	1/1 (100)	1/10 (10)	NA	NA	NA
<b>Recurrencia</b>	22/32 (69)	5/7 (71)	2/2 (100)	4/12 (33)	NA	1/1 (100)	10/10 (100)	NA	NA	NA
<b>Seguimiento media (rango)</b>	31 (1-172)	56 (1-172)	17 (8-26)	29 (1-97)	12 (12)	39 (39)	19 (1-84)	NA	NA	NA

MOC: muerto por otra causa; NA: Not Available

Además, 13 tumores fueron positivos para la mutación IDH2. En general, la inmunopositividad de la proteína mutante IDH2 coincidió con la mutación IDH2. Sin embargo, 3 casos mostraron discrepancias: un caso que resultó positivo para la mutación IDH2 por IHQ resultó negativo (*wild-type*) para dicha mutación utilizando la técnica de PCR, siendo considerado un falso positivo. Por el contrario, dos casos que resultaron positivos para la mutación IDH2 utilizando la técnica de PCR resultaron

negativos (*wild-type*) mediante estudio con IHQ, siendo considerados positivos (Tabla 5).

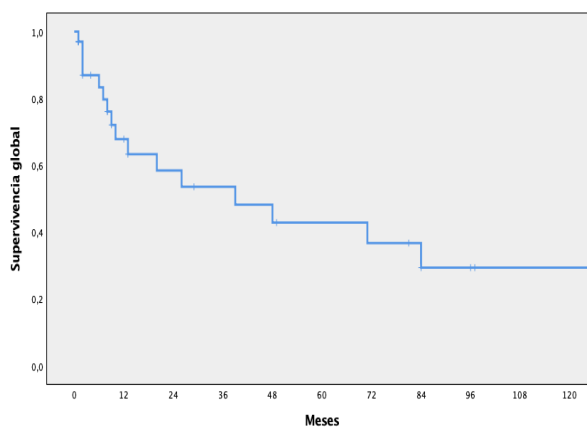
**Tabla 5. Resultados de la secuenciación del exón 4 de IDH1/2 y expresión inmunohistoquímica (IHQ) de IDH2**

Histología	Número de casos (%)	
	Mutación IDH	Inmunopositividad
<b>ONB (n=14)</b>	0 (0)	0 (0)
<b>SNUC (n=25)</b>	9 (36)	7 (28)
<b>SNEC (n=6)</b>	1 (17)	1 (17)
<b>PD-SNSCC (n=6)</b>	1 (17)	1 (17)
<b>HG-non-ITAC (n=5)</b>	2 (40)	3 (60)
<b>ITAC (n=10)</b>	0 (0)	0 (0)
<b>SMARCB1-def (n=1)</b>	0 (0)	0 (0)
<b>SMARCA4-def (n=1)</b>	0 (0)	0 (0)
<b>NUT (n=1)</b>	0 (0)	0 (0)

Al estudiar la relación entre la mutación IDH2 y las diferentes variables clinicopatológicas, no se encontró correlación con edad, sexo, estadio o presencia de recidiva. La relación entre el estado de IDH2 y las variables clinicopatológicas estudiadas de muestra en la Tabla 6.

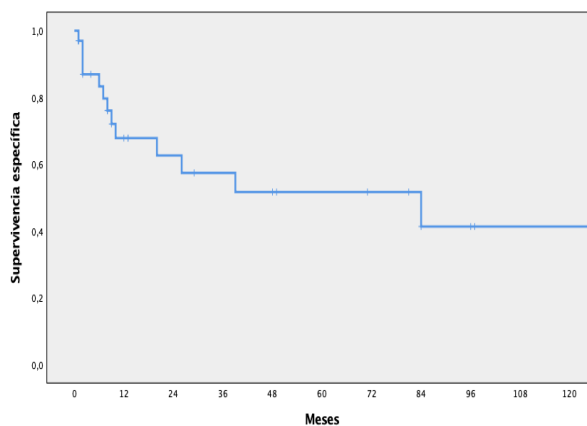
<b>Tabla 6. Relación entre el estado de IDH2 y las variables clínico-patológicas</b>				
<b>Variables</b>	<b>Nº casos (%)</b>	<b>Estado de IDH2</b>		<b>p</b>
		<b>Mutado (%)</b>	<b>Wild-type (%)</b>	
<b><u>Sexo</u></b>				
Hombre	35 (54)	6 (17)	29 (33)	0,553
Mujer	30 (46)	7 (23)	23 (77)	
<b><u>Edad</u></b>				
<60 años	34 (54)	7 (21)	27 (79)	1,0
>60 años	29 (46)	5 (17)	24 (83)	
<b><u>Estadio</u></b>				
I	8 (12)	1 (8)	7 (92)	0,319
II	24 (38)	5 (21)	19 (79)	
III	8 (12)	0 (0)	8 (100)	
IVa	20 (31)	6 (30)	14 (70)	
IVb	4 (6)	0 (0)	4 (100)	
<b><u>Histología</u></b>				
ONB	14 (20)	0 (0)	14 (100)	0,054
SNUC	25 (36)	9 (36)	16 (64)	
SNEC	6 (8)	1 (17)	5 (83)	
PD-SNSCC	6 (8)	1 (17)	5 (83)	
HG-non-ITAC	5 (7)	2 (40)	3 (60)	
ITAC	10 (14)	0 (0)	10 (100)	
SMARCB1-def	1 (2)	0 (0)	1 (100)	
SMARCA4-def	1 (2)	0 (0)	1 (100)	
NUT	1 (2)	0 (0)	1 (100)	
<b><u>Recidiva</u></b>				
Sí	19 (60)	1 (5)	18 (95)	0,279
No	13 (40)	3 (23)	10 (77)	

La supervivencia global (SG) de los pacientes fue del 43% a los 5 años de seguimiento (*Figura 29*).



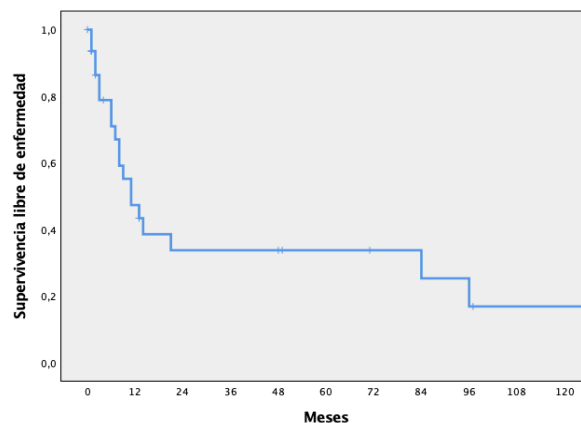
**Figura 29.** Supervivencia global de la serie

La supervivencia específica (SE) de los pacientes fue del 52% a los 5 años de seguimiento (*Figura 30*).



**Figura 30.** Supervivencia específica de la serie

La supervivencia libre de enfermedad (SLE) fue del 34% a los 5 años de seguimiento (*Figura 31*).



**Figura 31.** Supervivencia libre de enfermedad de la serie

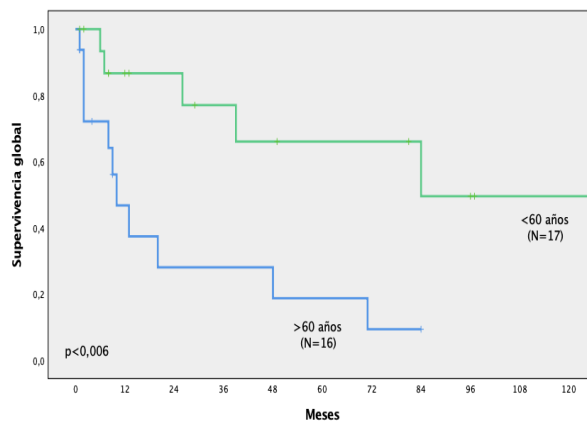
## 5.2 Relaciones entre la supervivencia y las variables clínico-patológicas

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

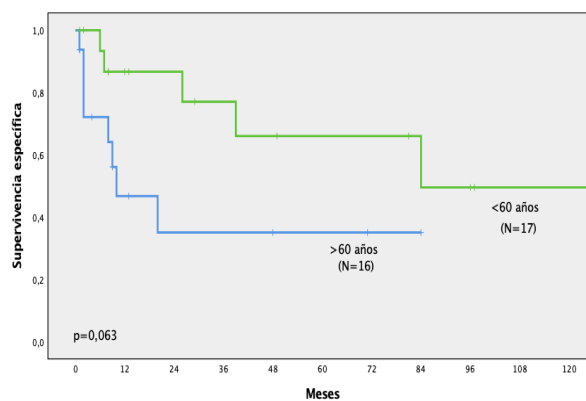
- La edad
- El estadio tumoral
- El subtipo histológico
- La presencia de recidiva loco-regional

### 5.2.1 Relación entre la supervivencia y la edad

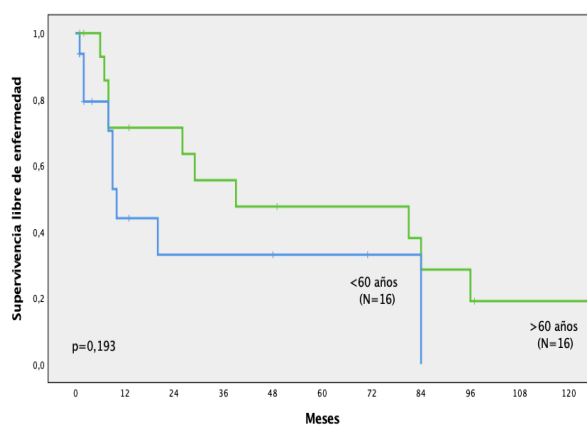
Los pacientes con una edad mayor o igual a 60 años (16 de los 33 de los que disponemos de información acerca de este parámetro y de su estado) presentaron peor supervivencia global (Log rank 7,661,  $p=0,006$ ) (Figura 32), mientras que no hubo diferencia significativa, aunque sí una tendencia a presentar también peores resultados en cuanto a la supervivencia específica (Log rank 3,456,  $p=0,063$ ) (Figura 33) y a supervivencia libre de enfermedad (Log rank 1,696,  $p=0,193$ ) (Figura 34).



**Figura 32.** Supervivencia global en función de la edad



**Figura 33.** Supervivencia específica en función de la edad



**Figura 34.** Supervivencia libre de enfermedad en función de la edad

### 5.2.2 Relación entre la supervivencia y el estadio tumoral

El estadio tumoral no se correlacionó con la supervivencia global (Log rank 3,378,  $p=0,497$ ) (Figura 35), la supervivencia específica (Log rank 2,588,  $p=0,629$ ) (Figura 36) o la supervivencia libre de enfermedad (Log rank 1,680,  $p=0,794$ ) (Figura 37), aunque sí se objetivó una tendencia de los tumores en estadios más avanzados a presentar peores resultados de supervivencia a los 5 años. Los pobres resultados de supervivencia objetivados en los tumores estadio I se deben probablemente al escaso número de tumores diagnosticados en dicho estadio (12%).

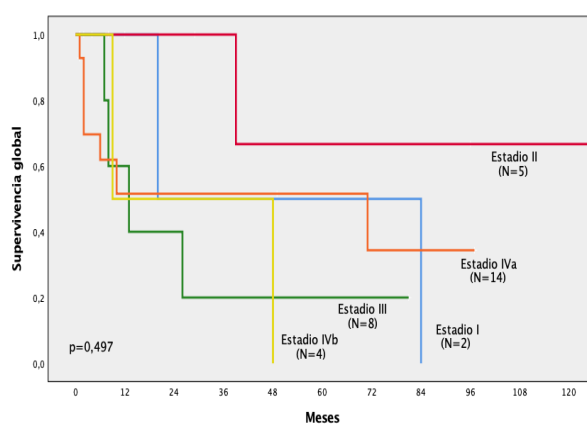


Figura 35. Supervivencia global en función del estadio tumoral

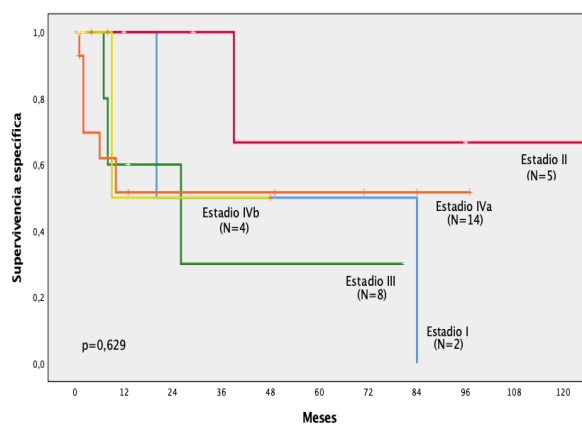
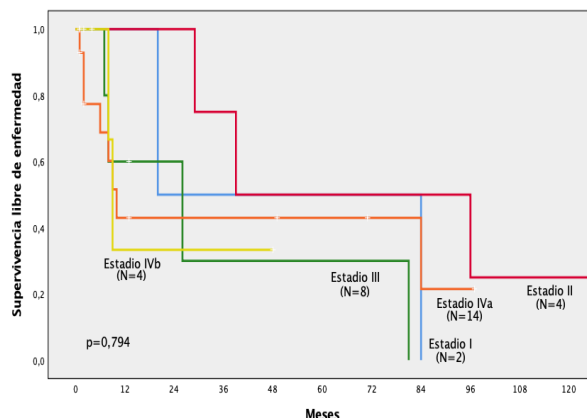


Figura 36. Supervivencia específica en función del estadio tumoral

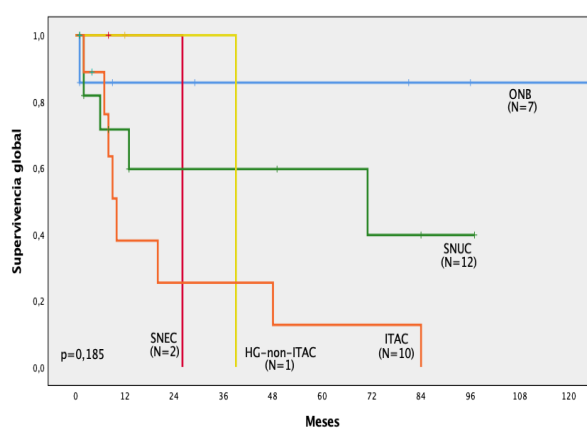


**Figura 37.** Supervivencia libre de enfermedad en función del estadio tumoral

### 5.2.3 Relación entre la supervivencia y el subtipo histológico

Al comparar los subtipos histológicos, los ONB y los SNUC mostraron una tendencia a presentar resultados clínicos más favorables en términos de supervivencia, tanto supervivencia global, como específica, como libre de enfermedad, aunque sin alcanzar valores estadísticamente significativos.

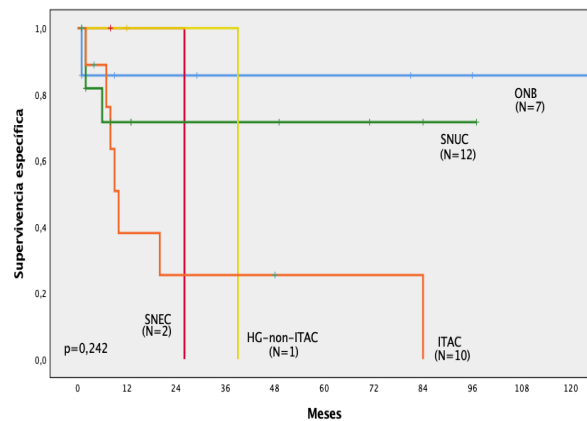
La supervivencia global a los 5 años de los ONB fue del 86 %, de los SNUC fue del 60 % y de los ITAC de patrón sólido fue del 13%. Ninguno de los pacientes con SNEC o con HG-no-ITAC alcanzó la supervivencia global a los 5 años. No se halló una relación estadísticamente significativa entre las cifras de supervivencia global y el subtipo histológico (Log rank 7,522,  $p=0,185$ ) (Figura 38).



**Figura 38.** Supervivencia global en función del subtipo histológico

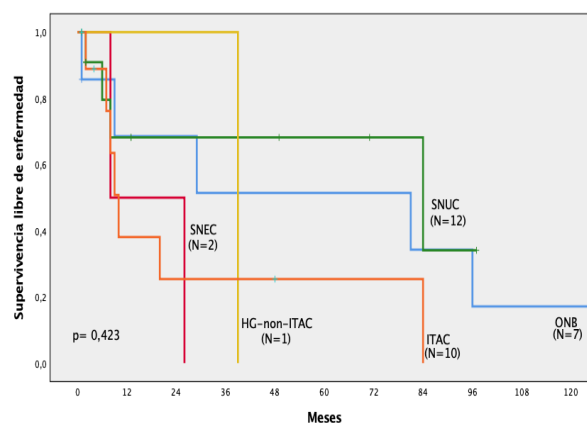


La supervivencia específica a los 5 años de los ONB fue del 86 %, de los SNUC fue del 72 % y de los ITAC del 25%. Ninguno de los pacientes con SNEC o HG-no-ITAC sobrevivió a los 5 años. No se halló una relación estadísticamente significativa entre las cifras de supervivencia específica y el subtipo histológico (Log rank 6,729,  $p=0,242$ ) (Figura 39).



**Figura 39.** Supervivencia específica en función del subtipo histológico

La supervivencia libre de enfermedad a los 5 años de los ONB fue del 51%, de los SNUC fue del 68 % y de los ITAC del 25%. Sin embargo, según aumenta el tiempo de seguimiento, los ONB presentan mejores cifras de supervivencia libre de enfermedad que los SNUC. Ninguno de los pacientes con SNEC o HG-no-ITAC los 5 años. No se halló una relación estadísticamente significativa entre las cifras de supervivencia libre de enfermedad y el subtipo histológico (Log rank 3,878,  $p=0,423$ ) (Figura 40).



**Figura 40.** Supervivencia libre de enfermedad en función del subtipo histológico

Desafortunadamente, no contamos con datos de seguimiento de los PD-SNSCC, del carcinoma deficiente en SMARCB1, del carcinoma deficiente en SMARCA4 ni del carcinoma NUT.

En cuanto al subconjunto de los casos IDH-2 mutados, se objetivó una tendencia de estos a presentar mejores resultados tanto de supervivencia global (67% en casos mutados frente a 40% en casos *wild-type*,  $p=0,573$ ), supervivencia específica (67% en casos mutados frente a 51% en casos *wild-type*,  $p=0,754$ ) y sobre todo de supervivencia libre de enfermedad (67% en casos mutados frente a 33% en casos *wild-type*,  $p=0,123$ ), aunque sin alcanzar en ningún caso valores significativos (Figuras 41,42,43).

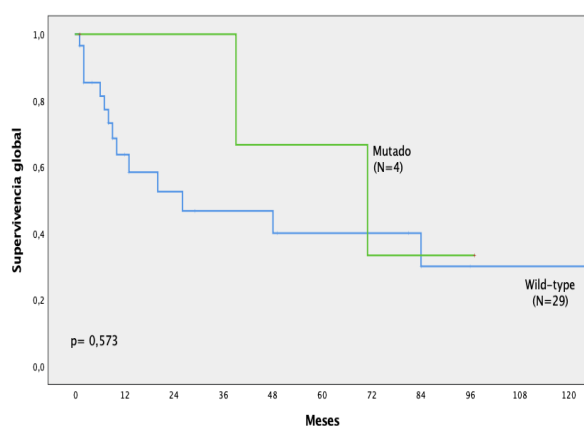


Figura 41. Supervivencia global en función del estado de IDH2

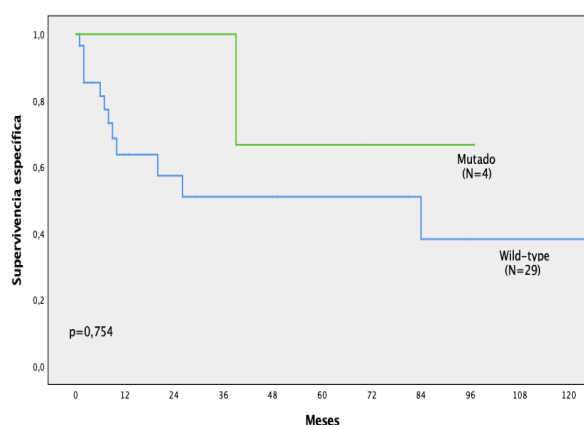
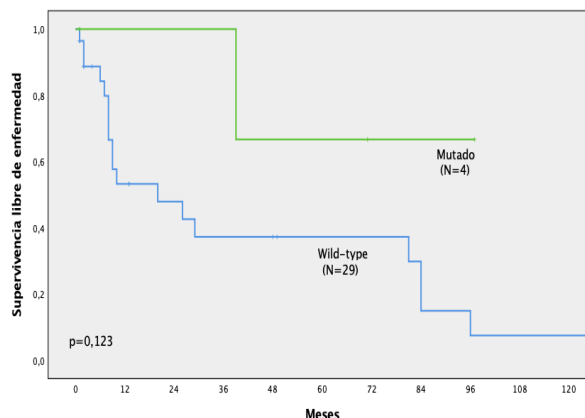


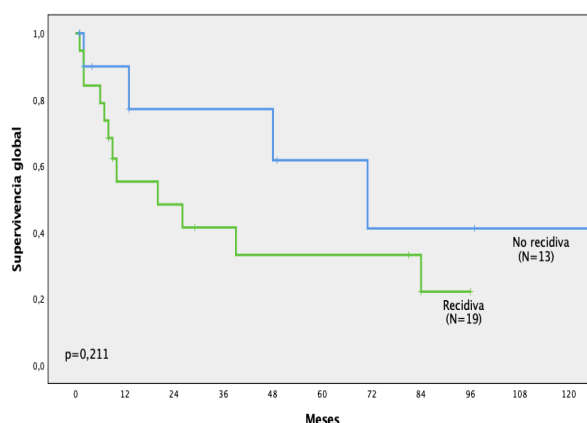
Figura 42. Supervivencia específica en función del estado de IDH2



**Figura 43.** Supervivencia libre de enfermedad en función del estado de IDH2

#### 5.2.4 Relación entre la supervivencia y presencia de recidivas locorregionales

La presencia de recidivas locorregionales presentó una tendencia a tener peores resultados en cuanto a supervivencia global, aunque sin obtener valores estadísticamente significativos (Log-rank 1,562;  $p=0,211$ ) (Figura 44).



**Figura 44.** Supervivencia global en función del desarrollo de una recidiva

Además, este hecho se correlacionó de forma estadísticamente significativa con un empeoramiento de la supervivencia específica tumoral (Log-rank 5,260;  $p=0,022$ ) (Figura 45).

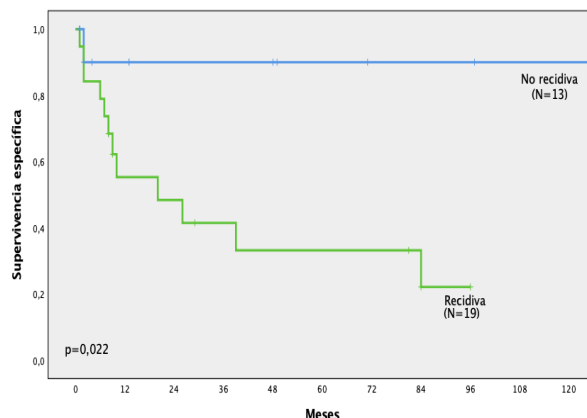


Figura 45. Supervivencia específica en función del desarrollo de una recidiva

### 5.3 Valoración de la presencia de TILs CD8+

Un total de 23 de 69 (33%) tumores mostraron una alta presencia de TILs CD8+, ya sea en el compartimento tumoral o estromal. En 21/23 casos, los TILs CD8+ estaban presentes en ambos compartimentos.

Los TILs CD8+ fueron más frecuentes en los ITAC de patrón sólido y en los HG-non-ITAC (60 % de los tumores), seguidos de los SNUC (34 %), PD-SNSCC (33 %), ONB (21 %) y SNEC (17 %). El carcinoma deficiente en SMARCB1, el carcinoma deficiente en SMARCA4 y el carcinoma NUT carecían de TILs CD8+. El 54% de los tumores que presentaban la mutación IDH-2 presentaron TILs CD8+ (Figura 46).

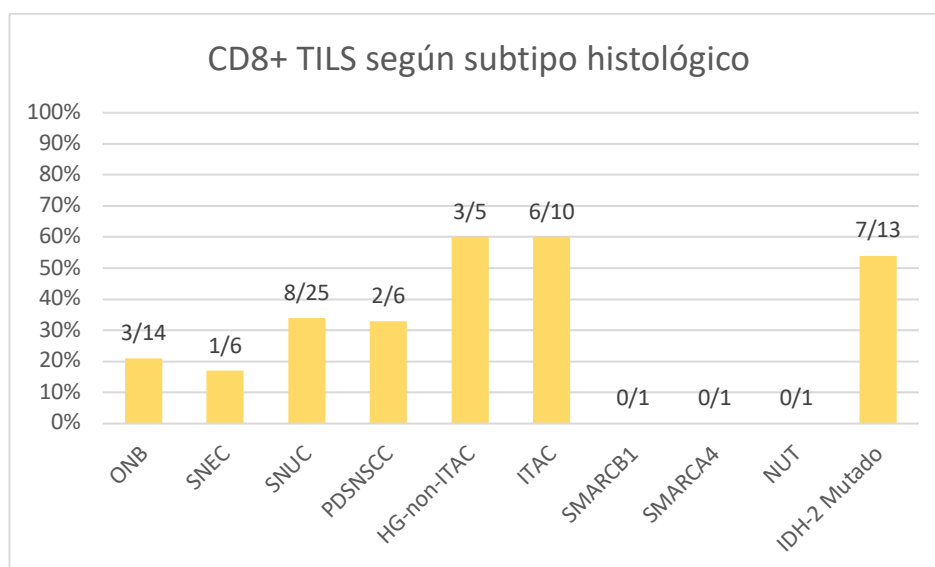


Figura 46. Distribución de los TILs en función del subtipo histológico

### 5.3.1 Significado clínico-patológico de la presencia de TILs CD8+

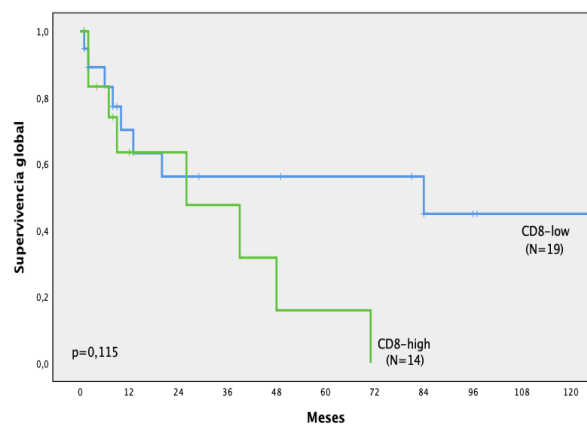
La correlación entre la presencia de TILs CD8+ y el sexo, la edad, el estadio, el subtipo histológico y la presencia de recidiva se muestra en la Tabla 7, sin observarse relaciones estadísticamente significativas. Un total del 54 % de los tumores con mutación de IDH2 frente al 29 % de los tumores con IDH2 *wild-type* presentaban TILs CD8+; sin embargo, esta diferencia no fue significativa (Chi cuadrado de Fisher  $p=0,082$ ).

**Tabla 7. Relación entre la presencia de TILs CD8+ y las variables clínico-patológicas**

Variables	Nº casos (%)	Presencia de TILs CD8+		p
		CD8-high (%)	CD8-low (%)	
<b><u>Sexo</u></b>				
Hombre	35 (54)	14 (40)	21 (60)	0,301
Mujer	30 (46)	8 (17)	22 (83)	
<b><u>Edad</u></b>				
<60 años	34 (54)	23 (55)	11 (45)	1,00
>60 años	29 (46)	19 (68)	10 (32)	
<b><u>Estadio</u></b>				
I	8 (12)	1 (8)	7 (92)	0,098
II	24 (38)	5 (21)	19 (79)	
III	8 (12)	4 (50)	4 (50)	
IVa	20 (31)	8 (40)	12 (60)	
IVb	4 (6)	3 (75)	1 (25)	
<b><u>Histología</u></b>				
ONB	14 (20)	3 (21)	11 (79)	0,437
SNUC	25 (36)	8 (32)	17 (68)	
SNEC	6 (8)	1 (17)	5 (83)	
PD-SNSCC	6 (8)	2 (33)	4 (77)	
HG-non-ITAC	5 (7)	3 (60)	2 (40)	
ITAC	10 (14)	6 (60)	2 (40)	
SMARCB1-def	1 (2)	0 (0)	1 (100)	
SMARCA4-def	1 (2)	0 (0)	1 (100)	
NUT	1 (2)	0 (0)	1 (100)	
<b><u>IDH-2</u></b>				
Mutado	13 (19)	7 (54)	6 (46)	0,082
<i>Wild-type</i>	56 (81)	16 (29)	40 (71)	
<b><u>Recidiva</u></b>				
Sí	19 (59)	6 (32)	13 (64)	0,281
No	13(40)	7 (54)	6 (46)	

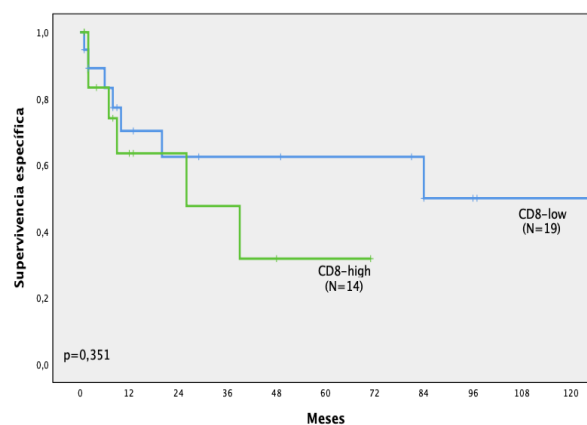
### 5.3.2 Relación entre la presencia de TILs CD8+ y el curso de la enfermedad

Al relacionar la SG a los 5 años con el nivel de TILs CD8+, observamos una tendencia a presentar mayor supervivencia en los casos con niveles bajos/ausencia de TILs CD8+ (CD8-low) comparado con los casos con niveles altos de TILs CD8+ (CD8-high), 57% frente a 16%, respectivamente, sin alcanzar valores estadísticamente significativos (log-rank 2,490;  $p=0,115$ ) (Figura 47).



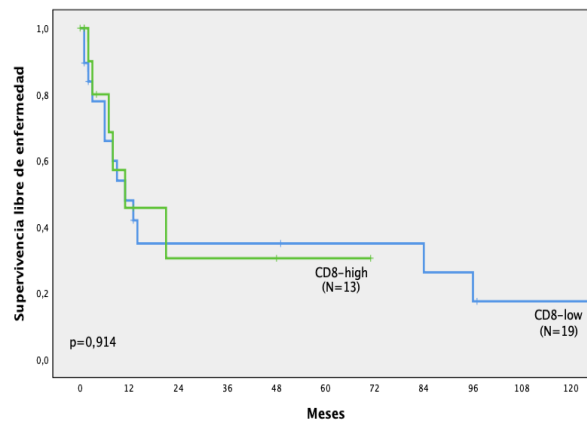
**Figura 47.** Supervivencia global en función de la presencia de TILs CD8+

Asimismo, la SE a los 5 años mostró una tendencia a ser superior en los casos con niveles bajos/ausencia de TILs CD8+ (CD8-low) comparado con los casos con niveles altos de TILs CD8+ (CD8-high), 62% frente al 32%, respectivamente (log-rank 0,871;  $p=0,351$ ), de nuevo sin alcanzar valores estadísticamente significativos (Figura 48).



**Figura 48.** Supervivencia específica en función de la presencia de TILs CD8+

En cuanto a la SLE a los 5 años, mostró una tendencia a ser ligeramente superior en los casos con niveles bajos/ausencia de TILs CD8+ (CD8-low) comparado con los casos con niveles altos de TILs CD8+ (CD8-high), 35% frente al 30%, respectivamente (log-rank 0,012;  $p=0,914$ ), de nuevo sin alcanzar valores estadísticamente significativos (*Figura 49*).

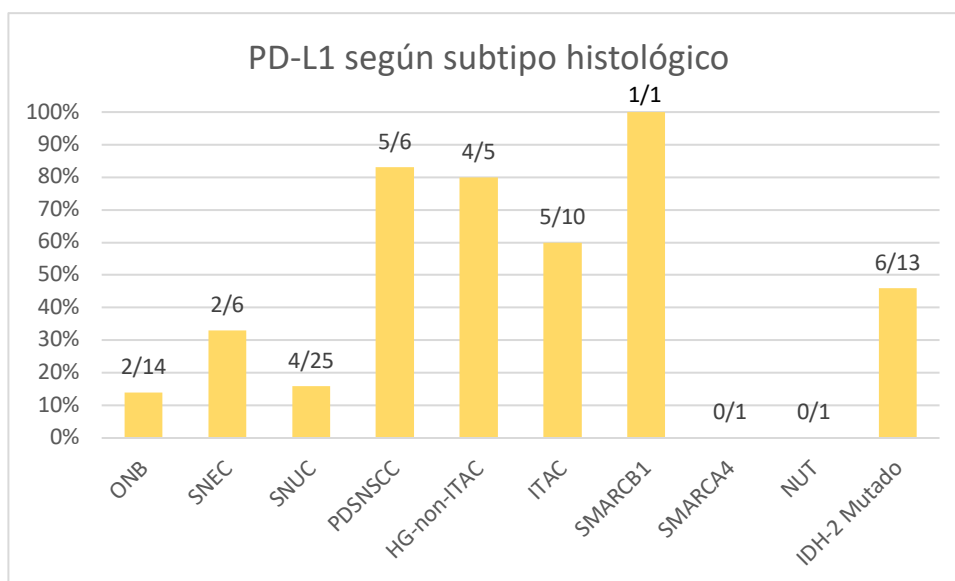


**Figura 49.** Supervivencia libre de enfermedad en función de la presencia de TILs CD8+

#### 5.4 Valoración de la expresión IHQ de PD-L1

Un total de 23 de 69 (33%) tumores mostraron tinción de PD-L1 membranoso en >5% de las células tumorales. El patrón de tinción fue difuso en la mayoría de los casos, mientras que en los HG-no-ITAC demostró mayormente una expresión focal.

La expresión de PD-L1 se observó con mayor frecuencia en los PD-SNSCC (83%), HG-no-ITAC (80 %) e ITAC de patrón sólido (50 %). En los SNEC, SNUC y ONB fue del 33%, 16% y 14%, respectivamente. El único caso de carcinoma deficiente en SMARCB1 también fue positivo para PD-L1, mientras que el carcinoma deficiente en SMARCA4 y el carcinoma NUT no mostraron expresión de PD-L1 (*Figura 50*). El 46% de los tumores que presentaban la mutación IDH-2 fueron positivos para PD-L1.



**Figura 50.** Expresión de PD-L1 en función del subtipo tumoral

#### 5.4.1 Significado clínico-patológico de la expresión de PD-L1

La correlación entre la expresión de PD-L1 y el sexo, la edad, el estadio tumoral, el subtipo histológico y la presencia de recidiva se muestra en la Tabla 8.

Se encontró una relación estadísticamente significativa entre el subtipo histológico y la expresión de PD-L1 (Chi cuadrado de Pearson=0,006), observándose con mayor frecuencia en PD-SNSCC (83%), HG-non-ITAC (80%) e ITAC de patrón sólido (50%). En SNEC, SNUC y ONB fue del 33%, 16% y 14%, respectivamente. No se encontraron relaciones estadísticamente significativas entre el resto de las variables clínico-patológicas y la expresión de PD-L1. La positividad de PD-L1 en IDH2 mutado se observó en el 46 % y en los tumores IDH2 *wild-type* en el 30 % de los casos. Sin embargo, esta diferencia no fue significativa (Chi cuadrado de Fisher p=0,221).



<b>Tabla 8. Relación entre la expresión de PD-L1 y las variables clínico-patológicas</b>				
<b>Variables</b>	<b>Nº casos (%)</b>	<b>Expresión de PD-L1</b>		<b>p</b>
		<b>Positiva (%)</b>	<b>Negativa (%)</b>	
<b><u>Sexo</u></b>				
<b>Hombre</b>	35 (54)	15 (43)	20 (57)	0,065
<b>Mujer</b>	30 (46)	6 (20)	24 (80)	
<b><u>Edad</u></b>				
<b>&lt;60 años</b>	34 (54)	10 (29)	24 (71)	0,788
<b>&gt;60 años</b>	29 (46)	10 (34)	19 (66)	
<b><u>Estadio</u></b>				
<b>I</b>	8 (12)	4 (50)	4 (50)	0,747
<b>II</b>	24 (38)	7 (29)	17 (71)	
<b>III</b>	8 (12)	3 (37)	5 (63)	
<b>IVa</b>	20 (31)	5 (25)	15 (75)	
<b>IVb</b>	4 (6)	1 (25)	3 (75)	
<b><u>Histología</u></b>				
<b>ONB</b>	14 (20)	2 (14)	12 (86)	0,006
<b>SNUC</b>	25 (36)	4 (16)	21 (84)	
<b>SNEC</b>	6 (8)	2 (33)	4 (77)	
<b>PD-SNSCC</b>	6 (8)	5 (83)	1 (17)	
<b>HG-non-ITAC</b>	5 (7)	4 (80)	1 (20)	
<b>ITAC</b>	10 (14)	5 (50)	5 (50)	
<b>SMARCB1-def</b>	1 (2)	1 (100)	0 (0)	
<b>SMARCA4-def</b>	1 (2)	0 (0)	1 (100)	
<b>NUT</b>	1 (2)	0 (0)	1 (100)	
<b><u>IDH-2 mutado</u></b>				
<b>Mutado</b>	13 (19)	6 (46)	7 (54)	0,221
<b>Wild-type</b>	56 (81)	17 (30)	39 (70)	
<b><u>Recidiva</u></b>				
<b>Sí</b>	19 (59)	5 (38)	14 (62)	0,671
<b>No</b>	13 (40)	2 (11)	11 (89)	

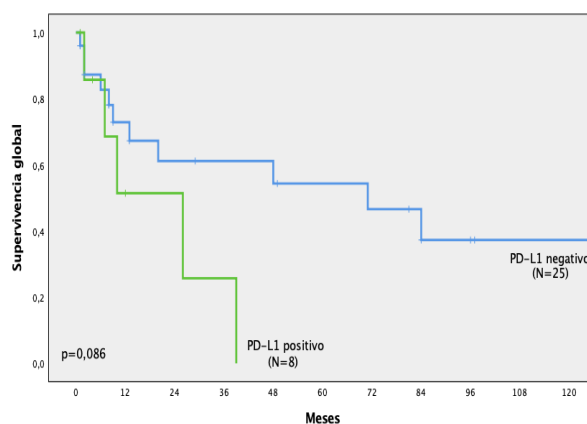
Un total de 13 de 23 (57%) tumores positivos para PD-L1 frente a 10/46 (22%) de tumores negativos para PD-L1 también presentaban TILs CD8+ (Chi cuadrado de Fisher  $p=0,006$ ) (Tabla 9).

**Tabla 9. Relación entre la presencia de TILs CD8 y expresión e PD-L1**

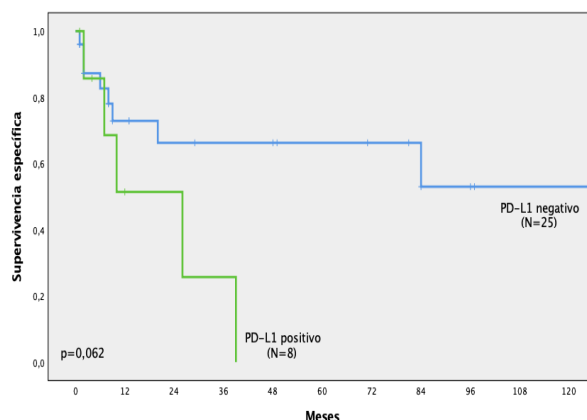
	PD-L1 positivo	PD-L1 negativo	Total	<i>p</i>
TILs CD8-high	13 (57)	10 (22)	23 (33)	
TILs CD8-low	10 (33)	36 (78)	46 (77)	<b>0,006</b>
<b>Total</b>	<b>23 (33)</b>	<b>46 (77)</b>	<b>69</b>	

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

Al relacionar la SG a los 5 años con la expresión de PD-L1, observamos una tendencia a presentar mayor supervivencia en los casos con expresión negativa de PD-L1 (61%), mientras que ningún caso con expresión positiva de PD-L1 alcanzó una supervivencia de 5 años; sin embargo, no se alcanzaron valores estadísticamente significativos (Log rank 2,946,  $p=0,086$ ) (Figura 51).

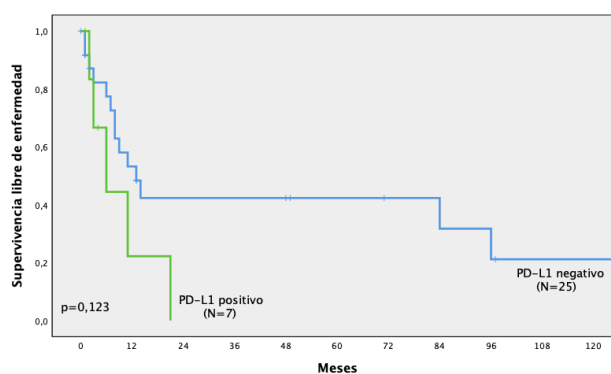
**Figura 51.** Supervivencia global en función de la expresión de PD-L1

De igual manera, la SE a los 5 años en los casos con expresión negativa de PD-L1 fue del 66% mientras que ningún caso con expresión positiva de PD-L1 alcanzó una supervivencia de 5 años, aunque sin obtener valores estadísticamente significativos (Log rank 3,480,  $p=0,062$ ) (Figura 52).



**Figura 52.** Supervivencia específica en función de la expresión de PD-L1

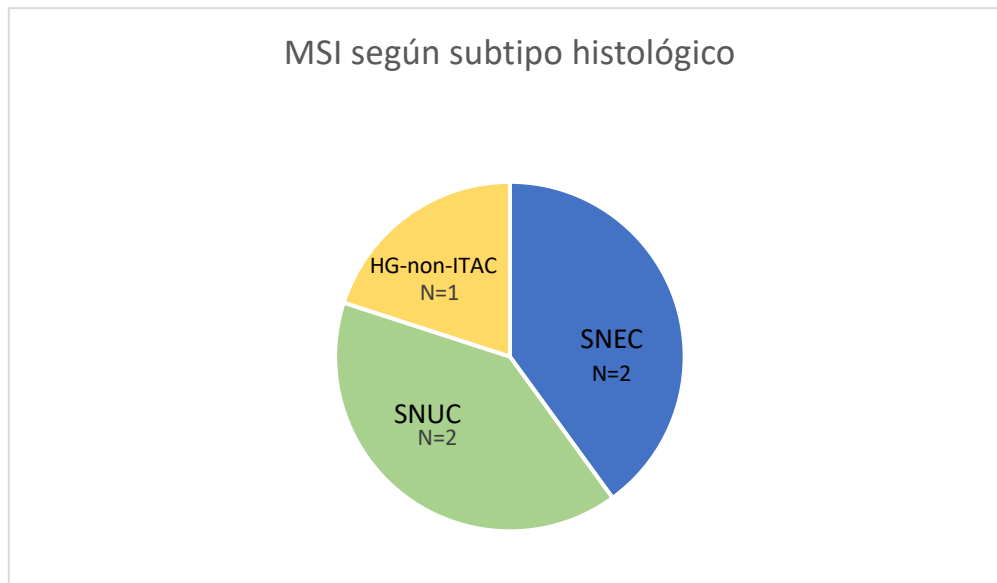
En cuanto a la SLE a los 5 años, en los casos con expresión negativa de PD-L1 fue del 42%, mientras que ningún caso con expresión positiva de PD-L1 alcanzó una supervivencia de 5 años, aunque de nuevo sin obtener valores estadísticamente significativos (Log rank 2,374,  $p=0,123$ ) (Figura 53).



**Figura 53.** Supervivencia libre de enfermedad en función de la expresión de PD-L1

### 5.5 Valoración de la presencia de MSI

Tras aplicar la tinción de PMS2, MLH1, MSH2 y MSH6 como marcadores de la presencia de MSI, encontramos 5/69 (7%) casos positivos para MSI (es decir, con ausencia de expresión de estas proteínas), dos eran SNEC, dos SNUC y uno era HG-no-ITAC (Figura 54). Los cinco casos positivos de MSI eran *wild-type* IDH2.



**Figura 54.** Presencia de MSI en función del subtipo histológico

Cuatro tumores demostraron ausencia completa y una expresión reducida de PMS2, acompañada de pérdida completa de MLH1 en dos casos y reducción de MLH1 en dos casos, mientras que en un caso PMS2 fue el único marcador perdido de los cuatro MSI. Un caso mostró la ausencia completa de los cuatro marcadores, y un caso mostró pérdida de PMS2 y MLH1 y reducción de MSH2 y MSH6.

### 5.5.1 Significado clínico-patológico de la presencia de MSI

La correlación entre la presencia de MSI y el sexo, la edad, el estadio tumoral, el subtipo histológico y la presencia de recidiva se muestra en la Tabla 10. No se observaron relaciones estadísticamente significativas entre la presencia de MSI y las variables clinicopatológicas mencionadas.

De los casos en los que se demostró la presencia de MSI, en uno de ellos (SNUC) se halló además la presencia de TILs CD8+. La mutación IDH2 resultó ser mutuamente excluyente con la presencia de MSI. Sin embargo, esta diferencia no fue significativa (Chi cuadrado de Fisher  $p=0,575$ ).

Tabla 10. Relación entre la presencia de MSI y las variables clínico-patológicas

Variables	Nº casos (%)	Presencia de MSI		p
		Positiva (%)	Negativa (%)	
<b>Sexo</b>				
Hombre	35 (54)	1 (3)	34 (97)	0,173
Mujer	30 (46)	4 (13)	26 (87)	
<b>Edad</b>				
<60 años	34 (54)	3 (9)	31 (91)	1,000
>60 años	29 (46)	2 (7)	27 (93)	
<b>Estadio</b>				
I	8 (12)	1 (12)	7 (88)	0,844
II	24 (38)	2 (8)	22 (92)	
III	8 (12)	0 (0)	8 (100)	
IVa	20 (31)	2 (10)	18 (90)	
IVb	4 (6)	0 (0)	4 (100)	
<b>Histología</b>				
ONB	14 (20)	0 (0)	14 (100)	0,273
SNUC	25 (36)	2 (8)	23 (92)	
SNEC	6 (8)	2 (33)	4 (77)	
PD-SNSCC	6 (8)	0 (0)	6 (100)	
HG-non-ITAC	5 (7)	1 (20)	4 (80)	
ITAC	10 (14)	0 (0)	10 (100)	
SMARCB1-def	1 (2)	0 (0)	1 (100)	
SMARCA4-def	1 (2)	0 (0)	1 (100)	
NUT	1 (2)	0 (0)	1 (100)	
<b>IDH-2</b>				
Mutado	13 (19)	0 (0)	13 (100)	0,575
Wild-type	56 (81)	5 (20)	51 (80)	
<b>Recidiva</b>				
Sí	19 (59)	1 (8)	18 (92)	0,655
No	13 (40)	1 (5)	12 (95)	

### 5.5.2 Relación entre la presencia de MSI y el curso de la enfermedad

Dado que sólo se disponía de datos de seguimiento de dos de los casos que mostraron positividad para MSI, no se analizó la correlación con la supervivencia.

6

---

# DISCUSIÓN

## **6.1 Justificación**

Los carcinomas de senos paranasales son neoplasias poco frecuentes que representan menos del 5% de los tumores de cabeza y cuello. Dentro de ellos, el 70% de estos tumores son SNSCC o ITAC, mientras que el 30% restante está compuesto por una miscelánea de carcinomas pobremente diferenciados (62). El pronóstico de estas neoplasias es bastante pobre, incluso llevando a cabo un tratamiento multimodal agresivo, pues las recidivas locales son frecuentes (1-3). Si bien inicialmente se optará por el tratamiento quirúrgico, en el caso de tumores localmente avanzados o metastásicos las opciones terapéuticas se ven más limitadas a pesar de los avances que se han producido en RT y QT en los últimos años. Por lo tanto, la necesidad de buscar nuevas modalidades de tratamiento para estos tumores, centrándonos especialmente en la IT, resulta imperativa. De aquí nace también la necesidad de encontrar biomarcadores que ayuden a seleccionar a los pacientes que con mayor probabilidad se pueden beneficiar de estos tratamientos.

Como posibles marcadores para el uso de IT, los más conocidos son los puntos de control inmunitario. La vía PD-1/PD-L1 es la más estudiada, habiendo demostrado su utilidad como marcador de respuesta a IT en varios tipos tumorales. Los anticuerpos monoclonales anti-PD-1, pembrolizumab y nivolumab, han sido aprobados para una gran variedad de tumores incluyendo los CECC que han progresado durante o después de la QT. También los TILs, especialmente los CD8+, se han estudiado como biomarcadores de potencial beneficio con estos agentes inmunoterápicos. Algunos estudios recientes, incluyendo algunos de nuestro grupo, se han centrado específicamente en el papel pronóstico de estos marcadores para casos recurrentes o metastásicos de tumores de senos paranasales, sobretodo SNSCC e ITAC (22,26,27,176,219,220) y recientemente se ha publicado un estudio sobre la presencia de TILs CD8+ en ONB (177), si bien su papel en el caso de tumores pobremente diferenciados apenas ha sido estudiado.

Por otra parte, la MSI, descrita inicialmente en pacientes con cáncer de colon esporádico y cáncer colorrectal hereditario no polipósico ha sido demostrada actualmente en varios tipos de tumores. La FDA ha aprobado la presencia de MSI como

predictor de la eficacia de la IT del cáncer irresecable o metastásico, independientemente de su localización (32,33). Además, se han publicado dos estudios recientemente acerca de la presencia de MSI en tumores de senos paranasales (30,248), pero la inestabilidad genómica en tumores pobremente diferenciados ha sido poco estudiada hasta el momento.

Nuestro grupo tiene abiertas varias líneas de investigación con los carcinomas de senos paranasales, lo cual resulta de interés debido a la escasez de estudios disponibles para este tipo de tumores. Los estudios acerca de los posibles biomarcadores para IT publicados hasta la fecha se centran además fundamentalmente en los dos subtipos histológicos más frecuentes (SNSCC e ITAC), pero resulta complicado encontrar estudios que incluyan carcinomas pobremente diferenciados. Teniendo en cuenta la baja incidencia de estos tumores, consideramos que nuestra serie constituye un elemento valioso que podría servir como punto de partida para ampliar las opciones terapéuticas de estos tumores.

## **6.2 Historia natural de la cohorte estudiada de pacientes con tumores pobremente diferenciados de senos paranasales**

El estudio de estas variables clínico-patológicas en un número limitado de tumores de senos paranasales no pretende establecer resultados de tipo epidemiológico, sino definir la muestra estudiada y comprobar que se ajusta a las características descritas para estos tumores en series más amplias.

Los tumores pobremente diferenciados de senos paranasales son extremadamente difíciles de clasificar. En particular los SNUC representan un grupo de tumores sin un consenso claro para el diagnóstico (41). Los ONB y los SNEC pueden parecer muy similares y confundirse con el SNUC (65). La clasificación de tumores de cabeza y cuello de la OMS de 2017 definió los SNUC como tumores altamente agresivos de histogénesis incierta, sin evidencia de diferenciación escamosa o glandular, por lo que su diagnóstico es esencialmente un diagnóstico de exclusión (66). Actualmente es posible caracterizar cada vez más tipos de tumores mediante marcadores genéticos moleculares específicos, como en el caso del carcinoma NUT (caracterizado por la presencia de una translocación cromosómica t(15;19) que produce el oncogén de fusión



BRD4–NUT) (70), el carcinoma multifenotípico relacionado con el VPH en casos de VPH de alto riesgo en ausencia de la t(6;9) y reordenamiento de MYB-NFIB (71), el carcinoma SMARCA4-deficiente o el carcinoma SMARCB1-deficiente, definidos por la ausencia de tinción IHQ de estas proteínas (62,74). En la serie estudiada en esta Tesis Doctoral, se ha determinado por IHQ que dos casos fueron SMARCB1-deficiente y SMARCA4-deficiente y un caso carcinoma NUT. Además, en estudios realizados en los últimos años, se han encontrado mutaciones frecuentes en IDH2 en hasta el 82% de los SNUC (72,73); aunque por el momento esta mutación ha sido poco estudiada en este tipo de tumores, los datos genéticos disponibles sugieren que los tumores de senos paranasales con mutaciones en IDH, independientemente de su subtipo histológico, podrían representar una entidad tumoral distinta con un comportamiento clínico menos agresivo (82). En la serie estudiada en esta Tesis Doctoral se ha estudiado la presencia de esta mutación, encontrando 13 casos positivos.

Las variables epidemiológicas, clínicas y patológicas estudiadas en nuestra serie de 69 tumores pobremente diferenciados de senos paranasales coinciden, por lo general, con las descritas en la literatura.

La edad media del conjunto de la muestra fue de 56 años y la proporción de hombres fue mayor que la de mujeres (56% y 44% respectivamente). En los ONB incluidos en nuestra muestra (n=14), la edad media fue de 47 años, lo cual concuerda con lo descrito en la literatura (65,66,177), pero sin embargo se observó una predominancia del sexo femenino (77%) frente al masculino (23%), al contrario de lo reflejado en otras series (65,66), si bien en los estudios realizados recientemente por Classe *et al.* (177) y por London *et al.* (220) también se objetivó esta predominancia del sexo femenino. En cuanto a los SNUC incluidos en nuestra muestra (n=25), la edad media fue de 57 años y se observó sólo una ligera predominancia del sexo masculino sobre el femenino (54% y 46% respectivamente), ambos datos en concordancia con lo descrito en la literatura (250, 251).

A pesar de que los SNSCC y los ITAC suponen el 70% de los tumores de senos paranasales (2), los tumores de senos paranasales de estirpe pobremente diferenciada

más frecuentes son los SNUC y los ONB (252), lo cual concuerda con lo observado en nuestra muestra con 25/69 SNUC y 14/69 ONB.

Los tumores de senos paranasales suelen ser diagnosticados en estadios avanzados debido a la inespecificidad de su sintomatología en fases iniciales. El diagnóstico tardío va a condicionar su tratamiento y su pronóstico. La mayoría de los tumores de nuestra muestra fueron diagnosticados en estadio II (38%) o estadio IVA (31%).

Al comparar los subtipos histológicos de nuestra serie, los ONB (86% de supervivencia global a los 5 años) y los SNUC (60% de supervivencia global a los 5 años) mostraron una mejor supervivencia respecto al resto de estirpes. Estos datos son similares a los observados por otros autores. En una reciente serie que incluye 1360 pacientes diagnosticados de tumores de senos paranasales con diversas histologías, Ferrari *et al.* observaron que, globalmente, los ONB son los tumores de senos paranasales con mejor pronóstico (94% (88,9-99,3%) de supervivencia global a los 5 años) seguidos de los carcinomas adenoide-quísticos y los SNUC (82% (65-100%) de supervivencia global los 5 años) (253).

El 69% de los pacientes de la muestra presentaron recurrencia de la enfermedad, lo que constituye la causa principal de muerte, lo cual se observa en la mayoría de las series (253,254).

El 19% de los tumores de la muestra (13 casos) fueron positivos para la mutación IDH2. En general, la inmunopositividad de la proteína mutante IDH2 coincidió con la mutación IDH2. Sin embargo, 3 casos mostraron discrepancias: un caso que resultó positivo para mutación IDH2 por IHQ resultó negativo (*wild-type*) para dicha mutación utilizando la técnica de PCR, siendo considerado un falso positivo. Por el contrario, dos casos que resultaron positivos para la mutación IDH2 utilizando la técnica de PCR resultaron negativos (*wild-type*) mediante estudio con IHQ. Esta discordancia entre inmunohistoquímica y secuenciación se objetivó también de forma similar en el estudio llevado a cabo por Riobello *et al.* (82). El subtipo tumoral con más casos IDH2 mutados fueron los SNUC (9 casos que suponen el 36% de la muestra de este tipo tumoral), al igual que lo documentado en otros estudios (72,73,82), pero también se halló esta

mutación en otros subtipos como en los HG-non-ITAC con 2/5 (40%) casos y en los SNEC y PD-SNSCC cada uno con 1/6 casos (17%). No se encontró correlación entre la presencia de esta mutación y la edad, el sexo, el estadio tumoral o la presencia de recidiva, al igual que en otras series (72,82). En cuanto al pronóstico, el subconjunto IDH-2 mutado demostró una tendencia a tener mejores resultados de supervivencia, aunque sin obtener valores significativos. Estos datos son interesantes pues no se habían estudiado en esta estirpe de tumores de senos paranasales hasta la fecha.

Por lo anteriormente expuesto, consideramos que nuestra serie es representativa de los carcinomas pobremente diferenciados de senos paranasales, ya que las variables estudiadas se ajustan en líneas generales a lo esperado y exhiben las tendencias habituales en estos tumores. En algunas variables no se alcanzan valores significativos al ser una muestra reducida. No obstante, las tendencias marcadas permiten suponer que estos valores se conseguirían si aumentásemos el número de casos, con las lógicas reservas que ello supone.

### **6.3 Presencia de TILs CD8+**

En nuestra serie, el 33% de los tumores demostraron la presencia de TILs CD8+ en una proporción >10%. En casi todos los casos (21/23), los TILs CD8+ estaban presentes tanto en el compartimento intratumoral como en el compartimento estromal; sin embargo, otros estudios han demostrado una predominancia de TILs CD8+ en el compartimento estromal (177).

Comparando entre los diferentes subtipos histológicos, los TILs CD8+ se observaron con mayor frecuencia en los adenocarcinomas, tanto HG-no-ITAC como ITAC de patrón sólido (60% de casos en ambos subtipos histológicos), lo cual contrasta con lo observado en SNSCC (19-50%) (26, 219) y en los ITAC (8%) (27). No obstante, el posible papel de la inflamación y por tanto la posible presencia de TILs en la génesis de los ITAC ya ha sido observada previamente (255-258).

Aunque no se encontraron relaciones estadísticamente significativas entre la presencia de TILs CD8+ y las variables clinicopatológicas estudiadas, sí se observó una

tendencia a que los tumores en estadios más avanzados presentaran una tasa >10% de TILs CD8+ (Tabla 7).

Se observó una tendencia a que los casos IDH2 mutados tengan más TILs CD8+, tanto en el conjunto de la serie como prestando atención únicamente a los SNUC, aunque sin obtener valores estadísticamente significativos; estos datos no habían sido estudiados en tumores de senos paranasales hasta la fecha.

Debido a que los datos de seguimiento de nuestra muestra fueron muy limitados y por lo tanto la significación estadística del análisis de supervivencia es baja, hablaremos de tendencias a la hora de referirnos a nuestros resultados. Se objetivó una tendencia a presentar un peor resultado clínico en aquellos tumores que presentaban una proporción de TILs CD8+ >10%; este hallazgo difiere con la mayoría de los estudios sobre ITAC, SNSCC y ONB en los que la presencia de TILs CD8+ confería mejores resultados supervivencia (27,176,177,219,259,260). De hecho, en la mayoría de los tumores se ha demostrado una relación positiva entre la presencia de TILs CD8+ y la supervivencia (261). En la revisión sistemática y metaanálisis llevado a cabo por De Ruiter et al. (24) en 2017 sobre el papel pronóstico de los linfocitos T en carcinomas de cabeza y cuello, la presencia de TILs CD8+ demostró un papel pronóstico favorable (aunque con poca diferencia) tanto en términos de supervivencia global (HR 0,67, IC 95% 0,58–0,79) como en términos de supervivencia libre de enfermedad (HR 0,50, IC 95% 0,37–0,68). Sin embargo, también existen otros estudios en los que se observa una asociación entre la presencia de TILs CD8+ con peores resultados de supervivencia en los SNSCC (26) y en otros tumores como en el cáncer de pulmón no microcítico (262,263). Estas diferencias podrían ser debidas a varios factores que difieren entre los diferentes estudios, como el uso de diferentes puntos de corte, el uso de diferentes protocolos para la tinción IHQ, así como a diferencias en las cohortes de pacientes y en los esquemas de tratamiento.

La comparación entre los resultados acerca del papel pronóstico de los TILs CD8+ de nuestro estudio y los resultados de estudios similares sobre tumores de senos paranasales se muestran en la Tabla 11.

**Tabla 11. Valor pronóstico de los TILs en los diferentes estudios**

Estudio	Tipo de tumor	Nº casos	Resultados
Presente estudio	Pobremente diferenciados	69	- Tendencia a peores resultados de SG, SE y SLE
García-Marín <i>et al.</i> <sup>26</sup>	SNSCC	57	- Mayor tasa de recurrencia - Tendencia a peores resultados de supervivencia
García-Marín <i>et al.</i> <sup>27</sup>	ITAC	133	- Estadios más precoces - Menor tasa de recurrencias y metástasis - Mejores resultados de SG - <i>Factor pronóstico favorable independiente</i>
Quan <i>et al.</i> <sup>176</sup>	SNSCC	96	- Menor grado de diferenciación - Mayor tasa de metástasis ganglionares - Mejores resultados de SG y SLE - <i>Factor pronóstico favorable independiente</i>
Classe <i>et al.</i> <sup>177</sup>	ONB	45	- Grado Hyams más alto - No relación con la supervivencia, aunque CD4/CD8 >2 peores resultados
Hongo <i>et al.</i> <sup>219</sup>	SNSCC	131	- Mayor tasa de metástasis ganglionares - Mayor tasa de respuesta completa al tratamiento inicial - Mejores resultados de SLE
Takahashi <i>et al.</i> <sup>259</sup>	SNSCC	53	- Mejores resultados de supervivencia
Gu <i>et al.</i> <sup>260</sup>	SNSCC	38	- Menor tasa de recurrencia - Mejores resultados de supervivencia

La correlación entre la presencia de TILs CD8+ y la expresión de PD-L1 fue positiva y estadísticamente significativa ( $p < 0,006$ ), igual que se ha observado en otros estudios (26,27,176). Dado que la expresión tumoral de PD-L1 se relaciona con la evasión del sistema inmune y en nuestra serie, como se analizará posteriormente, esta expresión mostró también una tendencia a presentar peores resultados de supervivencia, esto nos lleva a pensar que tal vez estos TILs CD8+ sean células disfuncionales, lo cual podría explicar esta tendencia a presentar peores resultados de supervivencia.

#### 6.4 Expresión de PD-L1

En nuestra serie, el 33% de los tumores mostraron una tinción positiva de PD-L1 en >5% de sus células, un porcentaje similar al hallado en otros estudios, como el

realizado por Quan *et al.* (176) en SNSCC, en el que se encontró una positividad similar del 30%. Los estudios realizados en tumores de senos paranasales muestran cifras de positividad para la expresión de PD-L1 que varían entre el 17-46% (22,26,27,176,219,220), si bien esta variabilidad puede ser debida a los diferentes puntos de corte utilizados, al tipo de estudio inmunohistoquímico realizado, al kit diagnóstico empleado en cada caso o a la modalidad de tratamiento recibida. La variabilidad de estos parámetros entre los diferentes estudios se muestra en la Tabla 12.

**Tabla 12. Fuentes de variabilidad en los resultados de la expresión de PD-L1**

<b>Kit diagnóstico</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- PD-L1 IHC 22C3 pharmaDx</li> <li>- PD-L1 IHC 28–8 pharmaDx assay</li> <li>- PD-L1 IHC SP 142</li> <li>- PD-L1 IHC SP263</li> </ul>
<b>Anticuerpo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Clon monoclonal de ratón 22C3</li> <li>- Clon monoclonal de ratón 28-8</li> <li>- Clon monoclonal de ratón SP26</li> <li>- Clon monoclonal de ratón SP142</li> </ul>
<b>Sistema de puntuación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- TPS (<i>Tumor Proportion Score</i>): porcentaje de células tumorales que muestran tinción membranosa parcial o completa</li> <li>- CPS (<i>Combined Positive Score</i>): número de células con tinción positiva para PD-L1 (células tumorales, linfocitos, macrófagos) dividido entre el número total de células tumorales y multiplicado por 100</li> <li>- %IC: proporción de área tumoral ocupada por células inmunes que expresan PD-L1</li> </ul>
<b>Punto de corte</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>\geq 1\%</math></li> <li>- <math>\geq 5\%</math></li> <li>- <math>\geq 10\%</math></li> <li>- <math>\geq 50\%</math></li> </ul>
<b>Células que expresan PD-L1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Células tumorales</li> <li>- Células inmunes infiltrantes de tumor</li> <li>- Ambas</li> </ul>

El subconjunto IDH-2 mutado presentó un porcentaje menor de expresión de PD-L1 (46%), aunque esta relación no fue significativa.

En cuanto a la asociación entre la expresión de PD-L1 y el pronóstico, la gran variedad de estudios en diferentes tipos de tumores publicados hasta la fecha muestran resultados muy contradictorios. En nuestro estudio no se han obtenido relaciones estadísticamente significativas entre dicha expresión y la supervivencia, aunque los resultados sí sugieren una posible asociación entre la expresión positiva de PD-L1 y peores resultados clínicos, lo cual podría ser debido a la supresión de la respuesta inmune antitumoral inducida por PD-L1. Esta tendencia ha sido observada también en CECC en diferentes localizaciones (cavidad oral, orofaringe, faringe, laringe, nasofaringe) (264-267) y también en estudios realizados en tumores de otras localizaciones, como adenocarcinomas de pulmón (268,269), así como en tumores de mama, uroteliales, renales y gástricos (270). Sin embargo, otros estudios no han demostrado ninguna relación entre esta expresión y la supervivencia (271). En cuanto a los estudios realizados en tumores de senos paranasales (SNSCC, ITAC, ONB), también se ha observado esta tendencia a presentar peores resultados de supervivencia en la mayoría de ellos (22,26,219), mientras que en algún estudio la expresión positiva de PD-L1 parece conferir una tendencia a presentar mejores resultados de supervivencia (260) y otros estudios no han demostrado ninguna relación entre esta expresión y la supervivencia (27, 176, 220). Sin embargo, la expresión de PD-L1 sólo ha demostrado su papel como factor pronóstico independiente en el estudio realizado por Hongo *et al.* (219). La comparación entre los resultados acerca del papel pronóstico de la expresión de PD-L1 de nuestro estudio y los resultados de estudios similares sobre tumores de senos paranasales se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Valor pronóstico de PD-L1 en los diferentes estudios

Estudio	Tipo de tumor	Nº casos	Resultados
<b>Presente estudio</b>	Pobremente diferenciados	69	- No relación con variables clínico-patológicas - Tendencia a peores resultados de supervivencia
<b>Riobello et al.<sup>22</sup></b>	SNSCC e ITAC	53 y 126	- Mayor proporción de tumores de patrón sólido - Tendencia a peores resultados de SE y SLE
<b>García-Marín et al.<sup>26</sup></b>	SNSCC	57	- No relación con variables clínico-patológicas - No estudiada como tal, pero TME I y III peores resultados de SV
<b>García-Marín et al.<sup>27</sup></b>	ITAC	133	- No relación con la supervivencia ni valor pronóstico
<b>Quan et al.<sup>176</sup></b>	SNSCC	96	- Menor grado de diferenciación - Tendencia a desarrollar metástasis ganglionares - No relación con supervivencia
<b>Hongo et al.<sup>219</sup></b>	SNSCC	131	- No relación con variables clínico-patológicas - Peores resultados de supervivencia - <i>Factor pronóstico independiente</i>
<b>London et al.<sup>220</sup></b>	ONB	10	- No relación con variables clínico-patológicas - No relación con supervivencia
<b>Gu et al.<sup>260</sup></b>	SNSCC	53	- Mejores resultados de supervivencia

PD-L1 fue el primer biomarcador predictivo aprobado por la FDA para el cáncer de pulmón de células no pequeñas en 2015. Desde entonces, la FDA ha aprobado este biomarcador para seis tipos de tumores adicionales (gástrico o adenocarcinoma de la unión gastroesofágica, cáncer de cuello uterino, carcinoma urotelial, CECC, carcinoma de células escamosas de esófago y carcinoma de mama triple negativo (272). A día de hoy, PD-L1 es el biomarcador predictivo más investigado y utilizado clínicamente. La mayoría de los ensayos clínicos realizados en CECC y en carcinomas pulmonares no microcíticos han mostrado una respuesta clínica más favorable a los anticuerpos monoclonales dirigidos frente a PD-1 (pembrolizumab y nivolumab) y PD-L1 (atezolizumab y durvalumab) en tumores con expresión positiva de PD-L1 (196,216-218,273,274). Por otro lado, encontramos también estudios en los que no se demuestra



una relación entre la respuesta a estos anticuerpos monoclonales y la expresión de PD-L1 (275,276).

En el caso de los CECC, el pembrolizumab fue aprobado para pacientes con tumores recurrentes/metastásicos que expresan PD-L1, a la vista de los resultados del ensayo clínico KEYNOTE-040 de fase 3 (277), en el cual se demostró la superioridad de este fármaco frente a las terapias convencionales en aquellos tumores con expresión positiva de PD-L1 (TPS  $\geq$ 50%); en este ensayo clínico, el 26% de los pacientes (129/495) tenían tumores que expresaban PD-L1 con una TPS  $\geq$ 50% y la indicación finalmente aprobada seleccionaba los casos más susceptibles de beneficiarse de este fármaco en base a la expresión de PD-L1. Por otro lado, el nivolumab también fue aprobado como tratamiento para tumores de cabeza y cuello recurrentes/metastásicos a la vista de los resultados del ensayo clínico CheckMate 141 de fase 3 (19); en este ensayo, de los 240 pacientes tratados con nivolumab, se estudió la expresión de PD-L1 en 172; de estos, 96 (56%) expresaban PD-L1 en una proporción  $>$ 1% y 76 (44%) en una proporción  $<$ 1%; se objetivaron mejores resultados de supervivencia global frente a aquellos pacientes tratados con terapias convencionales en ambos grupos, aunque con una *hazard ratio* (HR) de 0,55 en el grupo con expresión de PD-L1  $>$ 1% frente a una HR de 0,27 en el grupo con expresión de PD-L1  $<$ 1%. Por lo tanto, actualmente tanto el nivolumab como el pembrolizumab están aprobados para el tratamiento de segunda línea del cáncer recurrente y metastásico.

En el campo de los tumores de senos paranasales, hay que destacar el estudio realizado por Park *et al.* (278) en el que se obtuvo una respuesta favorable a los inhibidores de PD-1 en una serie de 11 SNSCC recurrentes/metastásicos, aunque la respuesta no demostró estar relacionada con la expresión de PD-L1. También el estudio realizado por Ueda *et al.* (279) que incluyó 18 tumores de senos paranasales de diferentes subtipos histológicos en pacientes tratados con nivolumab, demostrando tasas de respuesta comparables a las observadas en el CECC, mostrando mayor eficacia en los tumores de senos paranasales no epidermoides de alto grado. Mencionar también el estudio llevado a cabo por Colevas *et al.* (280) en el que se demostró una buena respuesta a atezolizumab en pacientes con carcinoma nasofaríngeo.

Hay que tener en cuenta que, como marcador para la selección de pacientes susceptibles de beneficiarse del tratamiento inmunoterápico, la IHQ para PD-L1 tiene varias limitaciones (281), como la gran variedad de ensayos diferentes disponibles cuyos resultados difieren por las causas mencionadas ya anteriormente, la escasa reproductibilidad interobservador a la hora de valorar la expresión de PD-L1 o la clasificación dicotómica de la expresión de PD-L1 en positiva o negativa realizada en la mayoría de estudios sin tener en cuenta la totalidad del microambiente tumoral. Por lo tanto, de cara a mejorar la utilidad clínica de PD-L1 como biomarcador para el uso de inmunoterapia, sería necesario instaurar una estandarización a la hora de realizar los estudios para conseguir resultados más uniformes, reproducibles y comparables.

### 6.5 Presencia de MSI

En nuestra serie, tras aplicar la tinción de las proteínas reparadoras PMS2, MLH1, MSH2 y MSH6 como marcadores de MSI, encontramos 5/69 (7%) casos positivos: dos eran SNEC, dos SNUC y uno era HG-no-ITAC. La mutación IDH-2 resultó ser mutuamente excluyente con la presencia de MSI. Para el estudio de la MSI hemos utilizado la tinción IHQ debido a que, por su disponibilidad y relativa sencillez tanto de realización como de interpretación, actualmente es la técnica más recomendada (234). De esos 5 casos, 4 presentaron ausencia completa y uno una expresión reducida de PMS2, acompañada de pérdida completa de MLH1 en 2 casos y reducción de MLH1 en 2 casos, mientras que en un caso PMS2 fue el único marcador perdido. Un caso mostró la ausencia completa de los 4 marcadores y un caso mostró pérdida de PMS2 y MLH1 y reducción de MSH2 y MSH6. La presencia de MSI en tumores de senos paranasales ha sido escasamente estudiada hasta ahora. En el estudio de Hongo *et. al* (219), 3/131 (2,3%) de los SNSCC analizados presentaban MSI, estudiada mediante IHQ, presentando los 3 casos pérdida simultánea de MLH1 y PMS2. En el estudio de Hieggelke *et al.* (248), se analizaron 220 tumores de diferentes estirpes, entre ellos SNEC y SNUC, mediante IHQ, consiguiendo una tinción satisfactoria en 174 de ellos; el subtipo histológico predominante fueron los SNSCC con 125 tumores, de los cuales 4 (3,2%) presentaron MSI con pérdida de expresión de PMS2 y expresión reducida o pérdida completa de MLH1. Además, en este estudio se analizaron 10 líneas celulares de SNSCC mediante PCR multiplex con el panel de referencia con cinco marcadores de mononucleótidos BAT25, BAT26, D5S346,

D2S123 y D17S250, evidenciando que una línea celular era deficiente en MMR; la misma línea celular resultó presentar una alta carga mutacional tumoral (TMB) mediante técnicas de secuenciación. En el estudio de García-Martínez *et al.* (30) llevado a cabo por nuestro grupo se demostró la presencia de MSI en 5/24 SNSCC (21%) y 1/41 ITAC (2%). Esta baja incidencia de MSI concuerda con otros estudios realizados en tumores de cabeza y cuello (29,282). A excepción de los tumores endometriales, en los que se ha documentado que la presencia de MSI es aproximadamente de un 30%, o en los tumores colorrectales o gástricos donde se ha documentado aproximadamente un 20%, la presencia de MSI en el resto de los tumores es menor del 5% (282).

Se ha documentado en la literatura que la pérdida de la actividad de las proteínas del sistema MMR conduce a la acumulación de mutaciones y a la presencia de una alta TMB, acompañándose este fenotipo molecular de un aumento del número de TILs y de la expresión de PD-L1 (245). La infiltración de células inmunitarias puede ser el resultado de la gran cantidad de mutaciones encontradas en los tumores que presentan MSI, que dan como resultado neoantígenos proteicos mutantes que al ser presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad hacen que el tumor sea reconocido como extraño ante el sistema inmunitario del paciente (283). Esta relación entre la presencia de MSI, la expresión de PD-L1 y la presencia de TILs CD8+ se ha documentado en diversos estudios en otros tipos de tumores (284-286). En el estudio realizado por Nonomura *et al.* (284), la presencia de TILs CD8+ resultó significativamente mayor en aquellos tumores con MSI ( $p=0,026$ ), aunque no se encontraron relaciones estadísticamente significativas con la expresión de PD-L1. Por su parte, en el estudio realizado por Liu *et al.* (285), se objetivó una relación estadísticamente significativa entre la expresión de PD-L1 y la presencia de MSI ( $p<0,001$ ). En el estudio realizado por Dislich *et al.* (286), tanto la presencia de TILs CD8+ como la expresión de PD-L1 se asociaron de forma estadísticamente significativa con la presencia de MSI ( $p=0,005$  y  $p<0,001$  respectivamente). Sin embargo, en nuestro estudio encontramos que la positividad para MSI es mutuamente excluyente con PD-L1 y casi también con los TILs CD8+.

Dado que sólo contamos con la información de seguimiento de dos de estos cinco casos positivos para MSI, no fue posible llevar a cabo una evaluación significativa del valor pronóstico; sin embargo, sí observamos que estos pacientes tuvieron una

supervivencia muy pobre de 2 y 6 meses, lo cual contrasta con lo observado en la literatura en general, pues la presencia de MSI ha resultado ser un factor predictor de un resultado clínico favorable. La mayoría de los estudios han revelado que los pacientes con altos niveles de MSI (MSI-high) presentan una mejor respuesta inmune antitumoral y poseen la capacidad de inhibir el crecimiento de células tumorales, lo cual les confiere un mejor pronóstico en comparación con aquellos con niveles bajos de MSI (MSI-low) o sin MSI (287-289). En los escasos estudios disponibles sobre MSI en tumores de senos paranasales, Hongo *et al.* encontraron que los pacientes que presentaron MSI tuvieron un pronóstico excelente, independientemente de la expresión de PD-L1 (219). En el estudio de García-Martínez *et al.* (30), los casos que presentaron MSI parecían tener una supervivencia libre de enfermedad más prolongada que los casos negativos para MSI (24,2 meses frente a 12,4 meses), pero debido al bajo número de pacientes concluyeron que dicho hallazgo debía considerarse preliminar, al igual que sucede en nuestro estudio.

En la actualidad se propone que la presencia de MSI pueda resultar un marcador de utilidad a la hora de seleccionar a aquellos pacientes más susceptibles de beneficiarse del tratamiento con inhibidores de los puntos de control inmunitario. Le DT *et al.* en su estudio demostraron un mayor número de mutaciones somáticas y neoantígenos en tumores que presentaban MSI respecto a aquellos que no la presentaban ( $p=0.007$ ), correlacionándose con mejores respuestas al tratamiento con inhibidores de los puntos de control inmunitario y supervivencias libres de progresión más duraderas (245). Diversos ensayos clínicos han demostrado una respuesta satisfactoria al tratamiento con pembrolizumab en tumores con MSI-H/dMMR que habían progresado tras tratamiento con QT, en base a las excelentes tasas de respuesta observadas (tasa de respuesta general del 39,6 %, tasa de respuesta completa del 7 % y duración de respuesta de 6 meses o más en el 78% de los pacientes que respondieron (229,242,243,290). Por este motivo, en 2017 la FDA agilizó la aprobación de este fármaco como tratamiento de segunda línea en tumores sólidos con MSI/dMMR irresecables o metastásicos, independientemente de la localización del tumor primario y la estirpe histológica, siendo la primera vez que un fármaco era indicado para tumores sólidos en general, basándose en un biomarcador común (32,33). También la FDA ha aprobado el

nivolumab para el tratamiento del carcinoma colorrectal metastásico MSI-H/dMMR refractario a la quimioterapia a la vista de los resultados del estudio CheckMate 142 (244).

## **6.6 Otros biomarcadores en investigación**

Hoy en día se han propuesto diferentes biomarcadores predictivos para optimizar el uso de IT, incluyendo biomarcadores predictivos positivos para predecir la respuesta a inhibidores de los puntos de control inmunitario, predictores negativos para predecir la resistencia a estos fármacos y biomarcadores predictores de la toxicidad relacionada con las reacciones inmunes (291,292). De ellos, los más validados y utilizados clínicamente son los tres biomarcadores predictivos positivos aprobados por la FDA: PD-L1, (293) MSI/dMMR y la TMB (272). De los 2 primeros hemos hablado previamente.

En cuanto a la TMB, se define como el número total de mutaciones somáticas no sinónimas por megabase (Mut/Mb), incluidas mutaciones de cambio de marco, inserciones, mutaciones puntuales y deleciones. La aparición de estas mutaciones está involucrada en la síntesis de proteínas anómalas que pueden actuar como neoantígenos, activando respuestas antitumorales. Este biomarcador se ha asociado con respuestas favorables a inhibidores de los puntos de control inmunitario en diferentes tipos de tumores y ha sido aprobado en junio de 2020 como biomarcador para el uso de pembrolizumab para el tratamiento de tumores sólidos irreseccables o metastásicos. Sin embargo, al igual que ocurre con PD-L1, la evaluación de TMB está muy influenciada por los kits y métodos utilizados entre los diferentes estudios, por lo que hay que ser cautos a la hora de comparar los valores de TMB en la literatura (294).

Debido a que estos tres biomarcadores predictivos aprobados por la FDA tienen sus limitaciones propias como hemos visto (PD-L1 tiene valores predictivos positivos y negativos limitados, MSI-H/dMMR tiene una baja prevalencia en muchos cánceres metastásicos comunes y la TMB se ve obstaculizada por el alto costo y las complicaciones técnicas), en la actualidad se están estudiando otros potenciales biomarcadores.

Entre estos biomarcadores potenciales aún no aprobados por la FDA cabe mencionar la inactivación de *PTEN*, la mutación de la subunidad del ADN polimerasa *POLE* o las mutaciones ligadas a *KRAS* y a *STK11*. *PTEN* es una fosfatasa expresada de forma ubicua con función supresora tumoral; una mutación de uno solo de sus alelos puede reprimir irreversiblemente su función, aumentando la susceptibilidad a la carcinogénesis. La disminución de la expresión de esta proteína también se ha relacionado con una susceptibilidad disminuida a los inhibidores de los puntos de control inmunitario, probablemente debida a la menor infiltración por linfocitos T (295,296). Por su parte, las mutaciones en la subunidad *POLE* de la ADN polimerasa podrían servir como biomarcador positivo para el uso de inhibidores de los puntos de control inmunitario. *POLE* es una subunidad de la ADN polimerasa épsilon, que participa en la replicación y reparación del ADN; las mutaciones en el dominio de corrección de *POLE* conllevan una tasa de mutaciones dos veces mayor, influyendo directamente en la TMB. Además, los tumores con mutaciones en *POLE* tienen más neoantígenos y más TILs (297). En cuanto a las mutaciones en *KRAS* y *STK11*, parecen actuar como biomarcador negativo para el uso de inhibidores de los puntos de control inmunitario. Las mutaciones somáticas activadoras en los codones 12 y 13 de *KRAS* suelen estar asociadas de forma estadísticamente significativa a las mutaciones del gen *STK11*, que va a controlar la vía de señalización de mTOR mediante la codificación la quinasa *LKB1* (298). Ambas mutaciones confieren un peor pronóstico de supervivencia y se asocian a una peor respuesta a inhibidores de los puntos de control inmunitario, según se ha observado en diversos estudios, probablemente debido a que estas mutaciones disminuyen el número de TILs CD8+ y también la expresión de PD-L1 (299-301).

También se han propuesto las firmas de expresión genética como potenciales biomarcadores, como la firma de expresión genética inflamada por células T (GEP), la firma de disfunción inmune y exclusión de células T (TIDE), la firma de plasticidad melanocítica (MPS) y la firma genética centrada en células B (272). El perfil de expresión genética inflamada por células T (GEP), representada por genes relacionados con la señalización de IFN- $\gamma$ , la presentación de antígenos, moléculas citotóxicas efectoras y citocinas de linfocitos T activos, es indicativa de un microambiente tumoral favorable para el tratamiento con inhibidores de los puntos de control inmunitario. Ha

demostrado su utilidad a la hora de predecir la respuesta a pembrolizumab en diversos tumores sólidos y su valor predictivo fue demostrado en un estudio con CECC, en el que además demostró tener un mejor valor predictivo que PD-L1 (302). Por el contrario, la firma genética de disfunción inmune y exclusión de células T (TIDE) se basa en la pérdida de la funcionalidad de las células T por dos mecanismos principales de evasión tumoral de la respuesta inmune, que son la presencia de células T disfuncionales y la falta de infiltración del tumor por células T funcionales, lo que refleja un microambiente tumoral desfavorable para la respuesta de inhibidores de los puntos de control inmunitario. Una puntuación más baja en el panel TIDE ha demostrado ser predictora de una supervivencia más prolongada a largo plazo y, además, como biomarcador para el uso de inhibidores de los puntos de control inmunitario, tiene mejor rendimiento que PD-L1 y que la TMB (303). La firma de plasticidad melanocítica (MPS) es un conjunto de 45 genes hallados en melanomas que reflejan la pluripotencia y la diferenciación del linaje melanocítico; una puntuación alta en el panel MPS implica pluripotencia e indiferenciación y con ello peor pronóstico y menor tasa de respuesta a inhibidores de los puntos de control inmunitario, también con un rendimiento mayor que PD-L1, TMB e incluso que TIDE (304). Por último, la firma genética centrada en células B se basa en genes relacionados con los infiltrados de células B presentes en los órganos linfoides terciarios, que se asocian a una mayor supervivencia y han demostrado ser predictores de buena respuesta a inhibidores de los puntos de control inmunitario en diversos tumores (305,306).

### **6.7 Futuras perspectivas para el tratamiento de los tumores de senos paranasales**

En esta Tesis Doctoral se han estudiado la presencia de TILs CD8+, la expresión de PD-L1 y la presencia de MSI como posibles biomarcadores para el uso de fármacos anti-PD-1/anti-PD-L1 en un grupo de 69 pacientes con tumores pobremente diferenciados de senos paranasales, debido a la imperiosa necesidad de encontrar nuevas opciones terapéuticas para los estadios avanzados de esta enfermedad. Nuestros resultados muestran que al menos uno de estos posibles biomarcadores (>10 % de TILs CD8+, >5 % de expresión de PD-L1 o positividad para MSI definida como déficit de alguna proteína del sistema MMR) está presente en el 39 % (27/69) de los casos. De acuerdo con la literatura, para que el tratamiento con inhibidores de los puntos de

control inmunitario sea más eficaz, lo ideal es que los tumores expresen PD-L1 y tengan TILs CD8+ activados por el tumor, lo que observamos en el 19 % (13/69) de los casos. La presencia de MSI en 5 casos fue mutuamente excluyente con estos 13 casos, lo que elevaría el número total elegible para este tratamiento inmunoterápico a 18 pacientes, el 26% de la cohorte.

En la actualidad, la inmunoterapia ha demostrado ser una opción terapéutica prometedora en la mayoría de los tumores, incluidos los tumores de cabeza y cuello. Desde la aprobación del nivolumab y el pembrolizumab, se ha conseguido mejorar tanto la supervivencia como la calidad de vida de estos pacientes y la inmunoterapia se ha incorporado como tratamiento de primera línea en tumores recurrentes y/o metastásicos, en monoterapia o en combinación con la QT clásica.

Además, hasta la fecha, diversos ensayos han estudiado la efectividad de estos fármacos en el tratamiento de CECC primarios, no solo en monoterapia, sino también como tratamiento neoadyuvante a un tratamiento loco-regional o de forma adyuvante (307). En la actualidad, el uso de inhibidores de puntos de control inmunitario en el contexto de neoadyuvancia/inducción es prometedor, pero sigue siendo objeto de investigación en el CECC (308). De igual modo, el uso de inmunoterapia en un contexto de adyuvancia también puede abrir una oportunidad para mejorar los resultados de los pacientes con CECC (309). Sin embargo, el uso de inmunoterapia de modo concomitante no parece mejorar los resultados observados con los tratamientos tradicionales (310).

No obstante, es importante mencionar que en todos estos trabajos no se incluyen tumores de senos paranasales, por lo que sería necesario realizar ensayos clínicos similares en tumores de senos paranasales avanzados y a la vista de los resultados, podrían ser tumores susceptibles de beneficiarse de estas terapias.



7

---

# CONCLUSIONES

1. La evaluación de los biomarcadores: TILs CD8+, expresión de PD-L1 y presencia de MSI se presenta como una herramienta valiosa para la selección de pacientes con tumores pobremente diferenciados de senos paranasales que podrían beneficiarse de tratamientos con IT. La identificación precisa de estos marcadores permite no sólo una mejor comprensión del microambiente tumoral, sino también la personalización de las estrategias terapéuticas, optimizando así los resultados clínicos y mejorando la calidad de vida de los pacientes. La integración de estos biomarcadores en la práctica clínica puede representar un avance significativo en el manejo de esta patología oncológica compleja.
2. Las variables clínicas y patológicas estudiadas en nuestra serie se ajustan, en general, a las características descritas en la literatura en tumores de senos paranasales.
3. Observamos la presencia de TILs CD8+ en un subgrupo de los tumores de la muestra estudiada. Aunque la presencia de los mismos no se relacionó con la supervivencia, podría servir como biomarcador para seleccionar a pacientes con mayor probabilidad de beneficiarse de la inmunoterapia anti-PD-1, de forma similar a lo observado en otros tipos tumorales.
4. Obtuvimos una expresión de PD-L1 en células tumorales en un subgrupo de tumores de la muestra. Esta expresión no se relacionó con la supervivencia, pero podría servir como biomarcador para seleccionar a pacientes con mayor probabilidad de beneficiarse de la inmunoterapia anti-PD-1, de forma similar a lo observado en otros tipos tumorales.
5. Comprobamos la presencia de MSI definida como déficit de alguna proteína del sistema “mismatch repair” en un pequeño porcentaje de los tumores de la muestra.
6. La expresión tumoral de PD-L1 se asoció de forma significativa con la presencia de niveles altos de TILs CD8+, lo cual indica que la vía de PD-1/PD-L1 puede ser una potencial diana para seleccionar a los pacientes más susceptibles de beneficiarse del tratamiento con inhibidores de los puntos de control inmunitarios.

7. Al menos uno de estos biomarcadores (>10 % de TILs CD8+, >5 % de expresión de PD-L1 o positividad para MSI definida como déficit de alguna proteína del sistema “mismatch repair”) está presente en casi la mitad de los casos, lo que podría ser útil para seleccionar aquellos pacientes susceptibles de ser tratados con inhibidores de los puntos de control inmunitario.

---

# **BIBLIOGRAFÍA**

1. Bray F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Zanetti R, et al. Cancer Incidence in Five Continents, Vol. XI. IARC Scientific Publication No. 166. 2021. Lyon: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://publications.iarc.fr/597>. Licence: CC BY-NC-ND 3.0 IGO.
2. Llorente JL, López F, Suárez C, Hermsen MA. Sinonasal carcinoma: clinical, pathological, genetic and therapeutic advances. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014 Aug; 11(8):460-72.
3. Ansa B, Goodman M, Ward K, Kono SA, Owonikoko TK, Higgins K, et al. Paranasal sinus squamous cell carcinoma incidence and survival based on Surveillance, Epidemiology, and End Results data, 1973 to 2009. *Cancer*. 2013 Jul; 119(14):2602-10.
4. Robin TP, Jones BL, Gordon OM, Phan A, Abbott D, McDermott JD, et al. A comprehensive comparative analysis of treatment modalities for sinonasal malignancies. *Cancer*. 2017 Aug; 123(16):3040-3049.
5. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012 Mar; 12(4):252-64.
6. Gandini S, Massi D, Mandalà M. PD-L1 expression in cancer patients receiving anti PD-1/PD-L1 antibodies: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016 Apr; 100:88-98.
7. Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res*. 2020 Mar; 10(3):727-742.
8. Jiang Y, Chen M, Nie H, Yuan Y. PD-1 and PD-L1 in cancer immunotherapy: clinical implications and future considerations. *Hum Vaccin Immunother*. 2019;15(5):1111-1122.
9. Philips GK, Atkins M. Therapeutic uses of anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies. *Int Immunol*. 2015 Jan;27(1):39-46.
10. Botticelli A, Cirillo A, Pomati G, Cortesi E, Rossi E, Schinzari G, et al. Immune-related toxicity and soluble profile in patients affected by solid tumors: a network approach. *Cancer Immunol Immunother*. 2023 Jul; 72(7):2217-2231
11. Shiravand Y, Khodadadi F, Kashani SMA, Hosseini-Fard SR, Hosseini S, Sadeghirad H, et al. Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Therapy. *Curr Oncol*. 2022 Apr; 29(5):3044-3060
12. Akinleye A, Rasool Z. Immune checkpoint inhibitors of PD-L1 as cancer therapeutics. *J Hematol Oncol*. 2019 Sep; 12(1):92
13. Wu M, Huang Q, Xie Y, Wu X, Ma H, Zhang Y, et al. Improvement of the anticancer efficacy of PD-1/PD-L1 blockade via combination therapy and PD-L1 regulation. *J Hematol Oncol*. 2022 Mar; 15(1):24
14. Gong J, Chehrizi-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 Jan; 6(1):8.
15. 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). *Journal for Immunotherapy of Cancer*. 2019 Jul; 7(1):184
16. Davis AA, Patel VG. The role of PD-L1 expression as a predictive biomarker: an analysis of all US Food and Drug Administration (FDA) approvals of immune

- checkpoint inhibitors. *J Immunother Cancer*. 2019 Oct; 7(1):278
17. Carbognin L, Pilotto S, Milella M, Vaccaro V, Brunelli M, Caliò A, 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 Jun; 10(6):e0130142
  18. Mehra R, Seiwert TY, Gupta S, Weiss J, Gluck I, Eder JP, 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 Jul; 119(2):153-159
  19. Ferris RL, Blumenschein G Jr, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, 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 Jun; 81:45-51
  20. 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 Jun; 12(6):e0179536
  21. 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 Nov; 86:81-90
  22. Riobello C, Vivanco B, Reda S, López-Hernández A, García-Inclán C, Potes-Ares S, Cabal VN, López F, Llorente JL, Hermsen MA. Programmed death ligand-1 expression as immunotherapeutic target in sinonasal cancer. *Head Neck*. 2018 Apr; 40(4):818-827
  23. Sanchez-Canteli M, Granda-Díaz R, Del Rio-Ibisate N, Allonca E, López-Alvarez F, Agorreta J, Garmendia I, Montuenga LM, García-Pedrero JM, Rodrigo JP. PD-L1 expression correlates with tumor-infiltrating lymphocytes and better prognosis in patients with HPV-negative head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Immunol Immunother*. 2020 Oct; 69(10):2089-2100
  24. 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 Aug; 6(11):e1356148
  25. Rodrigo JP, Sánchez-Canteli M, López F, Wolf GT, Hernández-Prera JC, Williams MD, Willems SM, Franchi A, Coca-Pelaz A, Ferlito A. Tumor-Infiltrating Lymphocytes in the Tumor Microenvironment of Laryngeal Squamous Cell Carcinoma: Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomedicines*. 2021 Apr; 9(5):486
  26. García-Marín R, Reda S, Riobello C, Cabal VN, Suárez-Fernández L, Vivanco B, et al. Prognostic and Therapeutic Implications of Immune Classification by CD8+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes and PD-L1 Expression in Sinonasal Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun; 22(13):6926
  27. García-Marín R, Reda S, Riobello C, Cabal VN, Suárez-Fernández L, Vivanco B, et al. CD8+ Tumour-Infiltrating Lymphocytes and Tumour Microenvironment Immune Types as Biomarkers for Immunotherapy in Sinonasal Intestinal-Type Adenocarcinoma. *Vaccines (Basel)*. 2020 Apr; 8(2):202
  28. Lu Y, Chan YT, Tan HY, Li S, Wang N, Feng Y. Epigenetic regulation in human

- cancer: the potential role of epi-drug in cancer therapy. *Mol Cancer*. 2020 Apr; 19(1):79
29. Bonneville R, Krook MA, Kautto EA, Miya J, Wing MR, Chen HZ, et al. Landscape of Microsatellite Instability Across 39 Cancer Types. *JCO Precis Oncol*. 2017 Oct;2017:PO.17.00073
  30. Martínez JG, Pérez-Escuredo J, López F, Suárez C, Alvarez-Marcos C, Llorente JL, et al. Microsatellite instability analysis of sinonasal carcinomas. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2009 Jan; 140(1):55-60
  31. Motta R, Cabezas-Camarero S, Torres-Mattos C, Riquelme A, Calle A, Figueroa A, et al. Immunotherapy in microsatellite instability metastatic colorectal cancer: Current status and future perspectives. *J Clin Transl Res*. 2021 Aug; 7(4):511-522.
  32. Chang L, Chang M, Chang HM, Chang F. Microsatellite Instability: A Predictive Biomarker for Cancer Immunotherapy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2018 Feb; 26(2):e15-e21
  33. Sidaway P. MSI-H: a truly agnostic biomarker? *Nat Rev Clin Oncol*. 2020 Feb; 17(2):68
  34. Zyłka S, Bień S, Kamiński B, Postuła S, Ziołkowska M. Epidemiology and clinical characteristics of the sinonasal malignancies. *Otolaryngol Pol*. 2008;62(4):436-41
  35. Barbieri PG, Lombardi S, Candela A, Festa R. Nasal sinus cancer registry of the province of Brescia. *Epidemiol Prev*. 2003 Jul-Aug; 27(4):215-20
  36. Mensi C, Consonni D, Sieno C, De Matteis S, Riboldi L, Bertazzi PA. Sinonasal cancer and occupational exposure in a population-based registry. *Int J Otolaryngol*. 2013 Sep; 2013:672621
  37. Olsen KD. Nose and sinus tumours. In: McCaffrey T, editor. *Rhinologic diagnosis and treatment*. New York: Thieme; 1997. p. 334-359
  38. Sarradin V, Siegfried A, Uro-Coste E, Delord JP. WHO classification of head and neck tumours 2017: Main novelties and update of diagnostic methods. *Bull Cancer*. 2018 Jun; 105(6):596-602
  39. Turner JH, Reh DD. Incidence and survival in patients with sinonasal cancer: a historical analysis of population-based data. *Head Neck*. 2012 Jun; 34(6):877-85
  40. Youlden DR, Cramb SM, Peters S, Porceddu SV, Møller H, Fritschi L, Baade PD. International comparisons of the incidence and mortality of sinonasal cancer. *Cancer Epidemiol*. 2013 Dec; 37(6):770-9
  41. Frierson HF. Sinonasal undifferentiated carcinoma. In: Barnes L, Eveson J, Reichart P, Sidransky D, eds. *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. Lyon, France: IARC Press; 2005:19. *World Health Organization Classification of Tumours*.
  42. Albrecht C, Borm PJ, Unfried K. Signal transduction pathways relevant for neoplastic effects of fibrous and non-fibrous particles. *Mutat Res*. 2004 Sep; 553(1-2):23-35
  43. Fubini B. Surface reactivity in the pathogenic response to particulates. *Environ Health Perspect*. 1997 Sep; 105 Suppl 5(Suppl 5):1013-20
  44. Roessner A, Kuester D, Malfertheiner P, Schneider-Stock R. Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. *Pathol Res Pract*. 2008; 204(7):511-24
  45. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002 Dec;

- 420(6917):860-7
46. Cruz SM, Balkwill FR. Inflammation and cancer: advances and new agents. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015 Oct; 12(10):584-96
  47. Ruffin AT, Li H, Vujanovic L, Zandberg DP, Ferris RL, Bruno TC. Improving head and neck cancer therapies by immunomodulation of the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer*. 2023 Mar; 23(3):173-188
  48. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Arsenic, metals, fibres, and dusts. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 2012;100:11-465
  49. Götte K, Hörmann K. Sinonasal malignancy: What's new? *ORL*. 2004 Jan;66(2):85-97
  50. Doescher J, Piontek G, Wirth M, Bettstetter M, Schlegel J, Haller B, Brockhoff G, Reiter R, Pickhard A. Epstein-Barr virus infection is strictly associated with the metastatic spread of sinonasal squamous-cell carcinomas. *Oral Oncol*. 2015 Oct; 51(10):929-34
  51. Bishop JA, Guo TW, Smith DF, Wang H, Ogawa T, Pai SI, et al. Human papillomavirus-related carcinomas of the sinonasal tract. *Am J Surg Pathol*. 2013 Feb; 37(2):185-92
  52. Isayeva T, Li Y, Maswahu D, Brandwein-Gensler M. Human papillomavirus in non-oropharyngeal head and neck cancers: a systematic literature review. *Head Neck Pathol*. 2012 Jul; 6 Suppl 1(Suppl 1):S104-20
  53. Batsakis JG, Suarez P. Schneiderian papillomas and carcinomas: a review. *Adv Anat Pathol*. 2001 Mar; 8(2):53-64
  54. Menendez M, Cabal VN, Vivanco B, Suarez-Fernandez L, Lopez F, Llorente JL, et al. Loss of p16 expression is a risk factor for recurrence in sinonasal inverted papilloma. *Rhinology*. 2022 Dec; 60(6):453-461
  55. 't Mannetje A, Kogevinas M, Luce D, Demers PA, Bégin D, Bolm-Audorff U, et al. Sinonasal cancer, occupation, and tobacco smoking in European women and men. *Am J Ind Med*. 1999 Jul; 36(1):101-7
  56. World Health Organization International Agency for Research on Cancer. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Tobacco smoke and involuntary smoking Vol. 83* (IARC Press, 2004)
  57. Luce D, Leclerc A, Bégin D, Demers PA, Gérin M, Orlowski E, et al. Sinonasal cancer and occupational exposures: a pooled analysis of 12 case-control studies. *Cancer Causes Control* 2002 Mar; 13:147-157
  58. Suárez Nieto C. Tumores rinosinuales. En: Suárez Nieto C, Álvarez Álvarez I, Llorente Pendás JL, Sevilla García MA. *Tratado de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*. 2a ed. Editorial Médica Panamericana; 2007:3126-3136.
  59. Iezzoni JC, Mills SE. "Undifferentiated" small round cell tumors of the sinonasal tract: differential diagnosis update. *Am J Clin Pathol*. 2005 Dec; 124 Suppl:S110-21
  60. Dulguerov P, Jacobsen MS, Allal AS, Lehmann W, Calcaterra T. Nasal and paranasal sinus carcinoma: are we making progress? A series of 220 patients and a systematic review. *Cancer*. 2001 Dec; 92(12):3012-29
  61. Enepekides DJ. Sinonasal undifferentiated carcinoma: an update. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005 Aug; 13(4):222-5



62. Taverna C, Agaimy A, Franchi A. Towards a Molecular Classification of Sinonasal Carcinomas: Clinical Implications and Opportunities. *Cancers (Basel)*. 2022 Mar; 14(6):1463
63. Kuijpers JH, Louwman MW, Peters R, Janssens GO, Burdorf AL, Coebergh JW. Trends in sinonasal cancer in The Netherlands: more squamous cell cancer, less adenocarcinoma. A population-based study 1973-2009. *Eur J Cancer*. 2012 Oct; 48(15):2369-74
64. Thompson LDR, Franchi A. New tumor entities in the 4th edition of the World Health Organization classification of head and neck tumors: Nasal cavity, paranasal sinuses and skull base. *Virchows Arch*. 2018 Mar; 472(3):315-330
65. Bell D, Hanna EY, Weber RS, DeMonte F, Triantafyllou A, Lewis JS Jr, et al. Neuroendocrine neoplasms of the sinonasal region. *Head Neck*. 2016 Apr;38 Suppl 1:E2259-66
66. Bell D, Hanna EY. Sinonasal undifferentiated carcinoma: morphological heterogeneity, diagnosis, management and biological markers. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2013 Mar; 13(3):285-96
67. Bishop JA. Recently described neoplasms of the sinonasal tract. *Semin Diagn Pathol*. 2016 Mar; 33(2):62-70
68. Stelow EB, Bishop JA. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Tumors of the Nasal Cavity, Paranasal Sinuses and Skull Base. *Head Neck Pathol*. 2017 Mar; 11(1):3-15
69. Rooper LM, Agaimy A, Dickson BC, Dueber JC, Eberhart CG, Gagan J, et al. DEK-AFF2 Carcinoma of the Sinonasal Region and Skull Base: Detailed Clinicopathologic Characterization of a Distinctive Entity. *Am J Surg Pathol*. 2021 Dec; 45(12):1682-1693
70. French CA, Miyoshi I, Kubonishi I, Grier HE, Perez-Atayde AR, Fletcher JA. BRD4-NUT fusion oncogene: a novel mechanism in aggressive carcinoma. *Cancer Res*. 2003 Jan; 63(2):304-7
71. Shah AA, Lamarre ED, Bishop JA. Human Papillomavirus-Related Multiphenotypic Sinonasal Carcinoma: A Case Report Documenting the Potential for Very Late Tumor Recurrence. *Head Neck Pathol*. 2018 Dec; 12(4):623-628.
72. Jo VY, Chau NG, Hornick JL, Krane JF, Sholl LM. Recurrent IDH2 R172X mutations in sinonasal undifferentiated carcinoma. *Mod Pathol*. 2017 May; 30(5):650-659.
73. Dogan S, Chute DJ, Xu B, Ptashkin RN, Chandramohan R, Casanova-Murphy J, et al. Frequent IDH2 R172 mutations in undifferentiated and poorly-differentiated sinonasal carcinomas. *J Pathol*. 2017 Aug; 242(4):400-408
74. Hermsen MA, Riobello C, García-Marín R, Cabal VN, Suárez-Fernández L, López F, et al. Translational genomics of sinonasal cancers. *Semin Cancer Biol*. 2020 Apr; 61:101-109
75. Sanghvi S, Khan MN, Patel NR, Yeldandi S, Baredes S, Eloy JA. Epidemiology of sinonasal squamous cell carcinoma: a comprehensive analysis of 4994 patients. *Laryngoscope*. 2014 Jan; 124(1):76-83
76. Dubal PM, Bhojwani A, Patel TD, Zuckerman O, Baredes S, Liu JK, et al. Squamous cell carcinoma of the maxillary sinus: A population-based analysis. *Laryngoscope*. 2016 Feb; 126(2):399-404

77. Barnes L. Intestinal-type adenocarcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Am J Surg Pathol.* 1986 Mar; 10(3):192-202
78. Thompson LDR, Bishop JA. Update from the 5th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumors: Nasal Cavity, Paranasal Sinuses and Skull Base. *Head Neck Pathol.* 2022 Mar; 16(1):1-18
79. Leivo I. Intestinal-Type Adenocarcinoma: Classification, Immunophenotype, Molecular Features and Differential Diagnosis. *Head Neck Pathol.* 2017 Sep; 11(3):295-300
80. Stelow EB, Jo VY, Mills SE, Carlson DL. A histologic and immunohistochemical study describing the diversity of tumors classified as sinonasal high-grade nonintestinal adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2011 Jul; 35(7):971-80
81. Wang JY, Bai YP, Xing L, Piao YS, He XJ, Yue CL, et al. [Clinicopathological characteristics of SMARCB1(INI1)-deficient sinonasal carcinoma]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 2021 Nov; 50(11):1240-1245
82. Riobello C, López-Hernández A, Cabal VN, García-Marín R, Suárez-Fernández L, Sánchez-Fernández P, et al. IDH2 Mutation Analysis in Undifferentiated and Poorly Differentiated Sinonasal Carcinomas for Diagnosis and Clinical Management. *Am J Surg Pathol.* 2020 Mar; 44(3):396-405
83. Vakani PN, Maheshwari J, Maheshwari M, Shah B. Sinonasal NUT midline carcinoma: A new histological entity. *Indian J Pathol Microbiol.* 2020 Jan-Mar; 63(1):103-105
84. Agaimy A, Weichert W. SMARCA4-deficient Sinonasal Carcinoma. *Head Neck Pathol.* 2017 Dec; 11(4):541-545
85. Pointer KB, Ko HC, Brower JV, Witek ME, Kimple RJ, Lloyd RV, et al. Small cell carcinoma of the head and neck: An analysis of the National Cancer Database. *Oral Oncol.* 2017 Jun; 69:92-98
86. El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, et al. World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours, 4th ed. Lyon, France: IARC Press; 2017:18–21.
87. Kao HL, Chang WC, Li WY, Chia-Heng Li A, Fen-Yau Li A. Head and neck large cell neuroendocrine carcinoma should be separated from atypical carcinoid on the basis of different clinical features, overall survival, and pathogenesis. *Am J Surg Pathol.* 2012 Feb; 36(2):185-92
88. Vuong HG, Ngo TNM, Dunn IF. Consolidating the Hyams grading system in esthesioneuroblastoma - an individual participant data meta-analysis. *J Neurooncol.* 2021 May; 153(1):15-22
89. Wenig BM. Undifferentiated malignant neoplasms of the sinonasal tract. *Arch Pathol Lab Med.* 2009 May; 133(5):699-712
90. Thompson LD. Olfactory neuroblastoma. *Head Neck Pathol.* 2009 Sep; 3(3):252-9
91. Iannetti G, Valentini V, Rinna C, Ventucci E, Marianetti TM. Ethmoido-orbital tumors: our experience. *J Craniofac Surg.* 2005 Nov; 16(6):1085-91
92. Maggiore G, Lazio MS, Gallo O. Treatment of pediatric esthesioneuroblastoma with smell preservation. *Auris Nasus Larynx.* 2018 Oct; 45(5):1107-1112
93. Weymuller EA. Malignancies of the paranasal sinuses. In: Flint P, Haughey B, Robbins K, et al. *Cummings Otolaryngology - Head and Neck Surgery.* 6th ed. St. Louis: Saunders; 2014 Nov; 1121-1132.

94. Unsal AA, Dubal PM, Patel TD, Vazquez A, Baredes S, Liu JK, et al. Squamous cell carcinoma of the nasal cavity: A population-based analysis. *Laryngoscope*. 2016 Mar; 126(3):560-5
95. Eggesbø HB. Imaging of sinonasal tumours. *Cancer Imaging*. 2012 May; 12:136-52
96. Sen S, Chandra A, Mukhopadhyay S, Ghosh P. Sinonasal Tumors: Computed Tomography and MR Imaging Features. *Neuroimaging Clin N Am*. 2015 Nov; 25(4):595-618
97. Lund VJ, Howard DJ, Wei WI, Cheesman AD. Craniofacial resection for tumors of the nasal cavity and paranasal sinuses--a 17-year experience. *Head Neck*. 1998 Mar; 20(2):97-105
98. Lamarre ED, Batra PS, Lorenz RR, et al. Role of positron emission tomography in management of sinonasal neoplasms - A single institution's experience. *Am J Otolaryngol - Head Neck Med Surg*. 2012 May-Jun; 33(3):289-295.
99. Head and Neck Cancer Study Group (HNCSG), Monden N, Asakage T, Kiyota N, Homma A, Matsuura K, et al. A review of head and neck cancer staging system in the TNM classification of malignant tumors (eighth edition). *Jpn J Clin Oncol*. 2019 Jul; 49(7):589-595
100. Arnold MA, Farnoosh S, Gore MR. Comparing Kadish and Modified Dulguerov Staging Systems for Olfactory Neuroblastoma: An Individual Participant Data Meta-analysis. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2020 Sep; 163(3):418-427
101. López F, Grau JJ, Medina JA, Alobid I. Consenso español para el tratamiento de los tumores nasosinusales. *Acta Otorrinolaringol*. 2017 Aug; 68(4):226-234
102. Castelnuovo P, Lepera D, Turri-Zanoni M, Battaglia P, Bolzoni Villaret A, et al. Quality of life following endoscopic endonasal resection of anterior skull base cancers. *J Neurosurg*. 2013 Dec; 119(6):1401-9
103. Nicolai P, Castelnuovo P, Bolzoni Villaret A. Endoscopic resection of sinonasal malignancies. *Curr Oncol Rep*. 2011 Apr; 13(2):138-44
104. Lund VJ, Stammberger H, Nicolai P, Castelnuovo P, Beal T, Beham A, et al. European Rhinologic Society Advisory Board on Endoscopic Techniques in the Management of Nose, Paranasal Sinus and Skull Base Tumours. European position paper on endoscopic management of tumours of the nose, paranasal sinuses and skull base. *Rhinol Suppl*. 2010 Jun; 22:1-143
105. Orlandi E, Giandini T, Iannaccone E, De Ponti E, Carrara M, Mongioj V, et al. Radiotherapy for unresectable sinonasal cancers: dosimetric comparison of intensity modulated radiation therapy with coplanar and non-coplanar volumetric modulated arc therapy. *Radiother Oncol*. 2014 Nov; 113(2):260-6
106. Nicolai P, Castelnuovo P, Lombardi D, Battaglia P, Bignami M, Pianta L, et al. Role of endoscopic surgery in the management of selected malignant epithelial neoplasms of the naso-ethmoidal complex. *Head Neck*. 2007 Dec; 29(12):1075-82
107. Sisson GAS, Toriumi DM, Atiyah RA. Paranasal sinus malignancy: a comprehensive update. *Laryngoscope*. 1989 Feb; 99(2):143-50
108. Bristol IJ, Ahamad A, Garden AS, Morrison WH, Hanna EY, Papadimitrakopoulou VA, et al. Postoperative radiotherapy for maxillary sinus

- cancer: long-term outcomes and toxicities of treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007 Jul; 68(3):719-30
109. Hoppe BS, Stegman LD, Zelefsky MJ, Rosenzweig KE, Wolden SL, Patel SG, et al. Treatment of nasal cavity and paranasal sinus cancer with modern radiotherapy techniques in the postoperative setting--the MSKCC experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007 Mar; 67(3):691-702
  110. Chopra S, Kamdar DP, Cohen DS, Heilbrun LK, Smith D, Kim H, et al. Outcomes of nonsurgical management of locally advanced carcinomas of the sinonasal cavity. *Laryngoscope.* 2017 Apr; 127(4):855-861
  111. Papadimitrakopoulou VA, Ginsberg LE, Garden AS, Kies MS, Glisson BS, Diaz EM Jr, et al. Intraarterial cisplatin with intravenous paclitaxel and ifosfamide as an organ-preservation approach in patients with paranasal sinus carcinoma. *Cancer.* 2003 Nov; 98(10):2214-23
  112. Mourad WF, Hauerstock D, Shourbaji RA, Hu KS, Culliney B, Li Z, et al. Trimodality management of sinonasal undifferentiated carcinoma and review of the literature. *Am J Clin Oncol.* 2013 Dec; 36(6):584-8
  113. Rosenthal DI, Barker JL Jr, El-Naggar AK, Glisson BS, Kies MS, Diaz EM Jr, et al. Sinonasal malignancies with neuroendocrine differentiation: patterns of failure according to histologic phenotype. *Cancer.* 2004 Dec; 101(11):2567-73.
  114. McElroy EA, Buckner JC, Lewis JE. Chemotherapy for advanced esthesioneuroblastoma: the Mayo Clinic experience. *Neurosurgery.* 1998 May; 42(5):1023-7; discussion 1027-1028.
  115. Fiani B, Quadri SA, Cathel A, Farooqui M, Ramachandran A, Siddiqi I, et al. Esthesioneuroblastoma: A Comprehensive Review of Diagnosis, Management, and Current Treatment Options. *World Neurosurg.* 2019 Jun; 126:194-211
  116. Resto VA, Eisele DW, Forastiere A, Zahurak M, Lee DJ, Westra WH. Esthesioneuroblastoma: the Johns Hopkins experience. *Head Neck.* 2000 Sep; 22(6):550-8
  117. Loy AH, Reibel JF, Read PW, Thomas CY, Newman SA, Jane JA, et al. Esthesioneuroblastoma: continued follow-up of a single institution's experience. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006 Feb; 132(2):134-8
  118. Esposito A, Stucchi E, Baronchelli M, Di Mauro P, Ferrari M, Lorini L, et al. Molecular Basis and Rationale for the Use of Targeted Agents and Immunotherapy in Sinonasal Cancers. *J Clin Med.* 2022 Nov; 11(22):6787
  119. Denaro N, Merlano M, Numico G, Garrone O, Bossi P. Complete response to immunotherapy in sinonasal undifferentiated carcinoma. *Tumori.* 2021 Dec; 107(6):NP101-NP104
  120. Klebaner D, Saddawi-Konefka R, Finegersh A, Yan CH, Califano JA 3rd, London NR, et al. Immunotherapy in sinonasal melanoma: treatment patterns and outcomes compared to cutaneous melanoma. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2020 Sep; 10(9):1087-1095
  121. Morand GB, Anderegg N, Vital D, Ikenberg K, Huber GF, Soyka MB, et al. Outcome by treatment modality in sinonasal undifferentiated carcinoma (SNUC): A case-series, systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol.* 2017 Dec; 75:28-34

122. Bauer DE, Mitchell CM, Strait KM, Lathan CS, Stelow EB, Lüer SC, et al. Clinicopathologic features and long-term outcomes of NUT midline carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2012 Oct; 18(20):5773-9
123. Stathis A, Zucca E, Bekradda M, Gomez-Roca C, Delord JP, de La Motte et al. Clinical Response of Carcinomas Harboring the BRD4-NUT Oncoprotein to the Targeted Bromodomain Inhibitor OTX015/MK-8628. *Cancer Discov.* 2016 May; 6(5):492-500
124. Agaimy A, Hartmann A, Antonescu CR, Chiosea SI, El-Mofty SK, Geddert H, et al. SMARCB1 (INI-1)-deficient Sinonasal Carcinoma: A Series of 39 Cases Expanding the Morphologic and Clinicopathologic Spectrum of a Recently Described Entity. *Am J Surg Pathol.* 2017 Apr; 41(4):458-471
125. Patel TD, Vazquez A, Dubal PM, Baredes S, Liu JK, Eloy JA. Sinonasal neuroendocrine carcinoma: a population-based analysis of incidence and survival. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2015 May; 5(5):448-53
126. Camp S, Van Gerven L, Poorten VV, Nuyts S, Hermans R, Hauben E, et al. Long-term follow-up of 123 patients with adenocarcinoma of the sinonasal tract treated with endoscopic resection and postoperative radiation therapy. *Head Neck.* 2016 Feb; 38(2):294-300. doi: 10.1002/hed.23900. Epub 2015 May 26.
127. Bignami M, Lepera D, Volpi L, Lambertoni A, Arosio A, Pistochini A, et al. Sinonasal Non-Intestinal-Type Adenocarcinoma: A Retrospective Review of 22 Patients. *World Neurosurg.* 2018 Dec; 120:e962-e969
128. Dulguerov P, Allal AS, Calcaterra TC. Esthesioneuroblastoma: a meta-analysis and review. *Lancet Oncol.* 2001 Nov; 2(11):683-90
129. Eden BV, Debo RF, Larner JM, Kelly MD, Levine PA, Stewart FM, et al. Esthesioneuroblastoma. Long-term outcome and patterns of failure; the University of Virginia experience. *Cancer.* 1994 May; 73(10):2556-62
130. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70
131. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar; 144(5):646-74
132. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022 Jan; 12(1):31-46
133. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 2002 Nov; 3(11):991-8
134. Aerts JG, Hegmans JP. Tumor-specific cytotoxic T cells are crucial for efficacy of immunomodulatory antibodies in patients with lung cancer. *Cancer Res.* 2013 Apr; 73(8):2381-8
135. Zamarron BF, Chen W. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. *Int J Biol Sci.* 2011;7(5):651-8
136. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science.* 2011 Mar; 331(6024):1565-70
137. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity.* 2013 Jul; 39(1):1-10
138. Davies M. New modalities of cancer treatment for NSCLC: focus on immunotherapy. *Cancer Manag Res.* 2014 Feb; 6:63-75

139. Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol.* 2015 Dec; 35 Suppl:S185-S198
140. Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:51-72
141. Gabrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol.* 2004 Dec; 4(12):941-52
142. Munn DH, Sharma MD, Lee JR, Jhaveri KG, Johnson TS, Keskin DB, et al. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science.* 2002 Sep; 297(5588):1867-70
143. Cheng F, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immune tolerance in breast cancer. *Breast Dis.* 2004 Nov; 20:93-103
144. Makkouk A, Weiner GJ. Cancer immunotherapy and breaking immune tolerance: new approaches to an old challenge. *Cancer Res.* 2015 Jan; 75(1):5-10
145. Driessens G, Kline J, Gajewski TF. Costimulatory and coinhibitory receptors in anti-tumor immunity. *Immunol Rev.* 2009 May; 229(1):126-44
146. Maeda H, Shiraishi A. TGF-beta contributes to the shift toward Th2-type responses through direct and IL-10-mediated pathways in tumor-bearing mice. *J Immunol.* 1996 Jan; 156(1):73-8
147. French LE, Tschopp J. Defective death receptor signaling as a cause of tumor immune escape. *Semin Cancer Biol.* 2002 Feb; 12(1):51-5
148. Motz GT, Coukos G. Deciphering and reversing tumor immune suppression. *Immunity.* 2013 Jul; 39(1):61-73
149. Wang D, Quiros J, Mahuron K, Pai CC, Ranzani V, Young A, et al. Targeting EZH2 Reprograms Intratumoral Regulatory T Cells to Enhance Cancer Immunity. *Cell Rep.* 2018 Jun; 23(11):3262-3274
150. Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2006 Apr; 6(4):295-307
151. Yokokawa J, Cereda V, Remondo C, Gulley JL, Arlen PM, Schlom J, et al. Enhanced functionality of CD4+CD25(high)FoxP3+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2008 Feb ;14(4):1032-40
152. Vijayan D, Young A, Teng MWL, Smyth MJ. Targeting immunosuppressive adenosine in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2017 Dec; 17(12):709-724
153. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, et al. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res.* 2001 Jun; 61(12):4766-72
154. Santoiemma PP, Powell DJ Jr. Tumor infiltrating lymphocytes in ovarian cancer. *Cancer Biol Ther.* 2015 Jun; 16(6):807-20
155. Huang Y, Liao H, Zhang Y, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ T cells in gastrointestinal cancers: A meta analysis. *PLoS One.* 2014; 9(5).
156. Shojaei F, Zhong C, Wu X, Yu L, Ferrara N. Role of myeloid cells in tumor angiogenesis and growth. *Trends Cell Biol.* 2008 Aug; 18(8):372-8
157. Ostrand-Rosenberg S, Sinha P, Chornoguz O, Ecker C. Regulating the suppressors: apoptosis and inflammation govern the survival of tumor-induced

- myeloid-derived suppressor cells (MDSC). *Cancer Immunol Immunother.* 2012 Aug; 61(8):1319-25
158. Hoechst B, Ormandy LA, Ballmaier M, Lehner F, Krüger C, Manns MP, et al. A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells. *Gastroenterology.* 2008 Jul; 135(1):234-43
  159. Cheng P, Corzo CA, Luetsteke N, Yu B, Nagaraj S, Bui MM, et al. Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *J Exp Med.* 2008 Sep; 205(10):2235-49
  160. Umansky V, Sevko A. Overcoming immunosuppression in the melanoma microenvironment induced by chronic inflammation. *Cancer Immunol Immunother.* 2012 Feb; 61(2):275-282
  161. Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity.* 2014 Jul;v41(1):49-61
  162. Mantovani A, Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol.* 2010 Apr; 22(2):231-7
  163. Hao Y, Baker D, Ten Dijke P. TGF- $\beta$ -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *Int J Mol Sci.* 2019 Jun; 20(11):2767
  164. Metcalf D. The colony-stimulating factors and cancer. *Cancer Immunol Res.* 2013 Dec; 1(6):351-6
  165. Briukhovetska D, Dörr J, Endres S, Libby P, Dinarello CA, Kobold S. Interleukins in cancer: from biology to therapy. *Nat Rev Cancer.* 2021 Aug; 21(8):481-499
  166. Zhang W, Borcherding N, Kolb R. IL-1 Signaling in Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol.* 2020 Feb; 1240:1-23
  167. Kumari N, Dwarakanath BS, Das A, Bhatt AN. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumour Biol.* 2016 Sep; 37(9):11553-11572
  168. Ferris RL. Immunology and Immunotherapy of Head and Neck Cancer. *J Clin Oncol.* 2015 Oct; 33(29):3293-304
  169. Fridman WH, Remark R, Goc J, Giraldo NA, Becht E, Hammond SA, et al. The immune microenvironment: a major player in human cancers. *Int Arch Allergy Immunol.* 2014 May;164(1):13-26.
  170. Whiteside TL. Tumor-induced death of immune cells: its mechanisms and consequences. *Semin Cancer Biol.* 2002 Feb; 12(1):43-50
  171. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol.* 2015 Feb; 26(2):259-71
  172. Jochems C, Schlom J. Tumor-infiltrating immune cells and prognosis: the potential link between conventional cancer therapy and immunity. *Exp Biol Med (Maywood).* 2011 May; 236(5):567-79
  173. Fu Q, Chen N, Ge C, Li R, Li Z, Zeng B, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Oncoimmunology.* 2019 Apr; 8(7):1593806
  174. Hwang WT, Adams SF, Tahirovic E, Hagemann IS, Coukos G. Prognostic

- significance of tumor-infiltrating T cells in ovarian cancer: a meta-analysis. *Gynecol Oncol*. 2012 Feb; 124(2):192-8.
175. Vassilakopoulou M, Avgeris M, Velcheti V, Kotoula V, Rampias T, Chatzopoulos K, et al. Evaluation of PD-L1 Expression and Associated Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2016 Feb; 22(3):704-13
  176. Quan H, Yan L, Wang S, Wang S. Clinical relevance and significance of programmed death-ligand 1 expression, tumor-infiltrating lymphocytes, and p16 status in sinonasal squamous cell carcinoma. *Cancer Manag Res*. 2019 May; 11:4335-4345
  177. Classe M, Burgess A, El Zein S, Wassef M, Herman P, Mortuaire G, et al. Evaluating the prognostic potential of the Ki67 proliferation index and tumour-infiltrating lymphocytes in olfactory neuroblastoma. *Histopathology*. 2019 Dec; 75(6):853-864
  178. Muenst S, Läubli H, Soysal SD, Zippelius A, Tzankov A, Hoeller S. The immune system and cancer evasion strategies: therapeutic concepts. *J Intern Med*. 2016 Jun; 279(6):541-62
  179. Teng MW, Ngiow SF, Ribas A, Smyth MJ. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Res*. 2015 Jun; 75(11):2139-45
  180. Whiteside TL. Head and Neck Carcinoma Immunotherapy: Facts and Hopes. *Clin Cancer Res*. 2018 Jan; 24(1):6-13
  181. Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, Kowalski D, Harigopal M, Brandsma J, et al. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus--associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *J Clin Oncol*. 2006 Feb; 24(5):736-47
  182. Lesterhuis WJ, Punt CJ, Hato SV, Eleveld-Trancikova D, Jansen BJ, Nierkens S, et al. Platinum-based drugs disrupt STAT6-mediated suppression of immune responses against cancer in humans and mice. *J Clin Invest*. 2011 Aug; 121(8):3100-8
  183. Moretta L, Montaldo E, Vacca P, Del Zotto G, Moretta F, Merli P, et al. Human natural killer cells: origin, receptors, function, and clinical applications. *Int Arch Allergy Immunol*. 2014 Aug; 164(4):253-64
  184. Hoos A, Britten C. The immuno-oncology framework: Enabling a new era of cancer therapy. *Oncoimmunology*. 2012 May; 1(3):334-339
  185. Zhang Y, Zhang Z. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. *Cell Mol Immunol*. 2020 Aug; 17(8):807-821
  186. Andtbacka RH, Kaufman HL, Collichio F, Amatruda T, Senzer N, Chesney J, et al. Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *J Clin Oncol*. 2015 Sep; 33(25):2780-8
  187. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, et al. IMPACT Study Investigators. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med*. 2010 Jul; 363(5):411-22



188. Jaffee EM, Hruban RH, Biedrzycki B, Laheru D, Schepers K, Sauter PR, et al. Novel allogeneic granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-secreting tumor vaccine for pancreatic cancer: a phase I trial of safety and immune activation. *J Clin Oncol*. 2001 Jan; 19(1):145-56
189. Salgia R, Lynch T, Skarin A, Lucca J, Lynch C, Jung K, et al. Vaccination with irradiated autologous tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments antitumor immunity in some patients with metastatic non-small-cell lung carcinoma. *J Clin Oncol*. 2003 Feb; 21(4):624-30
190. Lee S, Margolin K. Cytokines in cancer immunotherapy. *Cancers (Basel)*. 2011 Oct; 3(4):3856-93
191. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Leitman S, Chang AE, Ettinghausen SE, et al. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med*. 1985 Dec; 313(23):1485-92
192. Zitvogel L, Galluzzi L, Kepp O, Smyth MJ, Kroemer G. Type I interferons in anticancer immunity. *Nat Rev Immunol*. 2015 Jul; 15(7):405-14
193. Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science*. 2015 Apr 3; 348(6230):62-8
194. Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Dec; 86(24):10024-8
195. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science*. 2006 Oct; 314(5796):126-9
196. Ferris RL, Blumenschein G Jr, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, et al. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med*. 2016 Nov; 375(19):1856-1867
197. Seiwert TY, Burtneß B, Mehra R, Weiss J, Berger R, Eder JP, et al. Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial. *Lancet Oncol*. 2016 Jul; 17(7):956-965
198. Neel BG, Gu H, Pao L. The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem Sci*. 2003 Jun; 28(6):284-93
199. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008 Jan; 26:677-704
200. Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, Wunderlich JR, Dudley ME, White DE, et al. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood*. 2009 Aug; 114(8):1537-44
201. Sanmamed MF, Chen L. Inducible expression of B7-H1 (PD-L1) and its selective role in tumor site immune modulation. *Cancer J*. 2014 Jul-Aug; 20(4):256-61

202. Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol.* 2007 Mar; 8(3):239-45
203. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med.* 2002 Aug; 8(8):793-800
204. Yang CY, Lin MW, Chang YL, Wu CT, Yang PC. Programmed cell death-ligand 1 expression in surgically resected stage I pulmonary adenocarcinoma and its correlation with driver mutations and clinical outcomes. *Eur J Cancer.* 2014 May; 50(7):1361-9
205. Wang A, Wang HY, Liu Y, Zhao MC, Zhang HJ, Lu ZY, et al. The prognostic value of PD-L1 expression for non-small cell lung cancer patients: a meta-analysis. *Eur J Surg Oncol.* 2015 Apr; 41(4):450-6
206. Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med.* 2012 Mar; 4(127):127ra37
207. Yi M, Zheng X, Niu M, Zhu S, Ge H, Wu K. Combination strategies with PD-1/PD-L1 blockade: current advances and future directions. *Mol Cancer.* 2022 Jan ;21(1):28
208. Festino L, Botti G, Lorigan P, Masucci GV, Hipp JD, Horak CE, et al. Cancer Treatment with Anti-PD-1/PD-L1 Agents: Is PD-L1 Expression a Biomarker for Patient Selection? *Drugs.* 2016 Jun; 76(9):925-45
209. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med.* 2012 Jun; 366(26):2443-54
210. Chen J, Gu P, Wu H. Uncovering PD-L1 and CD8+ TILS Expression and Clinical Implication in Cervical Squamous Cell Carcinoma. *Biomed Res Int.* 2020 Aug; 2020:8164365
211. Giunchi F, Gevaert T, Scarpelli M, Fiorentino M. Status of Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) by Immunohistochemistry and Scoring Algorithms. *Curr Drug Targets.* 2020; 21(13):1286-1292
212. Heidarian A, Wenig BM, Hernandez-Prera JC. Evaluation of programmed death ligand 1 immunohistochemistry in cytology specimens of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Cytopathol.* 2022 Feb; 130(2):91-95
213. Sholl LM, Aisner DL, Allen TC, Beasley MB, Borczuk AC, Cagle PT, et al. Programmed Death Ligand-1 Immunohistochemistry--A New Challenge for Pathologists: A Perspective From Members of the Pulmonary Pathology Society. *Arch Pathol Lab Med.* 2016 Apr; 140(4):341-4
214. Kerr KM, Hirsch FR. Programmed Death Ligand-1 Immunohistochemistry: Friend or Foe? *Arch Pathol Lab Med.* 2016 Apr; 140(4):326-31
215. Bauml J, Seiwert TY, Pfister DG, Worden F, Liu SV, Gilbert J, et al. Pembrolizumab for Platinum- and Cetuximab-Refractory Head and Neck Cancer: Results From a Single-Arm, Phase II Study. *J Clin Oncol.* 2017 May; 35(14):1542-1549

216. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R, et al. Overall Survival with Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III NSCLC. *N Engl J Med*. 2018 Dec; 379(24):2342-2350
217. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*. 2014 Nov; 515(7528):563-7
218. Chow LQM, Haddad R, Gupta S, Mahipal A, Mehra R, Tahara M, et al. Antitumor Activity of Pembrolizumab in Biomarker-Unselected Patients With Recurrent and/or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Results From the Phase Ib KEYNOTE-012 Expansion Cohort. *J Clin Oncol*. 2016 Nov; 34(32):3838-3845
219. Hongo T, Yamamoto H, Jiromaru R, Yasumatsu R, Kuga R, Nozaki Y, et al. PD-L1 expression, tumor- infiltrating lymphocytes, mismatch repair deficiency, EGFR alteration and HPV infection in sinonasal squamous cell carcinoma. *Mod Pathol*. 2021 Nov; 34(11):1966-1978
220. London NR Jr, Rooper LM, Bishop JA, Xu H, Bernhardt LJ, Ishii M, et al. Expression of Programmed Cell Death Ligand 1 and Associated Lymphocyte Infiltration in Olfactory Neuroblastoma. *World Neurosurg*. 2020 Mar; 135:e187-e193
221. Olave MC, Graham RP. Mismatch repair deficiency: The what, how and why it is important. *Genes Chromosomes Cancer*. 2022 Jun; 61(6):314-321
222. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. 1996 Oct; 87(2):159-70. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81333-1. PMID: 8861899.
223. Baretta M, Le DT. DNA mismatch repair in cancer. *Pharmacol Ther*. 2018 Sep; 189:45-62
224. Vilar E, Gruber SB. Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010 Mar; 7(3):153-62
225. Evrard C, Alexandre J. Predictive and Prognostic Value of Microsatellite Instability in Gynecologic Cancer (Endometrial and Ovarian). *Cancers (Basel)*. 2021 May;13(10):2434
226. Puliga E, Corso S, Pietrantonio F, Giordano S. Microsatellite instability in Gastric Cancer: Between lights and shadows. *Cancer Treat Rev*. 2021 Apr; 95:102175
227. Abida W, Cheng ML, Armenia J, Middha S, Autio KA, Vargas HA, et al. Analysis of the Prevalence of Microsatellite Instability in Prostate Cancer and Response to Immune Checkpoint Blockade. *JAMA Oncol*. 2019 Apr; 5(4):471-478
228. Eso Y, Shimizu T, Takeda H, Takai A, Marusawa H. Microsatellite instability and immune checkpoint inhibitors: toward precision medicine against gastrointestinal and hepatobiliary cancers. *J Gastroenterol*. 2020 Jan; 55(1):15-26
229. Zhao P, Li L, Jiang X, Li Q. Mismatch repair deficiency/microsatellite instability-high as a predictor for anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy efficacy. *J Hematol Oncol*. 2019 May; 12(1):54
230. Ghidini M, Lampis A, Mirchev MB, Okuducu AF, Ratti M, Valeri N, et al. Immune-Based Therapies and the Role of Microsatellite Instability in Pancreatic Cancer. *Genes (Basel)*. 2020 Dec; 12(1):33

231. Woerner SM, Yuan YP, Benner A, Korff S, von Knebel Doeberitz M, Bork P. SelTarbase, a database of human mononucleotide-microsatellite mutations and their potential impact to tumorigenesis and immunology. *Nucleic Acids Res.* 2010 Jan; 38(Database issue):D682-9
232. Hewish M, Lord CJ, Martin SA, Cunningham D, Ashworth A. Mismatch repair deficient colorectal cancer in the era of personalized treatment. *Nat Rev Clin Oncol.* 2010 Apr; 7(4):197-208
233. Barrow E, Hill J, Evans DG. Cancer risk in Lynch Syndrome. *Fam Cancer.* 2013 Jun; 12(2):229-40
234. Luchini C, Bibeau F, Ligtenberg MJL, Singh N, Nottegar A, Bosse T, et al. ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach. *Ann Oncol.* 2019 Aug; 30(8):1232-1243
235. Alpert L, Pai RK, Srivastava A, McKinnon W, Wilcox R, Yantiss RK, et al. Colorectal Carcinomas With Isolated Loss of PMS2 Staining by Immunohistochemistry. *Arch Pathol Lab Med.* 2018 Apr; 142(4):523-528
236. Pearlman R, Markow M, Knight D, Chen W, Arnold CA, Pritchard CC, et al. Two-stain immunohistochemical screening for Lynch syndrome in colorectal cancer may fail to detect mismatch repair deficiency. *Mod Pathol.* 2018 Dec; 31(12):1891-1900
237. Graham RP, Kerr SE, Butz ML, Thibodeau SN, Halling KC, Smyrk TC, et al. Heterogenous MSH6 loss is a result of microsatellite instability within MSH6 and occurs in sporadic and hereditary colorectal and endometrial carcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2015 Oct; 39(10):1370-6
238. Cristescu R, Lee J, Nebozhyn M, Kim KM, Ting JC, Wong SS, et al. Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes. *Nat Med.* 2015 May; 21(5):449-56
239. Kawakami H, Zaanan A, Sinicrope FA. Implications of mismatch repair-deficient status on management of early stage colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol.* 2015 Dec; 6(6):676-84
240. Salipante SJ, Scroggins SM, Hampel HL, Turner EH, Pritchard CC. Microsatellite instability detection by next generation sequencing. *Clin Chem.* 2014 Sep; 60(9):1192-9
241. Fanale D, Corsini LR, Scalia R, Brando C, Cucinella A, Madonia G, et al. Can the tumor-agnostic evaluation of MSI/MMR status be the common denominator for the immunotherapy treatment of patients with several solid tumors? *Crit Rev Oncol Hematol.* 2022 Feb; 170:103597
242. Diaz LA, Marabelle A, Kim T, et al. Efficacy of pembrolizumab in phase 2 KEYNOTE-164 and KEYNOTE-158 studies of microsatellite instability high cancers. *Ann Oncol.* 2017 Sept; (suppl 5):abstr 386P.
243. Le DT, Diaz LA Jr, Kim TW, Van Cutsem E, Geva R, Jäger D, et al. Pembrolizumab for previously treated, microsatellite instability-high/mismatch repair-deficient advanced colorectal cancer: final analysis of KEYNOTE-164. *Eur J Cancer.* 2023 Jun; 186:185-195
244. Overman MJ, McDermott R, Leach JL, Lonardi S, Lenz HJ, Morse MA, et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or

- microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2017;18(9):1182–91.
245. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med.* 2015 Jun 25;372(26):2509-20
246. Gatalica Z, Snyder C, Maney T, Ghazalpour A, Holterman DA, Xiao N, et al. Programmed cell death 1 (PD-1) and its ligand (PD-L1) in common cancers and their correlation with molecular cancer type. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014 Dec; 23(12):2965-70
247. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science.* 2015 Apr; 348(6230):124-8
248. Hieggelke L, Heydt C, Castiglione R, Rehker J, Merkelbach-Bruse S, Riobello C, et al. Mismatch Repair Deficiency and Somatic Mutations in Human Sinonasal Tumors. *Cancers (Basel).* 2021 Dec 2;13(23):6081
249. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med.* 1998 Jul; 4(7):844-7.
250. Chambers KJ, Lehmann AE, Remenschneider A, Dedmon M, Meier J, Gray ST, et al. Incidence and survival patterns of sinonasal undifferentiated carcinoma in the United States. *J Neurol Surg B Skull Base.* 2015 Mar; 76(2):94-100.
251. Abdelmeguid AS, Bell D, Hanna EY. Sinonasal Undifferentiated Carcinoma. *Curr Oncol Rep.* 2019 Feb; 21(3):26
252. Su SY, Bell D, Hanna EY. Esthesioneuroblastoma, neuroendocrine carcinoma, and sinonasal undifferentiated carcinoma: differentiation in diagnosis and treatment. *Int Arch Otorhinolaryngol.* 2014 Oct; 18(Suppl 2):S149-56
253. Ferrari M, Mattavelli D, Tomasoni M, Raffetti E, Bossi P, Schreiber A, et al. The MUSES\*: a prognostic study on 1360 patients with sinonasal cancer undergoing endoscopic surgery-based treatment: \*MULTI-institutional collaborative Study on Endoscopically treated Sinonasal cancers. *Eur J Cancer.* 2022 Aug; 171:161-182.
254. Ferrari M, Orlandi E, Bossi P. Sinonasal cancers treatments: state of the art. *Curr Opin Oncol.* 2021 May; 33(3):196-205
255. Pérez-Escuredo J, Martínez JG, Vivanco B, Marcos CÁ, Suárez C, Llorente JL, et al. Wood dust-related mutational profile of TP53 in intestinal-type sinonasal adenocarcinoma. *Hum Pathol.* 2012 Nov; 43(11):1894-901
256. Määttä J, Luukkonen R, Husgafvel-Pursiainen K, Alenius H, Savolainen K. Comparison of hardwood and softwood dust-induced expression of cytokines and chemokines in mouse macrophage RAW 264.7 cells. *Toxicology.* 2006 Jan; 218(1):13-21
257. Holmila R, Cyr D, Luce D, Heikkilä P, Dictor M, Steiniche T, et al. COX-2 and p53 in human sinonasal cancer: COX-2 expression is associated with adenocarcinoma histology and wood-dust exposure. *Int J Cancer.* 2008 May; 122(9):2154-9

258. Bornholdt J, Hansen J, Steiniche T, Dictor M, Antonsen A, Wolff H, et al. K-ras mutations in sinonasal cancers in relation to wood dust exposure. *BMC Cancer*. 2008 Feb; 8:53
259. Takahashi Y, Amit M, Gleber-Netto F.O, Silverman D, Bell D, Xie T, et al. Evaluation of the Immune Microenvironment in Sinonasal Squamous Cell Carcinoma and Its Association with Patients' Survival. *J. Neurol. Surg. Part B Skull Base*. 2021;82:S022.
260. Gu JT, Claudio N, Betts C, Sivagnanam S, Geltzeiler M, Pucci F. Characterization of the tumor immune microenvironment of sinonasal squamous-cell carcinoma. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2022 Jan; 12(1):39-50.
261. Ock CY, Keam B, Kim S, Lee JS, Kim M, Kim TM, et al. Pan-Cancer Immunogenomic Perspective on the Tumor Microenvironment Based on PD-L1 and CD8 T-Cell Infiltration. *Clin Cancer Res*. 2016 May; 22(9):2261-70
262. Wakabayashi O, Yamazaki K, Oizumi S, Hommura F, Kinoshita I, Ogura S, et al. CD4+ T cells in cancer stroma, not CD8+ T cells in cancer cell nests, are associated with favorable prognosis in human non-small cell lung cancers. *Cancer Sci*. 2003 Nov; 94(11):1003-9.
263. Kinoshita T, Muramatsu R, Fujita T, Nagumo H, Sakurai T, Noji S, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes differs depending on histological type and smoking habit in completely resected non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2016 Nov; 27(11):2117-2123.
264. Straub M, Drecoll E, Pfarr N, Weichert W, Langer R, Hapfelmeier A, et al. CD274/PD-L1 gene amplification and PD-L1 protein expression are common events in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oncotarget*. 2016 Mar; 7(11):12024-34.
265. Lin YM, Sung WW, Hsieh MJ, Tsai SC, Lai HW, Yang SM, et al. High PD-L1 Expression Correlates with Metastasis and Poor Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma. *PLoS One*. 2015 Nov; 10(11):e0142656.
266. Karpathiou G, Casteillo F, Giroult JB, Forest F, Fournel P, Monaya A, 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 Mar; 8(12):19310-19322.
267. Hsu MC, Hsiao JR, Chang KC, Wu YH, Su IJ, Jin YT, et al. Increase of programmed death-1-expressing intratumoral CD8 T cells predicts a poor prognosis for nasopharyngeal carcinoma. *Mod Pathol*. 2010 Oct; 23(10):1393-403.
268. Wu S, Shi X, Sun J, Liu Y, Luo Y, Liang Z, et al. The significance of programmed cell death ligand 1 expression in resected lung adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2017 Mar; 8(10):16421-16429.
269. Brody R, Zhang Y, Ballas M, Siddiqui MK, Gupta P, Barker C, et al. PD-L1 expression in advanced NSCLC: Insights into risk stratification and treatment selection from a systematic literature review. *Lung Cancer*. 2017 Oct; 112:200-215.
270. Wang Q, Liu F, Liu L. Prognostic significance of PD-L1 in solid tumor: An updated meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2017 May;96(18):e6369.
271. Tsao MS, Le Teuff G, Shepherd FA, Landais C, Hainaut P, Filipits M, et al. PD-L1 protein expression assessed by immunohistochemistry is neither prognostic nor predictive of benefit from adjuvant chemotherapy in resected non-small cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2017 Apr; 28(4):882-889.

272. Wang Y, Tong Z, Zhang W, Zhang W, Buzdin A, Mu X, et al. FDA-Approved and Emerging Next Generation Predictive Biomarkers for Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Patients. *Front Oncol.* 2021 Jun; 11:683419
273. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2015 Oct 22;373(17):1627-39.
274. Fehrenbacher L, Spira A, Ballinger M, Kowanetz M, Vansteenkiste J, Mazieres J, et al. POPLAR Study Group. Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *Lancet.* 2016 Apr; 387(10030):1837-46.
275. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crinò L, Eberhardt WE, Poddubskaya E, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2015 Jul; 373(2):123-35.
276. Antonia S, Goldberg SB, Balmanoukian A, Chaft JE, Sanborn RE, Gupta A, et al. Safety and antitumour activity of durvalumab plus tremelimumab in non-small cell lung cancer: a multicentre, phase 1b study. *Lancet Oncol.* 2016 Mar; 17(3):299-308.
277. Cohen EEW, Soulières D, Tournau CL, Dinis J, Licitra L, Ahn MJ, et al. Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma (KEYNOTE-040): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet.* 2019; 393:156–67.
278. Park JC, Faquin WC, Durbeck J, Faden DL. Immune checkpoint inhibitors in sinonasal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2020 Oct; 109:104776.
279. Ueda Y, Okano S, Enokida T, Fujisawa T, Ito K, Sato M, et al. Nivolumab for recurrent or metastatic head and neck cancer patients with non-squamous cell carcinoma and/or a primary subsite excluded from CheckMate141, a retrospective study. *Oral Oncol.* 2022 Jul; 130:105932.
280. Colevas AD, Bahleda R, Braitheh F, Balmanoukian A, Brana I, Chau NG, et al. Safety and clinical activity of atezolizumab in head and neck cancer: results from a phase I trial. *Ann Oncol.* 2018 Nov; 29(11):2247-2253.
281. Lu S, Stein JE, Rimm DL, Wang DW, Bell JM, Johnson DB, et al. Comparison of Biomarker Modalities for Predicting Response to PD-1/PD-L1 Checkpoint Blockade: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol.* 2019 Aug; 5(8):1195-1204
282. Blons H, Cabelguenne A, Carnot F, Laccourreye O, de Waziers I, Hamelin R, et al. Microsatellite analysis and response to chemotherapy in head-and-neck squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer.* 1999; 84:410-5.
283. Lee V, Murphy A, Le DT, Diaz LA Jr. Mismatch Repair Deficiency and Response to Immune Checkpoint Blockade. *Oncologist.* 2016 Oct; 21(10):1200-1211.
284. Nonomura Y, Nakayama K, Nakamura K, Razia S, Yamashita H, Ishibashi T, et al. Ovarian Endometrioid and Clear Cell Carcinomas with Low Prevalence of Microsatellite Instability: A Unique Subset of Ovarian Carcinomas Could Benefit from Combination Therapy with Immune Checkpoint Inhibitors and Other Anticancer Agents. *Healthcare (Basel).* 2022 Apr; 10(4):694.
285. Liu X, Choi MG, Kim K, Kim KM, Kim ST, Park SH, et al. High PD-L1 expression in gastric cancer (GC) patients and correlation with molecular features. *Pathol Res Pract.* 2020 Apr; 216(4):152881.

286. Dislich B, Mertz KD, Gloor B, Langer R. Interspatial Distribution of Tumor and Immune Cells in Correlation with PD-L1 in Molecular Subtypes of Gastric Cancers. *Cancers (Basel)*. 2022 Mar; 14(7):1736.
287. Kim CG, Ahn JB, Jung M, Beom SH, Kim C, Kim JH, et al. Effects of microsatellite instability on recurrence patterns and outcomes in colorectal cancers. *Br J Cancer*. 2016 Jun; 115(1):25-33.
288. Marrelli D, Polom K, Pascale V, Vindigni C, Piagnerelli R, De Franco L, et al. Strong Prognostic Value of Microsatellite Instability in Intestinal Type Non-cardia Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2016 Mar; 23(3):943-50.
289. Mohan HM, Ryan E, Balasubramanian I, Kennelly R, Geraghty R, Sclafani F, et al. Microsatellite instability is associated with reduced disease specific survival in stage III colon cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2016 Nov; 42(11):1680-1686.
290. Marcus L, Lemery SJ, Keegan P, Pazdur R. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Microsatellite Instability-High Solid Tumors. *Clin Cancer Res*. 2019 Jul; 25(13):3753-3758.
291. Hellmann MD, Rizvi NA, Goldman JW, Gettinger SN, Borghaei H, Brahmer JR, et al. Nivolumab plus ipilimumab as first-line treatment for advanced non-small-cell lung cancer (CheckMate 012): results of an open-label, phase 1, multicohort study. *Lancet Oncol*. 2017 Jan; 18(1):31-41.
292. Kulangara K, Zhang N, Corigliano E, Guerrero L, Waldroup S, Jaiswal D, et al Clinical Utility of the Combined Positive Score for Programmed Death Ligand-1 Expression and the Approval of Pembrolizumab for Treatment of Gastric Cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2019 Mar; 143(3):330-337.
293. Paderno A, Petrelli F, Lorini L, Capriotti V, Gurizzan C, Bossi P. The predictive role of PD-L1 in head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol*. 2024 Jun; 153:106799.
294. Rizzo A, Ricci AD, Brandi G. PD-L1, TMB, MSI, and Other Predictors of Response to Immune Checkpoint Inhibitors in Biliary Tract Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021 Feb; 13(3):558
295. Peng W, Chen JQ, Liu C, Malu S, Creasy C, Tetzlaff MT, et al. Loss of PTEN Promotes Resistance to T Cell-Mediated Immunotherapy. *Cancer Discov*. 2016 Feb; 6(2):202-16.
296. Chen H, Chong W, Teng C, Yao Y, Wang X, Li X. The immune response-related mutational signatures and driver genes in non-small-cell lung cancer. *Cancer Sci*. 2019 Aug; 110(8):2348-2356.
297. Wang F, Zhao Q, Wang YN, Jin Y, He MM, Liu ZX, et al. Evaluation of POLE and POLD1 Mutations as Biomarkers for Immunotherapy Outcomes Across Multiple Cancer Types. *JAMA Oncol*. 2019 Oct; 5(10):1504-1506.
298. Shackelford DB, Shaw RJ. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nat Rev Cancer*. 2009 Aug;9(8):563-75.
299. Skoulidis F, Heymach JV. Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer*. 2019 Sep;19(9):495-509.
300. Hellmann MD, Nathanson T, Rizvi H, Creelan BC, Sanchez-Vega F, Ahuja A, et al. Genomic Features of Response to Combination Immunotherapy in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Cancer Cell*. 2018 May; 33(5):843-852.e4.



301. Koyama S, Akbay EA, Li YY, Aref AR, Skoulidis F, Herter-Sprie GS, et al. STK11/LKB1 Deficiency Promotes Neutrophil Recruitment and Proinflammatory Cytokine Production to Suppress T-cell Activity in the Lung Tumor Microenvironment. *Cancer Res.* 2016 Mar; 76(5):999-1008.
302. Ayers M, Lunceford J, Nebozhyn M, Murphy E, Loboda A, Kaufman DR, et al. IFN- $\gamma$ -related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. *J Clin Invest.* 2017 Aug;127(8):2930-2940.
303. Jiang P, Gu S, Pan D, Fu J, Sahu A, Hu X, et al. Signatures of T cell dysfunction and exclusion predict cancer immunotherapy response. *Nat Med.* 2018 Oct; 24(10):1550-1558.
304. Pérez-Guijarro E, Yang HH, Araya RE, El Meskini R, Michael HT, Vodnala SK, et al. Multimodel preclinical platform predicts clinical response of melanoma to immunotherapy. *Nat Med.* 2020 May; 26(5):781-791.
305. Cabrita R, Lauss M, Sanna A, Donia M, Skaarup Larsen M, Mitra S, et al. Tertiary lymphoid structures improve immunotherapy and survival in melanoma. *Nature.* 2020 Jan; 577(7791):561-565.
306. Helmink BA, Reddy SM, Gao J, Zhang S, Basar R, Thakur R, et al. B cells and tertiary lymphoid structures promote immunotherapy response. *Nature.* 2020 Jan; 577(7791):549-555.
307. Shibata H, Saito S, Uppaluri R. Immunotherapy for Head and Neck Cancer: A Paradigm Shift From Induction Chemotherapy to Neoadjuvant Immunotherapy. *Front Oncol.* 2021 Sep; 11:727433.
308. Smussi D, Mattavelli D, Paderno A, Gurizzan C, Lorini L, Romani C, et al. Revisiting the concept of neoadjuvant and induction therapy in head and neck cancer with the advent of immunotherapy. *Cancer Treat Rev.* 2023 Dec; 121:102644.
309. Zandberg DP, Clump DA, Isett BR, Bao R, Wang H, Vujanovic L, et al. 856MO: A randomized phase II study of concurrent vs. sequential pembrolizumab with chemoradiation (CRT) in locally advanced head and neck cancer (LA HNSCC): 4-year results and tumor-immune microenvironment analysis, *Ann Oncol.* 2023 Feb; 34(2):S557-S558
310. Machiels JP, Tao Y, Licitra L, Burtneess B, Tahara M, Rischin D, et al. KEYNOTE-412 Investigators. Pembrolizumab plus concurrent chemoradiotherapy versus placebo plus concurrent chemoradiotherapy in patients with locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-412): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2024 May; 25(5):572-587

9

---

# **ANEXOS**

## Anexo 1. Clasificación TNM (44)

<b>SENO MAXILAR</b>	
Categoría T	Tumor Primario
<b>Tx</b>	No se puede asegurar
<b>To</b>	No hay evidencia
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ
<b>T1</b>	Tumor limitado a la mucosa antral sin erosión ni destrucción de hueso
<b>T2</b>	Tumor con erosión o destrucción de la infraestructura incluyendo el paladar óseo y/o el meato medio. No invasión de la pared posterior, tejido subcutáneo, suelo y pared medial de la órbita, fosa pterigopalatina ni etmoides
<b>T3</b>	Tumor que invade una de las siguientes áreas: pared posterior del seno maxilar, suelo o pared medial de la órbita, etmoides anterior, planos blandos subcutáneos, fosa pterigopalatina
<b>T4a</b>	Tumor que invade el contenido orbital anterior, piel de la mejilla, apófisis pterigoides, fosa infratemporal, lámina cribosa, seno esfenoidal o seno frontal
<b>T4b</b>	Tumor que invade el ápex orbitario, duramadre, cerebro, fosa craneal media, pares craneales excepto la 2ª rama del trigémino (V2), nasofaringe o clivus

<b>FOSAS NASALES Y SEÑO ETMOIDAL</b>	
Categoría T	Tumor Primario
<b>Tx</b>	No se puede asegurar
<b>To</b>	No hay evidencia
<b>Tis</b>	Carcinoma <i>in situ</i>
<b>T1</b>	Tumor que afecta a una sola sublocalización con o sin invasión ósea
<b>T2</b>	Tumor que afecta a dos sublocalizaciones en una sola región o que invade una región adyacente etmoidal, con o sin invasión ósea
<b>T3</b>	Tumor que invade el suelo o la pared medial de la órbita, seno maxilar, lámina cribosa o paladar
<b>T4a</b>	Tumor que invade cualquiera de las siguientes regiones: contenido orbitario anterior, piel de la nariz o mejilla, extensión leve a la fosa craneal anterior, apófisis pterigoides, seno frontal o seno esfenoidal
<b>T4b</b>	Tumor que invade cualquiera de las siguientes regiones: ápex orbitario, cerebro, dura, fosa craneal media, nervios craneales, nasofaringe o clivus

Categoría N	Ganglios Linfáticos Regionales
<b>Nx</b>	No se puede asegurar su existencia
<b>N0</b>	Ausencia de ganglios metastásicos
<b>N1</b>	Metástasis en un único ganglio linfático ipsilateral $\leq$ 3 cm
<b>N2a</b>	Metástasis en único ganglio linfático ipsilateral de $>$ 3 cm pero $<$ 6 cm
<b>N2b</b>	Múltiples ganglio linfáticos ipsilaterales, ninguno $>$ de 6 cm
<b>N2c</b>	Ganglios linfáticos bilaterales o contralaterales ninguno $>$ de 6 cm
<b>N3</b>	Ganglio linfático de $>$ 6 cm

<b>Categoría M</b>	<b>Metástasis a distancia</b>
<b>Mx</b>	No se puede asegurar su existencia
<b>M0</b>	Ausencia de metástasis
<b>M1</b>	Presencia de metástasis

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








**Anexo 2. Estadificación de los ONB (45)**

<b>CLASIFICACIÓN DE KADISH</b>	
<b>A</b>	Tumor limitado a la fosa nasal
<b>B</b>	Tumor limitado a fosas nasales y senos paranasales
<b>C</b>	Tumor se extiende fuera de fosas nasales y senos paranasales
<b>D</b>	Metástasis regionales o a distancia

<b>CLASIFICACIÓN DE DULGUEROV</b>	
<b>T1</b>	Tumor involucra las fosas nasales y/o los senos paranasales (excluyendo el esfenoides), respetando las celdas etmoidales superiores
<b>T2</b>	Tumor que involucra las fosas nasales y/o los senos paranasales (incluido el esfenoides) con afectación de la lámina cribosa
<b>T3</b>	Tumor que se extiende hacia la órbita o protruye hacia la fosa craneal anterior, sin invasión dural
<b>T4</b>	Tumor involucra el cerebro

Article

# Biomarkers for Immunotherapy in Poorly Differentiated Sinonasal Tumors

Eva Villanueva-Fernández <sup>1</sup>, Mario A. Hermsen <sup>2,\*</sup>, Laura Suárez-Fernández <sup>2</sup>, Blanca Vivanco <sup>3</sup>, Alessandro Franchi <sup>4</sup>, Rocío García-Marín <sup>2</sup>, Virginia N. Cabal <sup>2</sup>, Helena Codina-Martínez <sup>2</sup>, Sara Lucila Lorenzo-Guerra <sup>2</sup>, José L. Llorente <sup>1</sup> and Fernando López <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department Otolaryngology, Hospital Universitario Central de Asturias, 33011 Oviedo, Spain

<sup>2</sup> Department Head and Neck Oncology, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias, 33011 Oviedo, Spain

<sup>3</sup> Department Pathology, Hospital Universitario Central de Asturias, 33011 Oviedo, Spain

<sup>4</sup> Department Translational Research and of New Technologies in Medicine and Surgery, University of Pisa, 56126 Pisa, Italy

\* Correspondence: mhermsen@hca.es; Tel.: +34-985107937; Fax: +34-985108015

**Abstract:** The sinonasal cavities harbor a wide variety of rare cancer types. Histopathological classification can be challenging, especially for poorly differentiated tumors. Despite advances in surgery and radio-chemotherapy, the 5-year survival rate is still very low. Thus, there is an unmet clinical need for new therapeutic options. We retrospectively evaluated poorly differentiated tumors of 9 different histological subtypes from 69 patients who had received conventional treatments for the presence of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes (TILs), as well as the expression of PD-L1 and microsatellite instability (MSI) markers MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2, as biomarkers for immunotherapy. CD8+ TILs were present in 23/69 (33%) cases, PD-L1 expression was observed in 23/69 (33%), and markers for MSI positivity in 5/69 (7%) cases. CD8+ TILs correlated with PD-L1 positivity, while both were mutually exclusive with MSI markers. None of the biomarkers were associated with clinical features as age, gender or tumor stage. Cases with CD8+ TILs and PD-L1 positivity showed a tendency toward worse disease-specific survival. Immune checkpoint inhibitors are emerging as new options for treatment of many tumor types. Our results indicate that also a substantial subset of patients with poorly differentiated sinonasal tumors may be a candidate to be treated with this promising new therapy.

**Keywords:** sinonasal cancer; poorly differentiated tumors; CD8+ TILs; PD-L1; MSI; immunotherapy



**Citation:** Villanueva-Fernández, E.; Hermsen, M.A.; Suárez-Fernández, L.; Vivanco, B.; Franchi, A.; García-Marín, R.; Cabal, V.N.; Codina-Martínez, H.; Lorenzo-Guerra, S.L.; Llorente, J.L.; et al. Biomarkers for Immunotherapy in Poorly Differentiated Sinonasal Tumors. *Biomedicines* **2022**, *10*, 2205. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10092205>

Academic Editor: Satoshi Wada

Received: 26 July 2022

Accepted: 2 September 2022

Published: 6 September 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Approximately 5% of all head and neck cancers arise in the sinonasal cavities [1]. They represent a wide histological diversity, each with their distinctive etiology, epidemiology, clinical and genetic characteristics [1,2]. About 70% are sinonasal squamous cell carcinoma (SNSCC) and intestinal-type adenocarcinoma (ITAC), and the remaining 30% are made up by a miscellany of poorly differentiated entities consisting of many epithelial cancer types, including the highly heterogeneous categories of undifferentiated carcinoma (SNUC), neuroendocrine carcinoma (SNEC) and high-grade non-ITAC (HG-non-ITAC) [3–6], but also non-epithelial tumors such as mucosal melanoma, several types of sarcoma, olfactory neuroblastoma and even hematological neoplasms. Together, they are termed poorly differentiated sinonasal tumors, sometimes also small round blue cell sinonasal tumors [3–10].

A growing number of these tumors can now be diagnosed by molecular genetic analysis, such as NUT carcinoma by chromosomal translocation t(15;19) NUT-BRD4, HPV-related multiphenotypic sinonasal carcinoma by high-risk HPV in the absence of the t(6;9) MYB-NFIB rearrangement, and subsets of SNSCC by EGFR exon 20 mutation and by DEK::AFF2 fusions [5–8]. New tumor entities previously classified as SNUC include

SMARCB1-deficient carcinoma, SMARCA4-deficient carcinoma and possibly also IDH2 mutant SNUC [6,11,12].

A common factor of sinonasal tumors is their very low incidence, making it difficult for the clinician not only to reach a correct diagnosis, but also to develop and test treatment options. Despite advances in endoscopic surgery, precision radiotherapy, heavy ion radiotherapy, and induction chemotherapy, the 5-year survival rate remains less than 50%. For SNEC, SNUC, and NUT carcinoma prognosis is counted in months [13–15]. Local recurrence often occurs within two years of follow-up and is the main cause of mortality. Standard treatment is surgery combined with radiation, in SNUC additional chemotherapy may be beneficial [16–18].

To improve these outcomes, new treatment options for neoadjuvant, concomitant or adjuvant therapy are necessary, and immunotherapy may be such an option. Immune checkpoint inhibitors have improved outcomes for different types of solid tumors, including head and neck squamous cell carcinoma, non-small cell lung cancer and oesophageal squamous cell carcinoma [19–21]. Over recent years, several biomarkers as predictors of immunotherapeutic efficacy have been studied, the most important being CD8-positive tumor-infiltrating lymphocytes (CD8+ TILs), PD-L1 expression on tumor cells, tumor mutational burden (TMB) and microsatellite instability (MSI).

Previous studies on sinonasal tumors have indicated PD-L1 expression in 26% of ITAC and 30–46% PD-L1 expression in SNSCC [22–26]. A high presence of CD8+ TILs was reported in 8% of ITAC [21], 19–57% of SNSCC [24–26], while in olfactory neuroblastoma (ONB), they were much less frequent and predominantly found in the stromal compartment [27,28]. The majority of these studies on ITAC, SNSCC and ONB showed CD8+ TILs to be associated with better prognosis, while PD-L1 expression on tumor cells or macrophages generally did not carry prognostic value [22,24,26,28].

MSI is due to defects in the genes involved in the MMR (mismatch repair) system, such as MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2. Although it was initially described in patients with sporadic colon cancer and hereditary non-polyposis colorectal cancer, it has now been demonstrated in many types of tumors. In two recent studies using MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 staining as surrogate markers of MSI, 3.2% (4/125 cases) and 2.3% (3/131 cases) were found to be MSI positive, indicated by loss of or reduced PMS2 and MLH1 [26,29]. In addition, analyzing 10 SNSCC cell lines by multiplex PCR of a reference panel with five nearly monomorphic mononucleotide markers BAT25, BAT26, D5S346, D2S123, D17S250, one cell line, SCCNC5, was found to be MMR-deficient. The same cell line was also determined to be TMB-high by whole exome sequencing [29]. Finally, García-Martínez et al. reported MSI in 21% (5/24 cases) SNSCC and 2% (1/41 cases) ITAC [30].

To our knowledge, apart from SNSCC, ITAC and ONB, no other sinonasal tumor types have been studied with regard to biomarkers for immunotherapy. The aim of this study was to evaluate the presence of CD8+ TILs, PD-L1 expression and the expression of MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 as surrogate markers of MSI, in a series of poorly differentiated sinonasal carcinomas who had received conventional treatments, as possible indicators for treatment with immunotherapy. In addition, results were correlated with clinico-pathological and follow-up data.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1. Patients and Samples*

Samples from poorly differentiated sinonasal carcinomas of 69 patients who had received conventional treatments were collected from the Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), Oviedo, Spain; from the VU Medical Center (VUmc), Amsterdam, the Netherlands, and from University Medical Center Utrecht (UMC), Utrecht, the Netherlands. All experimental protocols were approved by the Institutional Ethics Committee of the Hospital Universitario Central de Asturias and by the Regional CEIC from Principado de Asturias (approval numbers 07/16 for project CICPF16008-HERM, 83/17 for project PI17/00763 and 2020.048 for project PI19/00191). All methods were carried out

in accordance with the guidelines of the Institutional Ethics Committee of the Hospital Universitario Central de Asturias. Informed consent was obtained from all patients.

Our cohort included 14 olfactory neuroblastoma (ONB), 6 neuroendocrine carcinoma (SNEC), 25 (SNUC), 6 poorly differentiated squamous cell carcinoma (PD-SNSCC), 5 HG-non-ITAC, 10 solid-type ITAC, 1 SMARCB1-deficient carcinoma, 1 SMARCA4-deficient carcinoma and 1 NUT carcinoma. Representative photomicrographs of hematoxylin and eosin staining of the tumor types are given in Figures 1 and S1. Of the 65 (54%) patients, 35 were male and 30 (46%) female; the mean age was 56 years, ranging from 20 to 83 among 63 patients. The distribution of disease stage according to the TNM system for tumor classification [25] was known for 64 patients: 8 (12%) were stage I, 24 (38%) stage II, 8 (12%) stage III, 20 (31%) stage IVa and 4 (6%) were stage IVb. The clinical characteristics according to specific tumor type are presented in Table 1.

The initial diagnoses of all cases were revised by an experienced pathologist (AF). All the available slides were reviewed in each case, and tumors were diagnosed using the diagnostic criteria described in the fourth edition of the World Health Organization Classification [1]. Additional immunohistochemical stainings CK5/6, CK20, CDX2, p40, p16, synaptophysin, chromogranin, NUT, SMARCB1, and SMARCA4 were applied when necessary. As none of the tumors stained positive for p16, no further testing for human HPV was performed. In addition, IDH2 mutation was observed in 1/6 (17%) SNEC, 9/25 (36%) SNUC, 1/6 (17%) PDSNSCC and 2/5 HG-non-ITAC. These analyses were previously published by [31].

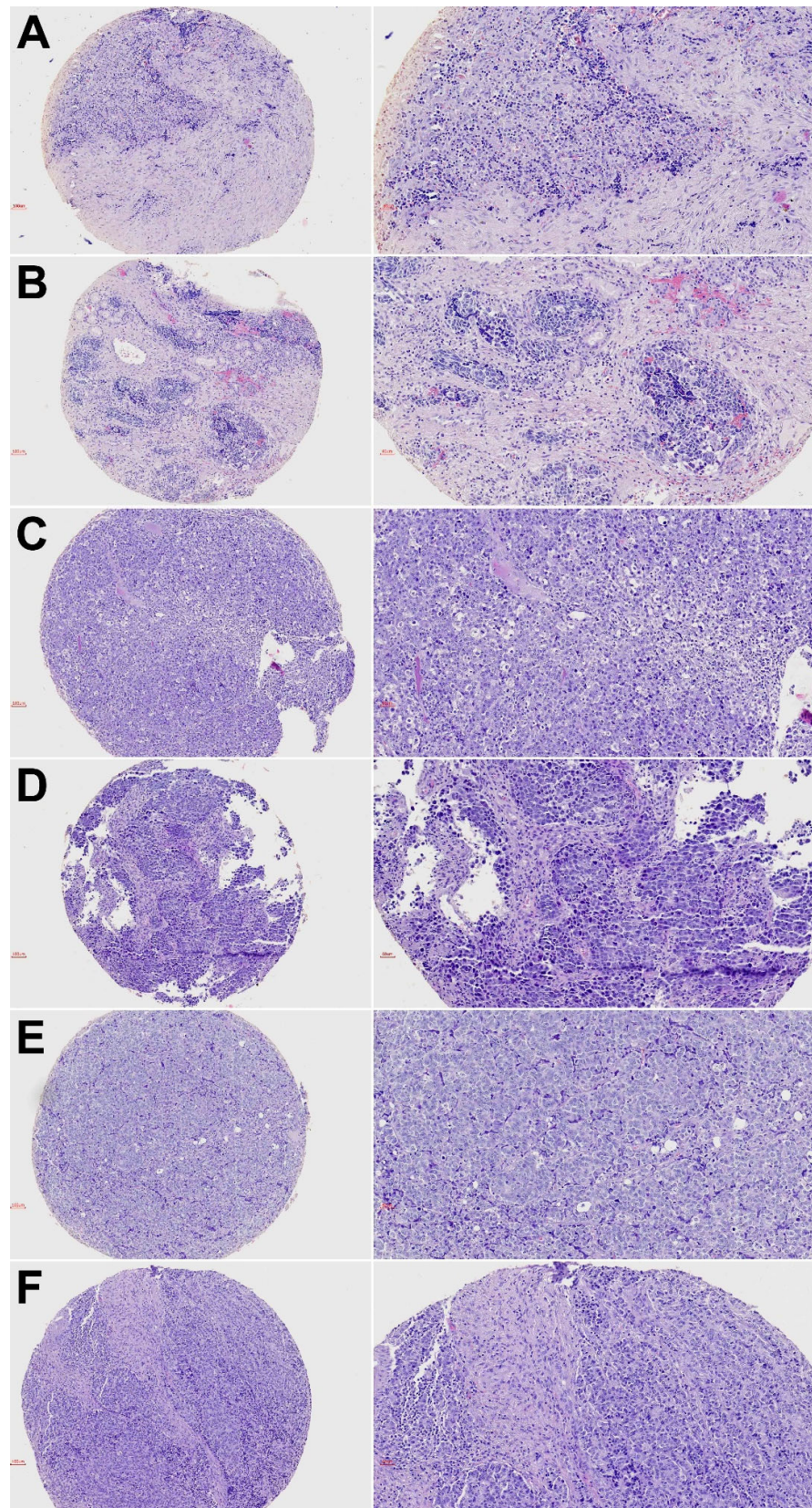
## 2.2. Immunohistochemical Analysis

Tumor samples which were obtained from biopsy or surgery were fixed with formalin and embedded in paraffin. When several paraffin blocks were available for the same tumor, the most representative block was selected. Tissue microarray blocks were prepared using the Beecher Tissue Microarrayer (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA). In total, 4 blocks were constructed, containing three 1 mm cores from different areas of 69 tumors [32].

Immunohistochemistry was performed on an automatic staining workstation (Dako Autostainer Plus; DakoCytomation, Glostrup, Denmark) with antigen retrieval by EnVision FLEX + Mouse (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) over 20 minutes. The following antibodies were applied: anti-CD8 clone C8/144B, IR623 (Prediluted monoclonal mouse, DAKO, Glostrup, Denmark), anti-PD-L1 clone E1L3N (1/100 monoclonal rabbit, Cell Signalling Technology, Cambridge, UK), and MSI markers anti-MLH1 clone M1, anti-PMS2 clone A16-4, anti-MSH2 clone G219-1129 and anti-MSH6 clone SP93 (Ventana Roche, Tucson, AZ, USA). The slides were evaluated in a double-blind manner by three observers (EVF, BV and MAH), and discrepancies between the observers were resolved by a consensus review after simultaneous reevaluation.

CD8+ TIL scoring was adapted from Fuchs et al. [33], who defined low, intermediate and high CD8+ TILs as 1–10%, 10–50% and >50%, adding another group with 0%. However, in two of our previous studies [22,25] we found that survival was similar in the two groups 10–50%/>50% and 0%/1–10%; therefore, we simplified the present scoring to low (<10%) or high (>10%) of the cells present in the stromal or in the intratumoral compartment. Staining for PD-L1 was considered positive when >5% of the tumor cells showed membranous and/or cytoplasmic staining, in accordance with most studies in the field, including clinical immunotherapy trials [34,35]. Regarding MSI, tumors that showed significantly reduced nuclear staining compared to intratumoral immune cells or tumors that displayed complete loss of an MMR protein were classified as MSI.





**Figure 1.** Hematoxylin and eosin stainings of representative cases from tumor subtypes ONB (A), SNEC (B), SNUC (C), PD-SNSCC (D), HG-non-ITAC (E) and solid-type ITAC (F). Left column  $\times 100$  and right column  $\times 200$  magnification.

**Table 1.** Clinical features of all tumors.

Clinical Characteristics	All	ONB	SNEC	SNUC	PD-SNSCC	HG-Non-ITAC	Solid-Type ITAC	SmarcB1-Def Carcinoma	SmarcA4-Def Carcinoma	NUT Carcinoma
All	69	14	6	25	6	5	10	1	1	1
Age*	56 (20–83)	47 (20–69)	60 (49–77)	56 (34–83)	67 (57–77)	37 (29–47)	67 (49–82)	59	NA	40
Sex										
Male	35/65 (54)	3/13 (23)	2/6 (33)	13/27 (52)	4/5 (80)	3/4 (75)	9/10 (90)	1 (100)	NA	0 (0)
Female	30/65 (46)	10/13 (77)	4/6 (67)	12/27 (48)	1/5 (20)	1/4 (25)	1/10 (10)	0 (0)	NA	1 (100)
Discase stage										
I	8/64 (12)	0/13 (0)	0/6 (0)	0/27 (0)	4/5 (80)	2/3 (67)	2/10 (20)	0 (0)	NA	0 (0)
II	24/64 (38)	7/13 (54)	4/6 (67)	10/27 (40)	1/5 (20)	1/3 (33)	0/10 (0)	0 (0)	NA	1 (100)
III	8/64 (12)	2/13 (15)	1/6 (17)	2/27 (8)	0/5 (0)	0/3 (0)	3/10 (30)	0 (0)	NA	0 (0)
IVa	20/64 (31)	4/13 (31)	0/6 (0)	13/27 (52)	0/5 (0)	0/3 (0)	2/10 (20)	1 (100)	NA	0 (0)
IVb	4/64 (6)	0/13 (0)	1/6 (17)	0/27 (0)	0/5 (0)	0/3 (0)	3/10 (30)	0 (0)	NA	0 (0)
Recurrence	19/32 (59)	5/7 (71)	2/2 (100)	4/12 (33)	NA	1/1 (100)	7/10 (70)	NA	NA	NA
Follow up *	31 (1–172)	56 (1–172)	17 (8–26)	29 (1–97)	12 (12–12)	39 (39–39)	19 (1–84)	NA	NA	NA
Patient status										
Alive	17/33 (52)	6/7 (86)	1/2 (50)	7/12 (58)	1/1 (100)	0/1 (0)	2/10 (20)	NA	NA	NA
DOD	13/33 (39)	1/7 (14)	1/2 (50)	3/12 (25)	0/1 (0)	1/1 (100)	7/10 (70)	NA	NA	NA
DOC	3/33 (9)	0/7 (0)	0/2 (0)	2/12 (17)	0/1 (0)	0/1 (0)	1/10 (10)	NA	NA	NA

Legend. \*: mean (range); NA: not available; DOD: died of disease; DOC: died of other causes.

### 2.3. Statistical Analysis

Pearson's chi-squared test and Fisher's exact test were used to test possible associations between CD8+ TILs and PD-L1 expression and MSI presence and various clinicopathological factors. Univariate Kaplan–Meier curves were plotted to assess the relations of CD8+ TILs, PDL-1 expression and MSI to overall, disease-specific and disease-free survival using the log-rank-test. *p*-values < 0.05 were considered to indicate statistically significant. Statistical analysis was carried out with the use of SPSS Base, version 15.0 and SPSS Advanced models, version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) software.

## 3. Results

### 3.1. Clinical Features and Follow-Up

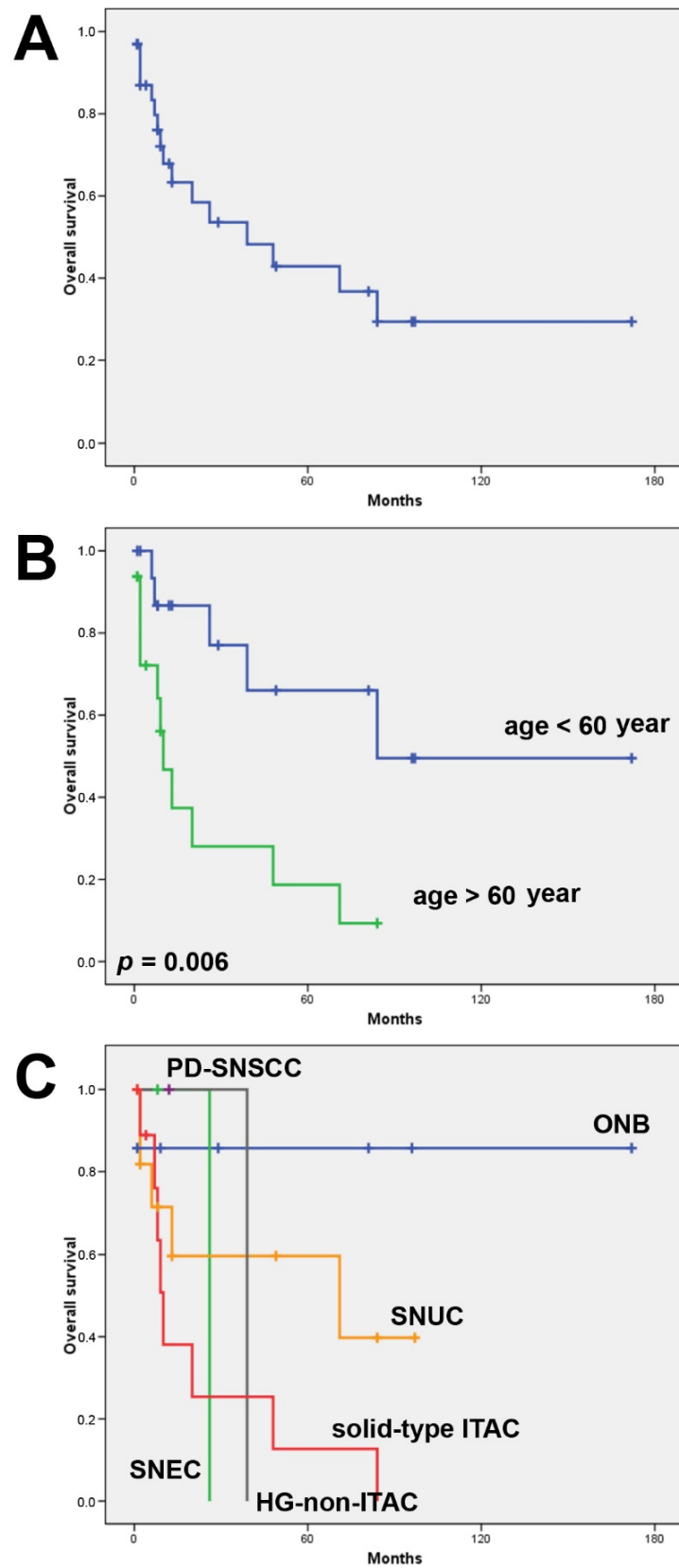
All 69 patients were treated by surgery and 15 patients also received radiotherapy. The mean follow-up available of 33 patients was 31 months (range 1–172). During this period, 22 (67%) patients developed a recurrence or metastasis. At the time of writing, 17 (52%) patients remained alive, 13 (39%) died of disease and 3 (9%) died of other causes. The 5-year overall survival was 43% and the 5-year disease-free survival was 34%. Tumor stage was not correlated with overall or disease-free survival. Patients of 60 years of age and older showed worse overall survival (Log rank 7.661, *p* = 0.006), while there was no age difference regarding disease-free survival (Figure 2). Comparing the histological subtypes, ONB and SNUC showed the most favorable clinical outcomes with a 5-year overall survival of 86% and 60%, respectively. None of the patients with SNEC, HG-non-ITAC and solid-type ITAC reached 5-year overall survival (Table 1). Unfortunately, for PD-SNSCC, SMARCB1-deficient carcinoma, SMARCA4-deficient carcinoma and NUT carcinoma, no follow-up data were available.

### 3.2. CD8+ Tumor Infiltrating Lymphocytes

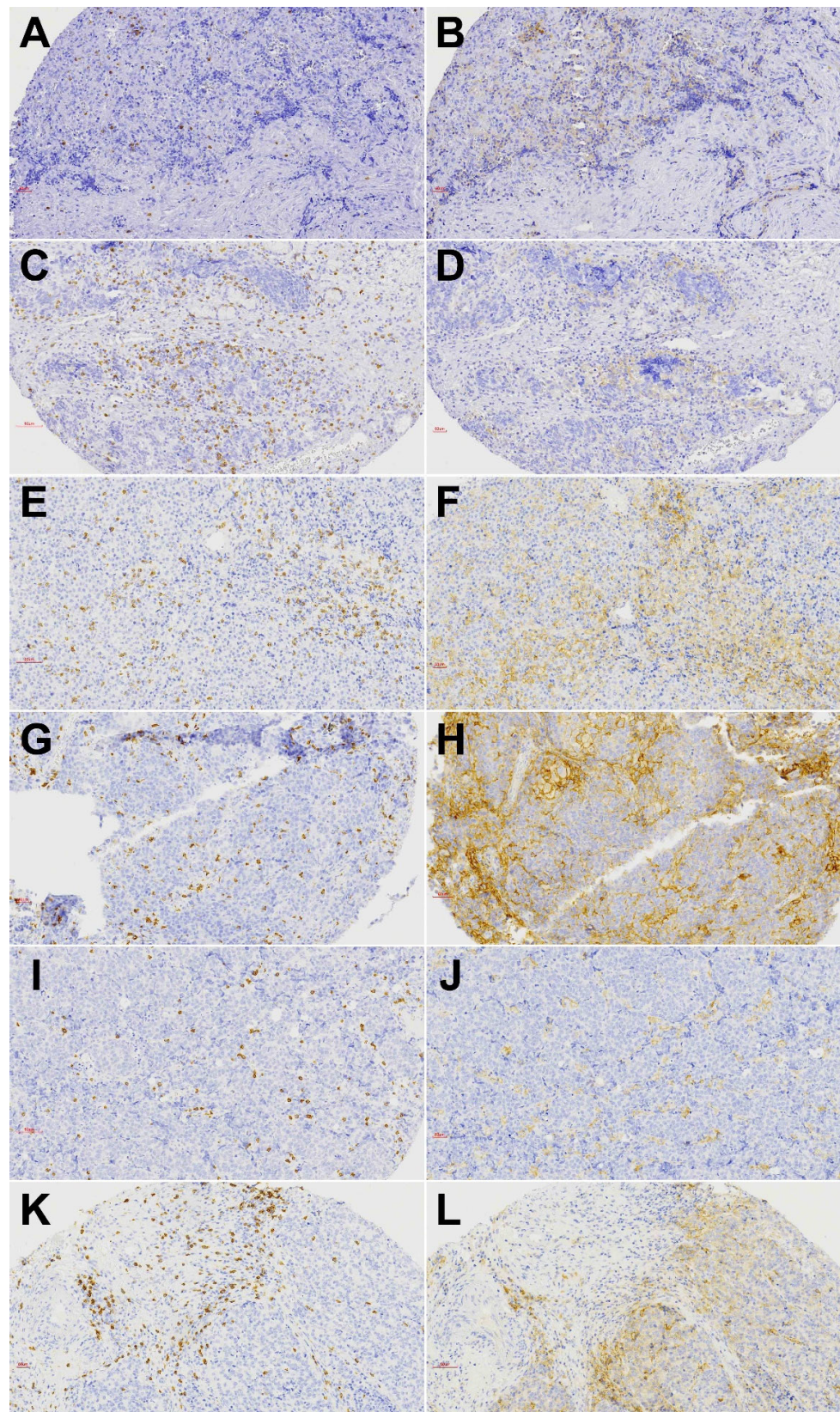
A total of 23 of 69 (33%) tumors showed a high presence of CD8+ TILs, either in the tumor or stromal compartment. In 21/23 cases, CD8+ TILs were present in both compartments. CD8+ TILs were most frequent in solid-type ITAC and HG-non-ITAC (60% of tumors), followed by SNUC (34%), PDSCC (33%), ONB (21%) and SNEC (17%). SMARCB1-deficient carcinoma, SMARCA4-deficient carcinoma and NUT carcinoma were devoid of CD8+ TILs (Table 2). Examples of CD8 stainings are given in Figure 3 and Supplementary Figure S1. A total of 30% of IDH2-mutated versus 13% IDH2-wildtype tumors harbored CD8+ TILs; however, this difference was not significant (Fisher's Chi2 *p* = 0.082). The presence of CD8+ TILs was not related to age, tumor stage or clinical outcome, although there was a tendency toward worse overall survival (Figure 4).

**Table 2.** CD8+ TILs, PD-L1 and MSI scores according to tumor subtype.

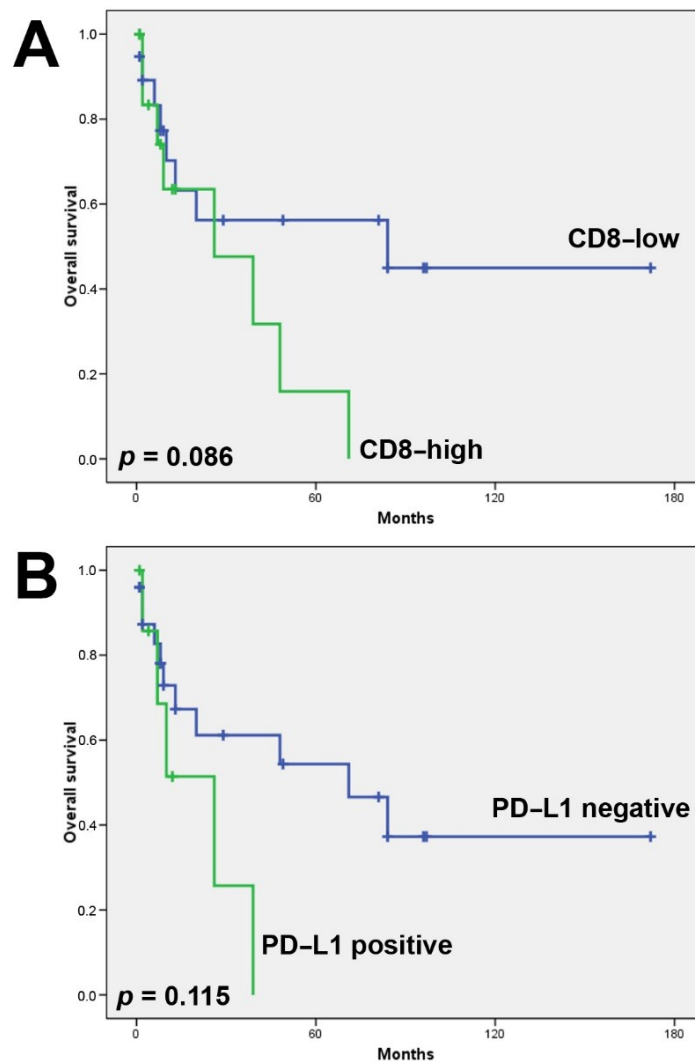
	CD8+ TILs > 10%	PD-L1 > 5%	MSI-Positive
ONB	3/14 (21%)	2/14 (14%)	0/14 (0%)
SNEC	1/6 (17%)	2/6 (33%)	2/6 (33%)
SNUC	8/25 (32%)	4/25 (16%)	2/25 (8%)
PD-SNSCC	2/6 (33%)	5/6 (83%)	0/6 (0%)
HG-non-ITAC	3/5 (60%)	4/5 (80%)	1/5 (20%)
Solid-type ITAC	6/10 (60%)	5/10 (50%)	0/10 (0%)
Smcarb1-def carcinoma	0/1 (0%)	1/1 (100%)	0/1 (0%)
Smcarb4-def carcinoma	0/1 (0%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)
NUT carcinoma	0/1 (0%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)
All	23/69 (33%)	23/69 (33%)	5/69 (7%)



**Figure 2.** Kaplan–Meier overall survival analysis. All cases (A), according to age (B) and according to tumor subtype (C).



**Figure 3.** Immunohistochemical staining of CD8+ TILs and PD-L1-expressing tumor cells of tumor sub-types ONB (A,B), SNEC (C,D), SNUC (E,F), PD-SNSCC (G,H) HG-non-ITAC (I,J) and solid-type ITAC (K,L). Left column: CD8+ TILs and right column: PD-L1 expression. All images  $\times 200$  magnification.



**Figure 4.** Kaplan–Meier overall survival analysis according to CD8+ TILs (A) and according to PD-L1 expression (B).

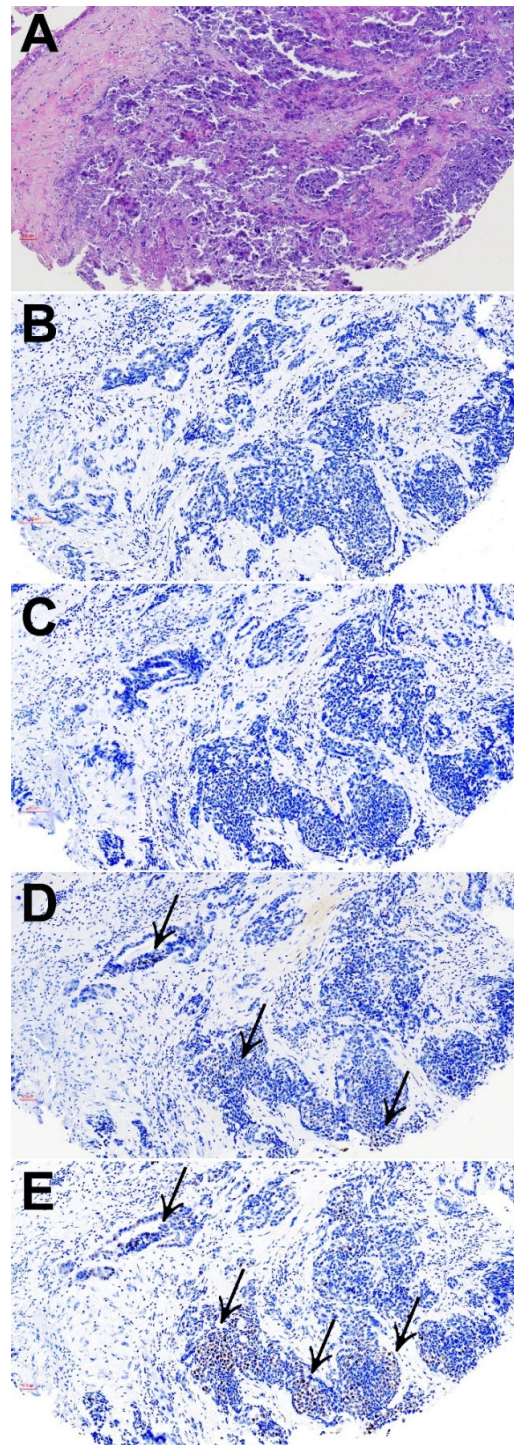
### 3.3. PD-L1 Expression

A total of 23 of 69 (33%) tumors showed membranous PD-L1 staining in >5% of tumor cells. The staining pattern was diffuse in the majority of cases, whereas HG-non-ITAC mostly demonstrated focal expression (Figure 3). PD-L1 expression was most frequently observed in PDSNSCC (83%), HG-non-ITAC (80%) and solid-type ITAC (60%). In SNEC, SNUC and ONB this was 33%, 16% and 14%, respectively (Table 2). The one case of SMARCB1-deficient carcinoma was also PD-L1 positive, while SMARCA4-deficient carcinoma and NUT carcinoma showed no expression (Supplementary Figure S1). PD-L1 positivity in IDH2-mutated was seen in 26% and in IDH2-wildtype tumors in 15% of cases. A total of 13 of 23 (56%) PD-L1 positive versus 10/46 (22%) PD-L1 negative tumors also carried CD8+ TILs (Fisher's Chi2  $p = 0.006$ ). We found no correlation between PD-L1 expression and age or tumor stage. PD-L1 positive cases did demonstrate both worse overall (Figure 4) and disease-free survival (not shown); however, this did not reach significance.

### 3.4. Microsatellite Instability

We applied PMS2, MLH1, MSH2, and MSH6 staining as surrogate markers of MSI and found 5/69 (7%) cases positive, two were SNEC, two SNUC and one was HG-non-ITAC. Four tumors demonstrated complete absence and one reduced expression of PMS2, accompanied by complete loss of MLH1 in two cases and reduced MLH1 in two cases, while

in one case PMS2 was the only lost of the four MSI markers. One case showed complete absence of all four markers, and in one case shown in Figure 5, PMS2 and MLH1 were lost and MSH2 and MSH6 reduced (Supplementary Table S1). All five MSI positive cases were IDH2-wildtype and did not show PD-L1 expression. One MSI positive case (SNUC) did harbor CD8+ TILs. MSI positivity was not related to age or stage; correlation with survival was not analyzed, as follow-up information was only available of two MSI-positive cases.



**Figure 5.** Representative MSI-positive SNUC showing stainings of hematoxylin and eosin (A), PMS2 (B), MLH1 (C), MSH2 (D) and MSH6 (E). Arrows indicate small patches of positive cells. All images  $\times 200$  magnification.

#### 4. Discussion

Standard treatment of poorly differentiated sinonasal carcinomas consists of surgery and radiotherapy, in some cases complemented with histo-type driven chemotherapy [15,17]. In spite of advances in these approaches, these tumors still carry a very poor prognosis. Moreover, being rare cancers, there are few studies on alternative therapeutic options. CD8+ TILs, PD-L1 expression and MSI are recognized biomarkers for treatment with immune checkpoint inhibitors and have been studied in various subtypes of sinonasal cancer [22–30]. Other biomarkers include TMB and gene expression profiling of immune pathways and the first studies on sinonasal cancer indeed indicated their potential to identify patients with SNSCC, SNUC or high-grade carcinomas that may benefit from immunotherapy [29,36,37]. In this study, we focused on CD8+ TILs, PD-L1 expression and MSI.

Considering the whole cohort of 69 tumors, we found 33% to have CD8+ TILs, 33% with PD-L1 expression and 7% as MSI-positive. In nearly all cases, CD8+ TILs were present both in the tumor and the stromal compartment and correlated with PD-L1 positivity, which is in agreement with many previous studies. In contrast with previous studies on MSI-positive tumors, we found MSI positivity to be mutually exclusive with CD8+ TILs and nearly also with PD-L1 expression [38–40]. This may be due to the fact that we only applied PMS2, MLH1, MSH2, and MSH6 immunohistochemistry without the possibility to confirm our results by multiplex PCR. Additionally, the low number of 5 MSI-positive cases and the whole cohort of 69 is a limitation to our observation.

Comparing the different tumor types, CD8+ TILs were observed most frequently (60% of cases) in the adenocarcinoma subtypes HG-non-ITAC and solid-type ITAC, which is higher than previous studies on sinonasal tumors reporting 19–50% in SNSCC [24–26,41,42] and 19% in ITAC [22]. In CD8+ TILs were much less frequent and were predominantly found in the stromal compartment [27,28]. Additionally, PD-L1 expression was the most frequent (50–83% of cases) in HG-non-ITAC and solid-type ITAC, together with PDSNSCC. Again, these percentages are higher than the 30–46% observed in SNSCC [24–26], the 26% in ITAC [22] and the 20% in ONB [28]. Our finding of 7% of cases with MSI are in agreement with earlier immunohistochemical and multiplex PCR studies on sinonasal tumors, reporting a 2–3% in SNSCC and no MSI in other tumor subtypes. One study using multiplex PCR demonstrated MSI in 21% of ITAC, but there are no studies confirming this finding [30].

Although follow-up information in our study was very limited and the statistical power of the survival analysis low, our results indicated a tendency toward worse clinical outcome for tumors with CD8+ TILs. This finding contrast with a number of studies on ITAC, ONB and SNSCC have indicated CD8+ TILs as indicators of better survival [22,24,26,27,42,43]. Indeed, a positive relation between CD8+ TILs and favorable prognosis is found in the majority of cancer types [44].

However, there are also reports that associated CD8+ TILs with worse survival in SNSCC [25], and in non-small cell lung cancer [45,46]. Discrepancies may be due to the use of different cutoff points and differences in immunostaining protocols and also to differences in patient cohorts and treatment schemes.

Our data also suggest a possible association between PD-L1 expression and worse clinical outcome. This is in accordance with a similar study on SNSCC by Hongo et al. [26], although other studies on sinonasal tumors including ITAC, ONB and SNSCC reported no prognostic value for PD-L1 [22–24,28]. Additionally, in other solid tumor types, such as head and neck squamous cell carcinoma and lung cancer, contradictory data on the prognostic role of PD-L1 expression have been presented, with either relation to poor prognosis, to better survival or no relation at all [47–51]. Tumor cells express PD-L1 to escape the immune system. We found that the presence of CD8+ TILs correlated with tumoral PD-L1 expression; therefore, the tendency toward worse clinical outcome for tumors with PD-L1 expression and CD8+ TILs in our series may indicate that these CD8+ TILs are dysfunctional, exhausted cells.



We found 5/69 tumors with an indication for MSI positivity, four with complete loss of PMS2 together with lost/reduced MLH1 expression. In general, MSI positivity is considered a predictor of favorable clinical outcome. With follow-up information of only two of the MSI-positive cases in our cohort, no meaningful assessment of prognostic value was possible; however, these patients had a very poor survival of 2 and 6 months. Our cohort included one case each of SMARCB1-deficient carcinoma, SMARCA4-deficient carcinoma and NUT carcinoma, unfortunately without follow-up information.

The FDA has approved MSI status, analyzed by immunohistochemistry or by multiplex PCR, as predictor for the efficacy of immunotherapy of unresectable or metastatic cancer, irrespective of the primary site of origin [52]. More specifically, for head and neck squamous cell carcinoma, the PD-1 inhibitor pembrolizumab is approved as a single agent for patients whose tumors express PD-L1, and nivolumab and pembrolizumab are also approved for second-line treatment of recurrent and metastatic tumors [19]. The degree of infiltration of CD8+ T cells is correlated with improved response rates to anti-PD-1/PD-L1 agents in HNSCC [53]. There are few clinical studies on rare head and neck cancer subtypes, such as the sinonasal tumors presented in our study. Park et al. reported favorable response to PD-1 inhibitors in 11 recurrent/metastatic SNSCC, even more so than studies on non-SNSCC head and neck squamous cell carcinoma have shown, although a direct comparison was not possible. Notably, the response was not related to PD-L1 expression [54]. Another clinical study with nivolumab (anti-PD-1) included 18 sinonasal tumors of different histological subtypes and showed response rates comparable to those reported for head and neck squamous cell carcinoma, with the highest efficacy against high-grade non-squamous cell sinonasal tumors [55]. Additionally, a clinical study with nasopharyngeal carcinoma patients has shown the promising efficacy of atezolizumab (anti-PD-L1) [56].

Our results on poorly differentiated sinonasal carcinomas revealed that at least one of the immunotherapeutic biomarkers >10% CD8+ TILs, >5% PD-L1 expression or MSI-positivity occurred in 39% (27/69) of cases. For immunotherapy to be most effective, tumors ideally should express PD-L1 and have tumor-activated CD8+ TILs [57], and this is what we observed in 19% (13/69) cases. MSI positivity in 5 cases was mutually exclusive with these 13 cases, which would bring the total number eligible for immunotherapy to 18 patients, 26% of the cohort.

The three cases SMARCB1-deficient carcinoma, SMARCA4-deficient carcinoma and NUT carcinoma may be given special attention. Recent studies suggest that SMARCB1 and SMARCA4 deficiencies lead to enhanced levels of TILs and PD-L1, despite low TMB [58–60]. Our two cases showed the absence of CD8+ TILs, whereas the SMARCB1-deficient carcinoma did express PD-L1. Nevertheless, a clinical study on metastatic pancreatic SWI/SNF cancer showed good responses to immunotherapy in 8/9 patients, independent of MSI or TMB status or PD-L1 expression [61]. Finally, preclinical studies on mice models of pulmonary NUT carcinoma indicated the synergistic effects of immunotherapy combined with BET-inhibitor [62]. These early promising results may be relevant for sinonasal SWI/SNF and NUT carcinomas as well.

Our study has several limitations. First, the series of cases is not homogeneous. Although all tumors are considered poorly differentiated, they do belong to distinct sinonasal cancer subtypes. Second, due to the fact that these are rare tumors, we could only analyze a relatively low number of cases, and thus more studies are necessary. Finally, the patients in our retrospective cohort had received conventional treatments that did not include immunotherapy, so it was not possible to correlate response to therapy with CD8+ TILs and PD-L1 expression status or to find an explanation as to why cases with CD8+ TILs had worse clinical outcomes. However, this negative correlation does not preclude that these patients would be less responsive to immune checkpoint inhibitors.

To conclude, immune checkpoint inhibitors represent new options for treatment for an increasing number of tumor types. Our results on CD8+ TILs, PD-L1 expression and MSI indicate that also a substantial subset of patients with poorly differentiated sinonasal tumors may be candidates to be treated with this promising new therapy.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biomedicines10092205/s1>, Table S1. PMS2, MLH1, MSH2 and MSH6 staining pattern in 5 cases designated as MSI positive. Figure S1. Representative images of SMARCB1-deficient carcinoma (A–D), SMARCA4-deficient carcinoma (E–H) and NUT carcinoma (I–L) showing hematoxylin and eosin staining (A,E,I), SmarCB1 expression (B), SmarCA4 expression (F) and NUT1 expression (J), as well as CD8+ TILs (C,G,K) and PD-L1 (D,H,L).

**Author Contributions:** Conceptualization, M.A.H., J.L.L. and F.L.; Data curation, E.V.-F., L.S.-F., A.F., R.G.-M., V.N.C., H.C.-M. and S.L.L.-G.; Formal analysis, E.V.-F., M.A.H. and F.L.; Funding acquisition, M.A.H. and J.L.L.; Investigation, E.V.-F., B.V., R.G.-M. and V.N.C.; Methodology, M.A.H., L.S.-F., R.G.-M., V.N.C., H.C.-M. and S.L.L.-G.; Project administration, M.A.H.; Resources, B.V., J.L.L. and F.L.; Supervision, M.A.H. and F.L.; Validation, B.V. and A.F.; Writing—original draft, E.V.-F. and M.A.H.; Writing—review and editing, L.S.-F., B.V., A.F., R.G.-M., V.N.C., H.C.-M., S.L.L.-G., J.L.L. and F.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study has been funded by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) through the projects “PI17/00763” and “PI19/00191” and co-funded by the European Union, and by CICPF16008HERM from Fundación AECC, CB16/12/00390 from the Centro de Investigación Biomédica en Red de Cancer (CIBERONC) and IDI2018/155 from Ayudas a Grupos PCTI Principado de Asturias, Spain.

**Institutional Review Board Statement:** All experimental protocols were approved by the Institutional Ethics Committee of the Hospital Universitario Central de Asturias and by the Regional CEIC from Principado de Asturias (approval numbers 07/16 for project CICPF16008-HERM, 83/17 for project PI17/00763 and 2020.048 for project PI19/00191). All methods were carried out in accordance with the guidelines of the Institutional Ethics Committee of the Hospital Universitario Central de Asturias.

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** Data are available with the corresponding upon request.

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

## References

1. El-Naggar, A.K.; Chan, J.K.C.; Grandis, J.R.; Takata, T.; Slootweg, P.J. *World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours*, 4th ed.; IARC Press: Lyon, France, 2017; pp. 18–21.
2. Llorente, J.L.; López, F.; Suárez, C.; Hermsen, M.A. Sinonasal carcinoma: Clinical, pathological, genetic and therapeutic advances. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2014**, *11*, 460–472. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Bell, D.; Hanna, E.Y.; Weber, R.S.; Demonte, F.; Triantafyllou, A.; Lewis, J.S.; Cardesa, A.; Slootweg, P.J.; Stenman, G.; Gnepp, D.R.; et al. Neuroendocrine neoplasms of the sinonasal region. *Head Neck* **2015**, *38*, E2259–E2266. [[CrossRef](#)]
4. Bell, D.; Hanna, E.Y. Sinonasal undifferentiated carcinoma: Morphological heterogeneity, diagnosis, management and biological markers. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2013**, *13*, 285–296. [[CrossRef](#)]
5. Thompson, L.D.R.; Franchi, A. New tumor entities in the 4th edition of the World Health Organization classification of head and neck tumors: Nasal cavity, paranasal sinuses and skull base. *Virchows Arch.* **2017**, *472*, 315–330. [[CrossRef](#)]
6. Taverna, C.; Agaimy, A.; Franchi, A. Towards a Molecular Classification of Sinonasal Carcinomas: Clinical Implications and Opportunities. *Cancers* **2022**, *14*, 1463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Bishop, J.A. Recently described neoplasms of the sinonasal tract. *Semin. Diagn. Pathol.* **2016**, *33*, 62–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Stelow, E.B.; Bishop, J.A. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Tumours of the Nasal Cavity, Paranasal Sinuses and Skull Base. *Head Neck Pathol.* **2017**, *11*, 3–15. [[CrossRef](#)]
9. Franchi, A. An Update on Sinonasal Round Cell Undifferentiated Tumors. *Head Neck Pathol.* **2016**, *10*, 75–84. [[CrossRef](#)]
10. Thompson, L. Small round blue cell tumors of the sinonasal tract: A differential diagnosis approach. *Mod. Pathol.* **2017**, *30*, S1–S26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Jo, V.Y.; Chau, N.G.; Hornick, J.; Krane, J.F.; Sholl, L.M. Recurrent IDH2 R172X mutations in sinonasal undifferentiated carcinoma. *Mod. Pathol.* **2017**, *30*, 650–659. [[CrossRef](#)]
12. Dogan, S.; Chute, D.J.; Xu, B.; Ptashkin, R.N.; Chandramohan, R.; Casanova-Murphy, J.; Nafa, K.; A Bishop, J.; I Chiosea, S.; Stelow, E.B.; et al. Frequent IDH2 R172 mutations in undifferentiated and poorly-differentiated sinonasal carcinomas. *J. Pathol.* **2017**, *242*, 400–408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Patel, T.D.; Vazquez, A.; Dubal, P.M.; Baredes, S.; Liu, J.K.; Eloy, J.A. Sinonasal neuroendocrine carcinoma: A population-based analysis of incidence and survival. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **2015**, *5*, 448–453. [[CrossRef](#)]
14. Wenig, B.M. Undifferentiated Malignant Neoplasms of the Sinonasal Tract. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2009**, *133*, 699–712. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

15. Kuo, P.; Manes, R.P.; Schwam, Z.G.; Judson, B.L. Survival Outcomes for Combined Modality Therapy for Sinonasal Undifferentiated Carcinoma. *Otolaryngol. Neck Surg.* **2016**, *156*, 132–136. [[CrossRef](#)]
16. López, F.; Suárez, V.; Vivanco, B.; Suárez, C.; Llorente, J.L. Current management of sinonasal undifferentiated carcinoma. *Rhinology* **2015**, *53*, 212–220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Orlandi, E.; Cavalieri, S.; Granata, R.; Nicolai, P.; Castelnuovo, P.; Piazza, C.; Schreiber, A.; Turri-Zanoni, M.; Quattrone, P.; Miceli, R.; et al. Locally advanced epithelial sinonasal tumors: The impact of multimodal approach. *Laryngoscope* **2019**, *130*, 857–865. [[CrossRef](#)]
18. Ramaekers, B.L.; Pijls-Johannesma, M.; Joore, M.; Ende, P.V.D.; Langendijk, J.A.; Lambin, P.; Kessels, A.G.; Grutters, J. Systematic review and meta-analysis of radiotherapy in various head and neck cancers: Comparing photons, carbon-ions and protons. *Cancer Treat. Rev.* **2011**, *37*, 185–201. [[CrossRef](#)]
19. Cohen, E.E.W.; Bell, R.B.; Bifulco, C.B.; Burtness, B.; Gillison, M.L.; Harrington, K.J.; Le, Q.T.; Lee, N.Y.; Leidner, R.; Lewis, R.L.; 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*, 184. [[CrossRef](#)]
20. Antonia, S.; Goldberg, S.B.; Balmanoukian, A.; Chaft, J.E.; Sanborn, R.E.; Gupta, A.; Narwal, R.; Steele, K.; Gu, Y.; Karakunnel, J.J.; et al. Safety and antitumor activity of durvalumab plus tremelimumab in non-small cell lung cancer: A multicentre, phase 1b study. *Lancet Oncol.* **2016**, *17*, 299–308. [[CrossRef](#)]
21. Kato, K.; Cho, B.C.; Takahashi, M.; Okada, M.; Lin, C.-Y.; Chin, K.; Kadowaki, S.; Ahn, M.-J.; Hamamoto, Y.; Doki, Y.; et al. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced oesophageal squamous cell carcinoma refractory or intolerant to previous chemotherapy (ATTRACTION-3): A multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **2019**, *20*, 1506–1517. [[CrossRef](#)]
22. García-Marín, R.; Reda, S.; Riobello, C.; Cabal, V.N.; Suárez-Fernández, L.; Vivanco, B.; López, F.; Llorente, J.L.; Hermsen, M.A. CD8+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Tumor Microenvironment Immune Types as Biomarkers for Immunotherapy in Sinonasal Intestinal-Type Adenocarcinoma. *Vaccines* **2020**, *8*, 202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Riobello, C.; Vivanco, B.; Reda, S.; López-Hernández, A.; García-Inclán, C.; Potes-Ares, S.; Cabal, V.N.; López, F.; Llorente, J.L.; Hermsen, M.A. Programmed death ligand-1 expression as immunotherapeutic target in sinonasal cancer. *Head Neck* **2018**, *40*, 818–827. [[CrossRef](#)]
24. Quan, H.; Yan, L.; Wang, S.; Wang, S. Clinical relevance and significance of programmed death-ligand 1 expression, tumor-infiltrating lymphocytes, and p16 status in sinonasal squamous cell carcinoma. *Cancer Manag. Res.* **2019**, *11*, 4335–4345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. García-Marín, R.; Reda, S.; Riobello, C.; Cabal, V.; Suárez-Fernández, L.; Vivanco, B.; Álvarez-Marcos, C.; López, F.; Llorente, J.; Hermsen, M. Prognostic and Therapeutic Implications of Immune Classification by CD8<sup>+</sup> Tumor-Infiltrating Lymphocytes and PD-L1 Expression in Sinonasal Squamous Cell Carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6926. [[CrossRef](#)]
26. Hongo, T.; Yamamoto, H.; Jiromaru, R.; Yasumatsu, R.; Kuga, R.; Nozaki, Y.; Hashimoto, K.; Matsuo, M.; Wakasaki, T.; Tamae, A.; et al. PD-L1 expression, tumor-infiltrating lymphocytes, mismatch repair deficiency, EGFR alteration and HPV infection in sinonasal squamous cell carcinoma. *Mod. Pathol.* **2021**, *34*, 1966–1978. [[CrossRef](#)]
27. Classe, M.; Burgess, A.; El Zein, S.; Wassef, M.; Herman, P.; Mortuaire, G.; Leroy, X.; Malouf, G.G.; Verillaud, B. Evaluating the prognostic potential of the Ki67 proliferation index and tumor-infiltrating lymphocytes in olfactory neuroblastoma. *Histopathology* **2019**, *75*, 853–864. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. London, N.R., Jr.; Rooper, L.M.; Bishop, J.A.; Xu, H.; Bernhardt, L.J.; Ishii, M.; Hann, C.L.; Taube, J.M.; Izumchenko, E.; Gaykalova, D.A.; et al. Expression of Programmed Cell Death Ligand 1 and Associated Lymphocyte Infiltration in Olfactory Neuroblastoma. *World Neurosurg.* **2020**, *135*, e187–e193. [[CrossRef](#)]
29. Hieggelke, L.; Heydt, C.; Castiglione, R.; Rehker, J.; Merkelbach-Bruse, S.; Riobello, C.; Llorente, J.L.; Hermsen, M.A.; Buettner, R. Mismatch Repair Deficiency and Somatic Mutations in Human Sinonasal Tumors. *Cancers* **2021**, *13*, 6081. [[CrossRef](#)]
30. Martínez, J.G.; Pérez-Escuredo, J.; López, F.; Suárez, C.; Álvarez-Marcos, C.; Llorente, J.L.; Hermsen, M.A. Microsatellite instability analysis of sinonasal carcinomas. *Otolaryngol. Neck Surg.* **2009**, *140*, 55–60. [[CrossRef](#)]
31. Riobello, C.; López-Hernández, A.; Cabal, V.N.; García-Marín, R.; Suárez-Fernández, L.; Sánchez-Fernández, P.; Vivanco, B.; Blanco, V.; López, F.; Franchi, A.; et al. IDH2 Mutation Analysis in Undifferentiated and Poorly Differentiated Sinonasal Carcinomas for Diagnosis and Clinical Management. *Am. J. Surg. Pathol.* **2019**, *44*, 396–405. [[CrossRef](#)]
32. López-Hernández, A.; Vivanco, B.; Franchi, A.; Bloemena, E.; Cabal, V.N.; Potes, S.; Riobello, C.; García-Inclán, C.; López, F.; Llorente, J.L.; et al. Genetic profiling of poorly differentiated sinonasal tumours. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–8. [[CrossRef](#)]
33. Fuchs, T.L.; Sioson, L.; Sheen, A.; Jafari-Nejad, K.; Renaud, C.J.; Andrici, J.; Ahadi, M.; Chou, A.; Gill, A.J. Assessment of Tumor-infiltrating Lymphocytes Using International TILs Working Group (ITWG) System Is a Strong Predictor of Overall Survival in Colorectal Carcinoma: A Study of 1034 Patients. *Am. J. Surg. Pathol.* **2020**, *44*, 536–544. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Ferris, R.L.; Blumenschein, G., Jr.; Fayette, J.; Guigay, J.; Colevas, A.D.; Licitra, L.; Harrington, K.; Kasper, S.; Vokes, E.E.; Even, C.; et al. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *375*, 1856–1867. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

35. Chow, L.Q.M.; Haddad, R.; Gupta, S.; Mahipal, A.; Mehra, R.; Tahara, M.; Berger, R.; Eder, J.P.; Burtness, B.; Lee, S.-H.; et al. Antitumor Activity of Pembrolizumab in Biomarker-Unselected Patients With Recurrent and/or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Results From the Phase Ib KEYNOTE-012 Expansion Cohort. *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, 3838–3845. [[CrossRef](#)]
36. Bell, D.; Bell, A.; Ferrarotto, R.; Glisson, B.; Takahashi, Y.; Fuller, G.; Weber, R.; Hanna, E. High-grade sinonasal carcinomas and surveillance of differential expression in immune related transcriptome. *Ann. Diagn. Pathol.* **2020**, *49*, 151622. [[CrossRef](#)]
37. De Cecco, L.; Serafini, M.S.; Facco, C.; Granata, R.; Orlandi, E.; Fallai, C.; Licitra, L.; Marchesi, E.; Perrone, F.; Pilotti, S.; et al. A functional gene expression analysis in epithelial sinonasal cancer: Biology and clinical relevance behind three histological subtypes. *Oral Oncol.* **2019**, *90*, 94–101. [[CrossRef](#)]
38. Nonomura, Y.; Nakayama, K.; Nakamura, K.; Razia, S.; Yamashita, H.; Ishibashi, T.; Ishikawa, M.; Sato, S.; Nakayama, S.; Otsuki, Y.; et al. Ovarian Endometrioid and Clear Cell Carcinomas with Low Prevalence of Microsatellite Instability: A Unique Subset of Ovarian Carcinomas Could Benefit from Combination Therapy with Immune Checkpoint Inhibitors and Other Anticancer Agents. *Healthcare* **2022**, *10*, 694. [[CrossRef](#)]
39. Dislich, B.; Mertz, K.D.; Gloor, B.; Langer, R. Interspatial Distribution of Tumor and Immune Cells in Correlation with PD-L1 in Molecular Subtypes of Gastric Cancers. *Cancers* **2022**, *14*, 1736. [[CrossRef](#)]
40. Liu, X.; Choi, M.G.; Kim, K.; Kim, K.-M.; Kim, S.T.; Park, S.H.; Cristescu, R.; Peter, S.; Lee, J. High PD-L1 expression in gastric cancer (GC) patients and correlation with molecular features. *Pathol.-Res. Pract.* **2020**, *216*, 152881. [[CrossRef](#)]
41. Lou, H.; Fang, J.; Li, P.; Zhou, W.; Wang, Y.; Fan, E.; Li, Y.; Wang, H.; Liu, Z.; Xiao, L.; et al. Frequency, Suppressive Capacity, Recruitment and Induction Mechanisms of Regulatory T Cells in Sinonasal Squamous Cell Carcinoma and Nasal Inverted Papilloma. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0126463. [[CrossRef](#)]
42. Takahashi, Y.; Amit, M.; Gleber-Netto, F.O.; Silverman, D.; Bell, D.; Xie, T.-X.; Roberts, D.; Myers, J.N.; Hanna, E.Y. Evaluation of the Immune Microenvironment in Sinonasal Squamous Cell Carcinoma and Its Association with Patients' Survival. *J. Neurol. Surg. Part B Skull Base* **2021**, *82*, S022. [[CrossRef](#)]
43. Gu, J.T.; Ma, N.C.; Betts, C.; Ms, S.S.; Geltzeiler, M.; Pucci, F. Characterization of the tumor immune microenvironment of sinonasal squamous-cell carcinoma. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **2021**, *12*, 39–50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Ock, C.-Y.; Keam, B.; Kim, S.; Lee, J.-S.; Kim, M.; Kim, T.M.; Jeon, Y.K.; Kim, D.-W.; Chung, D.H.; Heo, D.S. Pan-Cancer Immunogenomic Perspective on the Tumor Microenvironment Based on PD-L1 and CD8 T-Cell Infiltration. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 2261–2270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Wakabayashi, O.; Yamazaki, K.; Oizumi, S.; Hommura, F.; Kinoshita, I.; Ogura, S.; Dosaka-Akita, H.; Nishimura, M. CD4+ T cells in cancer stroma, not CD8+ T cells in cancer cell nests, are associated with favorable prognosis in human non-small cell lung cancers. *Cancer Sci.* **2003**, *94*, 1003–1009. [[CrossRef](#)]
46. Kinoshita, T.; Kudo-Saito, C.; Muramatsu, R.; Fujita, T.; Saito, M.; Nagumo, H.; Sakurai, T.; Noji, S.; Takahata, E.; Yaguchi, T.; et al. Determination of poor prognostic immune features of tumour microenvironment in non-smoking patients with lung adenocarcinoma. *Eur. J. Cancer* **2017**, *86*, 15–27. [[CrossRef](#)]
47. Lin, Y.M.; Sung, W.W.; Hsieh, M.J.; Tsai, S.C.; Lai, H.W.; Yang, S.M.; Shen, K.H.; Chen, M.K.; Lee, H.; Yeh, K.T.; et al. High PD-L1 expression correlates with metastatic and poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0142656. [[CrossRef](#)]
48. Parra, E.R.; Behrens, C.; Rodriguez-Canales, J.; Lin, H.; Mino, B.; Blando, J.; Zhang, J.; Gibbons, D.L.; Heymach, J.V.; Sepesi, B.; et al. Image Analysis-based Assessment of PD-L1 and Tumor-Associated Immune Cells Density Supports Distinct Intratumoral Microenvironment Groups in Non-small Cell Lung Carcinoma Patients. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 6278–6289. [[CrossRef](#)]
49. Vassilakopoulou, M.; Avgeris, M.; Velcheti, V.; Kotoula, V.; Rampias, T.; Chatzopoulos, K.; Perisanidis, C.; Kontos, C.K.; Giotakis, A.I.; Scorilas, A.; et al. Evaluation of PD-L1 Expression and Associated Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 704–713. [[CrossRef](#)]
50. Velcheti, V.; Schalper, K.A.; Carvajal, D.E.; Anagnostou, V.K.; Syrigos, K.N.; Sznol, M.; Herbst, R.S.; Gettinger, S.N.; Chen, L.; Rimm, D.L. Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. *Lab. Invest.* **2014**, *94*, 107–116. [[CrossRef](#)]
51. Tsao, M.; Le Teuff, G.; Shepherd, F.A.; Landais, C.; Hainaut, P.; Filipits, M.; Pirker, R.; Le Chevalier, T.; Graziano, S.; Kratz, R.; et al. PD-L1 protein expression assessed by immunohistochemistry is neither prognostic nor predictive of benefit from adjuvant chemotherapy in resected non-small cell lung cancer. *Ann. Oncol.* **2017**, *28*, 882–889. [[CrossRef](#)]
52. Marcus, L.; Lemery, S.J.; Keegan, P.; Pazdur, R. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Microsatellite Instability-High Solid Tumors. *Clin. Cancer Res.* **2019**, *25*, 3753–3758. [[CrossRef](#)]
53. Hanna, G.J.; Lizotte, P.; Cavanaugh, M.; Kuo, F.C.; Shivdasani, P.; Frieden, A.; Chau, N.G.; Schoenfeld, J.D.; Lorch, J.H.; Uppaluri, R.; et al. Frameshift events predict anti-PD-1/L1 response in head and neck cancer. *JCI Insight* **2018**, *3*, e98811. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Park, J.C.; Faquin, W.C.; Durbeck, J.; Faden, D.L. Immune checkpoint inhibitors in sinonasal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* **2020**, *109*, 104776. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Ueda, Y.; Okano, S.; Enokida, T.; Fujisawa, T.; Ito, K.; Sato, M.; Tanaka, H.; Wada, A.; Tahara, M. Nivolumab for recurrent or metastatic head and neck cancer patients with non-squamous cell carcinoma and/or a primary subsite excluded from CheckMate141, a retrospective study. *Oral Oncol.* **2022**, *130*, 105932. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

56. Colevas, A.; Bahleda, R.; Braiteh, F.; Balmanoukian, A.; Brana, I.; Chau, N.; Sarkar, I.; Molinero, L.; Grossman, W.; Kabbinavar, F.; et al. Safety and clinical activity of atezolizumab in head and neck cancer: Results from a phase I trial. *Ann. Oncol.* **2018**, *29*, 2247–2253. [[CrossRef](#)]
57. Blank, C.U.; Haanen, J.B.; Ribas, A.; Schumacher, T.N. CANCER IMMUNOLOGY. The “cancer immunogram”. *Science* **2016**, *352*, 658–660. [[CrossRef](#)]
58. Chabanon, R.M.; Morel, D.; Postel-Vinay, S. Exploiting epigenetic vulnerabilities in solid tumors: Novel therapeutic opportunities in the treatment of SWI/SNF-defective cancers. *Semin. Cancer Biol.* **2019**, *61*, 180–198. [[CrossRef](#)]
59. Jelinic, P.; Ricca, J.; Van Oudenhove, E.; Olvera, N.; Merghoub, T.; A Levine, D.; Zamarin, D. Immune-Active Microenvironment in Small Cell Carcinoma of the Ovary, Hypercalcemic Type: Rationale for Immune Checkpoint Blockade. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **2018**, *110*, 787–790. [[CrossRef](#)]
60. Ngo, C.; Postel-Vinay, S. Immunotherapy for SMARCB1-Deficient Sarcomas: Current Evidence and Future Developments. *Biomedicines* **2022**, *10*, 650. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Botta, G.P.; Kato, S.; Patel, H.; Fanta, P.; Lee, S.; Okamura, R.; Kurzrock, R. SWI/SNF complex alterations as a biomarker of immunotherapy efficacy in pancreatic cancer. *JCI Insight* **2021**, *6*, e150453. [[CrossRef](#)]
62. Li, X.; Shi, H.; Zhang, W.; Bai, C.; He, M.; Ta, N.; Huang, H.; Ning, Y.; Fang, C.; Qin, H.; et al. Immunotherapy and Targeting the Tumor Microenvironment: Current Place and New Insights in Primary Pulmonary NUT Carcinoma. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 690115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]