



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

Facultad de Medicina

Departament de Cirurgia

**PAPEL PRONÓSTICO DE LA  
EXPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL DE  
CD45 EN LOS CARCINOMAS  
ESCAMOSOS DE CABEZA Y CUELLO**

Tesis Doctoral 2016

Autor:

Adriana María Agüero Medina

Directores:

Xavier León Vintró  
Mercedes Camacho Pérez de Madrid

Tutor:

Xavier León Vintró



Dedicado a mis padres y hermanos,  
por el constante e incondicional apoyo,  
por dejar que conozca el mundo en  
busca de mis sueños y por enseñarme  
el valor de la perseverancia.



## Agradecimientos

A mis directores, los doctores X. León y M. Camacho, quienes con su incansable esfuerzo hicieron posible la elaboración de este proyecto, fruto de su trabajo, constante apoyo y horas de dedicación a las revisiones y correcciones.

A los doctores, Laura López, Adjunta del Servicio de Anatomía Patológica del H. De la Santa Creu i Sant Pau y Miguel-Ángel Pavón, miembro del: Grup d'Oncogènesi i Antitumorals, Institut d'Investigacions Biomèdiques Sant Pau (IIB-Sant Pau), Infections and Cancer Laboratory, Cancer Epidemiology Research Program, Catalan Institute of Oncology (ICO) y Centro de Investigación Biomédica en Red de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), por su invaluable aporte en este proyecto.

Especial agradecimiento al Dr. Xavier León Vintró, que como tutor de esta tesis, y como profesor de carrera en esta apasionante especialidad, me ha orientado en la labor científica con una entrega e interés que han sobrepasado, con mucho, toda la confianza y expectativas que deposité en su persona.

A ti, G.J., compañero de vida y aventuras, gracias por estar ahí en las buenas y en las malas.

Al Servicio de Otorrinolaringología del H. de la Sant Creu i Sant Pau de Barcelona, residentes y adjuntos, por el desinteresado apoyo y ayuda en la recolección de datos.

Al Servicio de Otorrinolaringología del H. General de Catalunya, por el apoyo brindado.



## **CONTENIDO**

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
GENERALIDADES .....	11
<i>Historia</i> .....	11
<i>El sistema inmune en el microambiente tumoral</i> .....	13
<i>Capacidad pronóstica del TIL en los carcinomas de cabeza y cuello</i> .....	15
PROTEÍNA CD45 .....	41
<i>Generalidades</i> .....	41
<i>Estructura</i> .....	41
<i>Expresión de CD45</i> .....	42
<i>Función de CD45 en las células T</i> .....	43
<i>Función de CD45 en las células B</i> .....	46
<i>Función de CD45 en otros tipos celulares</i> .....	46
<i>Regulación de la expresión de CD45</i> .....	47
<i>CD45 y enfermedad</i> .....	47
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>49</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>53</b>
COHORTE HSP .....	55
MÉTODOS .....	57
<i>Expresión de mRNA</i> .....	57
<i>Análisis del grado de TIL</i> .....	57
<i>Inmunohistoquímica</i> .....	58
<i>Determinación del status HPV</i> .....	58
COHORTE TCGA .....	59
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	62
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>65</b>
COHORTE HSP .....	67
<i>Diferencias en la expresión de CD45 entre las muestras de tumor y de mucosa sana</i> .....	67
<i>Expresión transcripcional de CD45 en función de las características clínicas</i> .....	68
<i>Expresión transcripcional de CD45 en función del estatus HPV para los pacientes con carcinomas de orofaringe</i> .....	72
<i>Capacidad pronóstica de la expresión transcripcional de CD45 en los pacientes con CECC</i> .....	73
<i>Control local en función de la expresión de CD45 en los pacientes con carcinomas de orofaringe</i> .....	84



<i>Correlación entre los niveles de expresión de CD45 y diversas citoquinas con capacidad quimiotáctica</i> .....	87
<i>Correlación entre la expresión transcripcional de CD45 y el TIL</i> .....	90
<i>Estudio inmunohistoquímico</i> .....	91
COHORTE TCGA .....	93
<i>Diferencias en la expresión de genes relacionados con la infiltración leucocitaria entre las muestras de tumor y de mucosa sana</i> .....	93
<i>Expresión transcripcional de CD45 en función de las características clínicas</i> .....	95
<i>Expresión transcripcional de CD45 en función del estatus HPV para los pacientes con carcinomas de orofaringe</i> .....	97
<i>Capacidad pronóstica de la expresión transcripcional de CD45 en los pacientes con CECC</i> .....	98
<i>Correlación entre la expresión transcripcional de CD45 y la expresión de marcadores leucocitarios</i> .....	100
<i>Capacidad pronóstica de marcadores linfocitarios</i> .....	103
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>107</b>
ESTADO ACTUAL DEL ANÁLISIS DEL TIL EN LOS PACIENTES CON CECC .....	112
CORRELACIÓN ENTRE EXPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL DE CD45 Y TIL .....	115
VARIABILIDAD DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE CD45 EN FUNCIÓN DE VARIABLES CLÍNICAS .....	118
CAPACIDAD PRONÓSTICA DE LA EXPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL DE CD45 .....	120
LIMITACIONES DE NUESTRO ESTUDIO .....	128
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>129</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>133</b>

# INTRODUCCIÓN

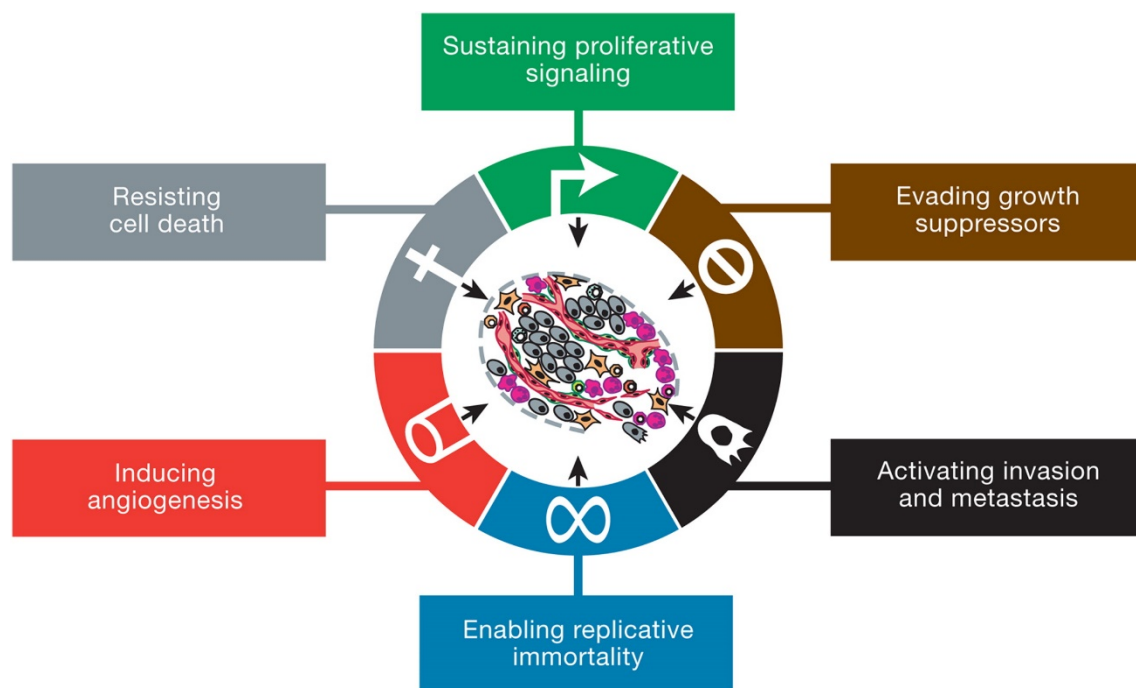


## Introducción

### Generalidades

### Historia

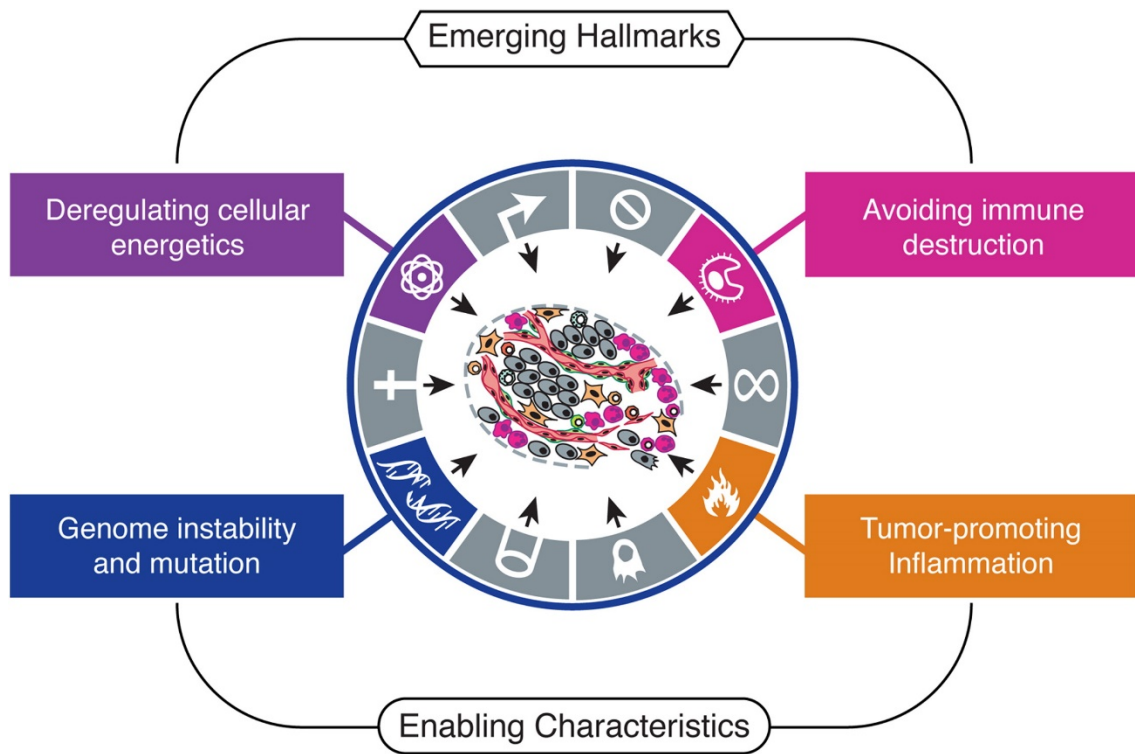
Hanahan y Weinberg<sup>(1)</sup> propusieron en el año 2000 un listado de las características fenotípicas que debían adquirir las células tumorales, incluyendo la existencia de señales de proliferación celular sostenidas, la evasión de los mecanismos de regulación de la proliferación celular, la adquisición de capacidad invasiva, metastatización e inmortalidad celular, la resistencia a la muerte celular programada, y la inducción de angiogénesis.



**Figura 1:** Características fenotípicas adquiridas de las células tumorales ( tomada de Hanahan <sup>1</sup>).

En una revisión de su trabajo publicada en 2011, a estos atributos que determinan el comportamiento de las células tumorales se añadieron cuatro nuevas características: la alteración en la regulación de los mecanismos implicados en la regulación del metabolismo celular; la capacidad de las células tumorales de evadir la destrucción por parte del sistema inmunitario, en especial por parte de los linfocitos T y B, los macrófagos y las células natural

killer (NK); la adquisición de inestabilidad genómica; y finalmente la promoción de un ambiente inflamatorio<sup>(2)</sup>.



**Figura 2:** Nuevas Características fenotípicas adquiridas de las células tumorales (tomada de Hanahan D<sup>2</sup>).

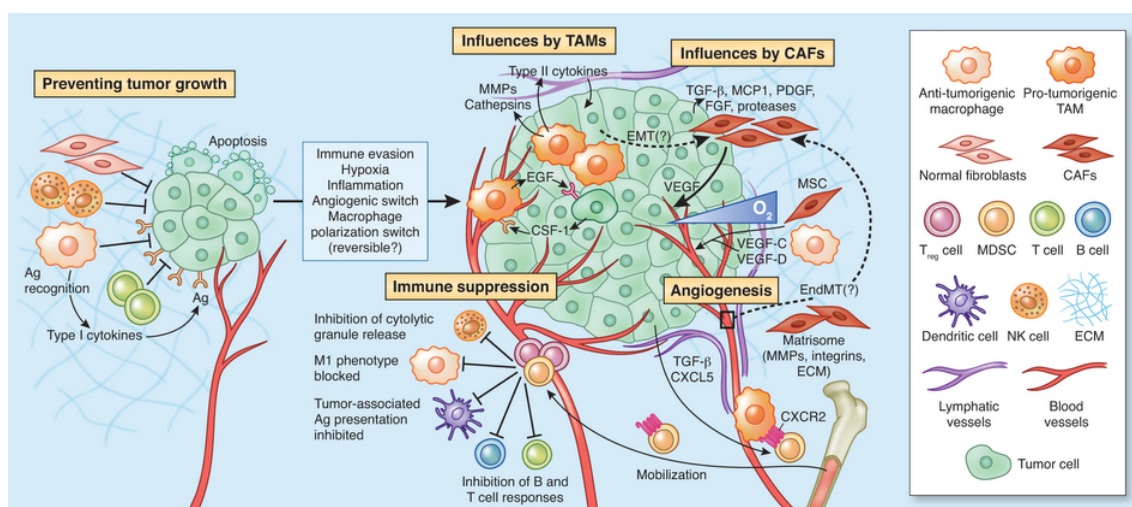
La biología de los tumores sólo puede ser entendida a partir del estudio de los diferentes tipos de células que los componen, incluyendo además de las células tumorales una gran variedad de tipos celulares no tumorales que forman el denominado *microambiente tumoral*. Esta visión contrasta con la imagen reduccionista previa que se tenía del tumor como una colección relativamente homogénea de células tumorales, en la que lo único importante era dilucidar las propiedades de estas células.

Entre los elementos celulares de este microambiente tumoral que se ha comprobado que cuentan con una extraordinaria importancia en la evolución del proceso carcinogénico se encuentran las células del sistema inmunitario.

## El sistema inmune en el microambiente tumoral

En la actualidad se acepta que en los tumores sólidos las células del sistema inmune forman parte constituyente del microambiente tumoral. Este componente celular opera de una forma compleja, con elementos con capacidad de antagonizar y elementos con capacidad de promover la progresión tumoral en proporciones variables.

Entre los componentes del sistema inmune que han ganado atención debido a su papel crítico en los procesos de promoción o control del tumor se incluyen las células mieloides supresoras (MDSC), los macrófagos asociados al tumor (TAM), y los linfocitos citotóxicos. Muchos estudios han mostrado como un incremento en la densidad de MDSC o TAM promueven la progresión tumoral a través de múltiples mecanismos<sup>(3, 4)</sup>. Por el contrario, la presencia de linfocitos citotóxicos en el microambiente tumoral se asocia con una mejoría pronóstica en una gran variedad de modelos tumorales<sup>(5)</sup>.



**Figura 3.** Componentes del sistema inmune relacionados con el proceso de promoción o control del tumor (tomada de Gooden<sup>5</sup>)

Existe una evidencia clara de que el sistema inmune juega un papel fundamental en la vigilancia contra el desarrollo de tumores. La inducción experimental de una inmunodeficiencia en modelos animales en los que se altera la función de los linfocitos T (LT) o las células natural-killer (NK) provoca la aparición espontánea de tumores<sup>(6, 7)</sup>. En humanos se ha comprobado como las situaciones de inmunodeficiencia crónica, incluyendo inmunodeficiencias

primarias, pacientes con SIDA o pacientes trasplantados en tratamiento inmunosupresor, cuentan con incremento significativo de diferentes tipos tumorales, incluyendo tumores sólidos<sup>(8, 9)</sup>.

En la respuesta antitumoral se encuentran implicados una gran variedad de tipos celulares. Está bien establecido que las células NK tienen la capacidad de matar células cancerígenas en diferentes modelos tumorales<sup>(10)</sup>. De forma similar, los linfocitos T (LT) citotóxicos pueden detectar los antígenos anómalos expresados en la superficie de las células tumorales y señalarlas para su destrucción<sup>(11)</sup>. Además de provocar de forma directa la muerte de las células tumorales, los LT citotóxicos activados pueden inhibir la angiogénesis a partir de la secreción de interferón- $\gamma$ <sup>(12)</sup>.

Uno de los mecanismos por los cuales las células tumorales escapan de la vigilancia del sistema inmune es a partir de la selección de células tumorales con escasa capacidad inmunogénica. De forma alternativa, las modificaciones del microambiente tumoral pueden también ser responsables de la adquisición de un perfil protumoral. Estas modificaciones protumorales incluyen la expresión de moléculas antiapoptóticas que previenen la muerte celular, factores de crecimiento que favorecen la proliferación tumoral, y mediadores inmunosupresores como el transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), interleuquina-10 (IL-10), prostaglandina E (PGE) o el programmed cell death-ligand 1 (PDL-1), que cuentan con la capacidad de suprimir la respuesta inmunitaria frente al tumor<sup>(13, 14)</sup>.

Los linfocitos son los efectores principales de la respuesta inmune a nivel del microambiente tumoral. Los tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) son considerados como una reacción inmunitaria del huésped frente a las células del tumor. Se considera que la infiltración linfocitaria a nivel del microambiente tumoral representa una respuesta dirigida contra las células tumorales, y contaría en consecuencia con un efecto beneficioso en la capacidad de control de la enfermedad. La presencia de un infiltrado linfocitario a nivel tumoral se ha asociado con un beneficio pronóstico en pacientes con carcinomas localizados en colon<sup>(15)</sup>, mama<sup>(16)</sup>, ovario<sup>(17)</sup>, pulmón<sup>(18)</sup>, o en pacientes con melanoma<sup>(19)</sup>. Es importante destacar que el grado de TIL se encuentra regulado a partir de la expresión de quimiocinas dentro del microambiente tumoral.<sup>(20)</sup>

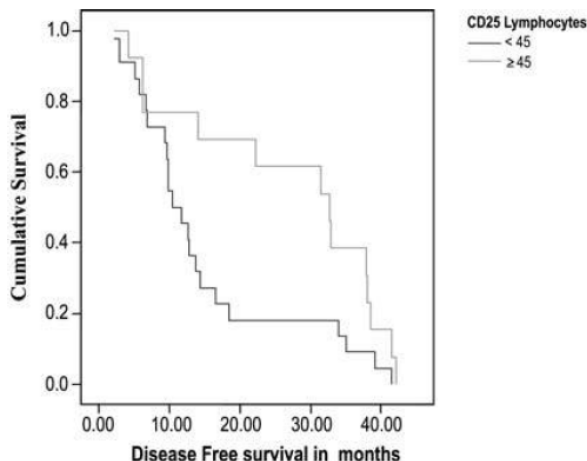
Gooden y cols<sup>(5)</sup> realizaron un meta-análisis en que se analizaron resultados de 33 estudios con diferentes tipos de tumor que aportaban información de la relación entre el grado de infiltración tumoral por diferentes subtipos linfocitarios y el control de la enfermedad. De acuerdo con los resultados, la infiltración por LT (CD3+) o LT citotóxicos (CD8+) contó con un efecto positivo en la supervivencia con un hazard ratio (HR) de 0.58 (IC 95%: 0.43-0.78) y de 0.71 (IC 95%: 0.62-0.82), respectivamente. Por el contrario, la infiltración por LT reguladores (FoxP3+) no se relacionó de forma significativa con la supervivencia (HR 1.19, IC 95%: 0.84-1.67). El efecto sobre la supervivencia más notable se obtuvo al evaluar la relación entre la infiltración por LT CD8+/FoxP3+, con un HR de 0.48 (IC 95%: 0.34-0.68).

### **Capacidad pronóstica del TIL en los carcinomas de cabeza y cuello**

Diferentes autores han llevado a cabo estudios en pacientes con carcinomas escamosos de cabeza y cuello (CECC) evaluando la capacidad pronóstica del valor del TIL, ya sea a partir de un análisis del grado de infiltración linfocitaria global, o analizando diferentes subtipos linfocitarios de manera específica.

Loose y cols<sup>(21)</sup> estudiaron 35 pacientes con CECC tratados mayoritariamente de forma quirúrgica, analizando el grado de infiltración por células CD25+, utilizado como marcador de LT o linfocitos B (LB) activados. Los pacientes con un número más elevado de células CD25+ contaron con una mejor supervivencia libre de recidiva (P=0.039).



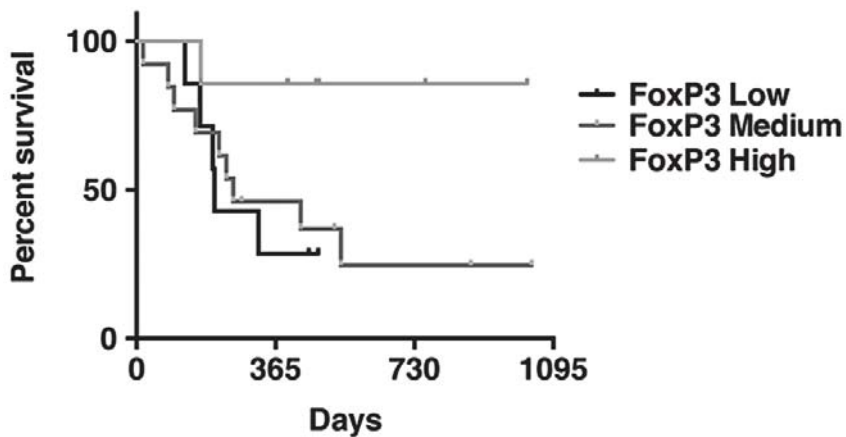


**Figura 4.** Curva de supervivencia libre de enfermedad en pacientes con CECC en función de la presencia de niveles altos o bajos de linfocitos CD25+ (tomada de Loose <sup>21</sup>)

De acuerdo con los resultados de un estudio multivariante, la densidad de células CD25+ fue la única variable que se asoció de forma significativa con la supervivencia libre de recidiva.

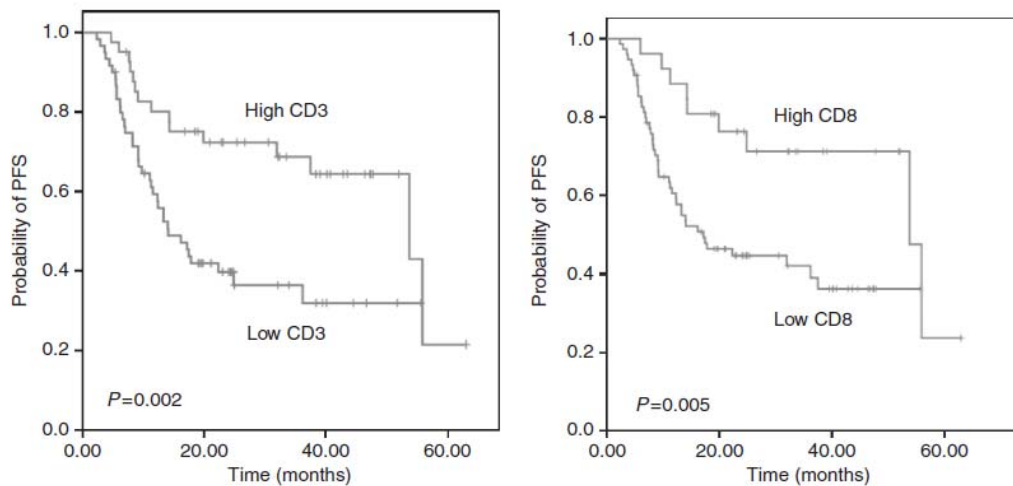
Badoual y cols<sup>(22)</sup> llevaron a cabo un estudio en 84 pacientes con CECC con diferentes localizaciones tratados con cirugía aislada o con un tratamiento adyuvante con radioterapia o quimioradioterapia, analizando mediante inmunohistoquímica diferentes subpoblaciones celulares de LT CD4+. De acuerdo con sus resultados, los tumores con un mayor nivel de infiltración contaron con mejor pronóstico.

En otro estudio en que se analizaron 32 pacientes con CECC tratados de forma quirúrgica Rusell y cols<sup>(23)</sup> observaron como la supervivencia para los pacientes con unos niveles de inmunopositividad elevada frente a FoxP3 contaron con mejor supervivencia.



**Figura 5.** Curva de supervivencia en sujetos con niveles de expresión alto, moderado o bajo de FoxP3 (alto = márgenes altamente invadidos e infiltración por nidos de células tumorales; moderado = gran infiltración en una sola localización; bajo = márgenes escasamente invadidos e infiltración por células tumorales) ( $P < 0.05$ ). (tomada de Russel<sup>23</sup>)

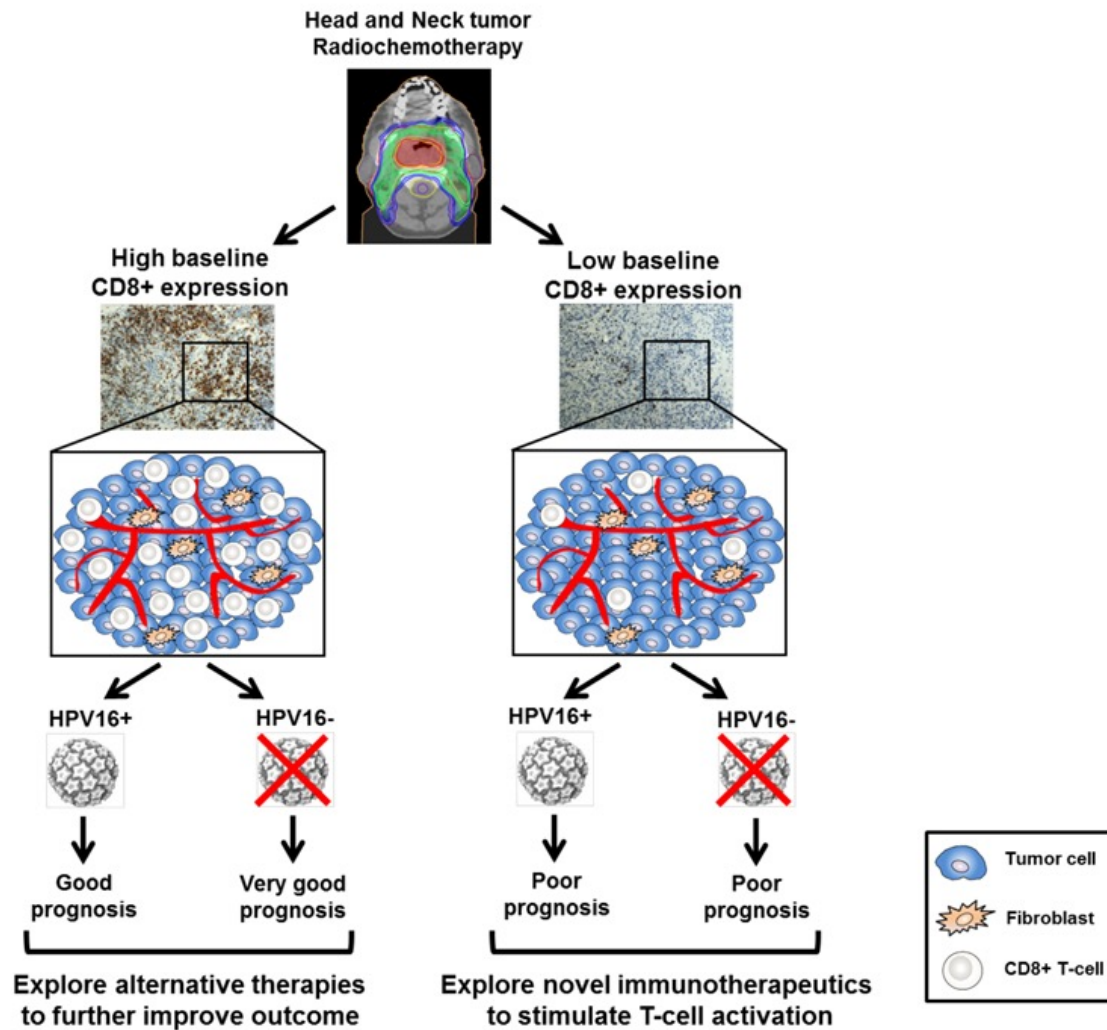
Balermipas y cols<sup>(24)</sup> estudiaron una cohorte de 101 pacientes con CECC tratados con quimioradioterapia, relacionando el nivel de infiltración de diferentes subtipos linfocitarios con inmunohistoquímica. Encontraron como el grado de afectación regional era superior en los pacientes con una expresión baja de CD8, sin que aparecieran otras relaciones significativas entre los grados de TIL y variables clínicopatológicas. Pudo observarse como el grado de infiltración por células CD3 y CD8 positivas se relacionó con un mejor control de la enfermedad y una mejor supervivencia. Las siguientes figuras muestran la supervivencia libre de progresión en función del grado de TIL por CD3 y CD8, categorizando los grados de expresión a partir de los valores de la mediana.



**Figura 6.** Papel pronóstico de CD3 y CD8 en pacientes con CECC después del tratamiento con quimiorradioterapia. Supervivencia libre de progresión en función del grado de TIL por CD3 y CD8 (tomada de Balermipas <sup>24</sup>).

De acuerdo con los resultados de un estudio multivariante, tanto la categoría de infiltración por CD3 como por CD8 contaron con capacidad pronóstica independiente para la supervivencia global, la supervivencia libre de progresión y de metástasis a distancia. Para los pacientes HPV-positivos (27.7%) los valores de TIL no influyeron en la supervivencia, en tanto que para los HPV-negativos una infiltración elevada de linfocitos CD3 o CD8 mejoró el pronóstico de los pacientes. Ni el grado de infiltración por células CD4 ni por células FoxP3 se correlacionaron con el resultado clínico.

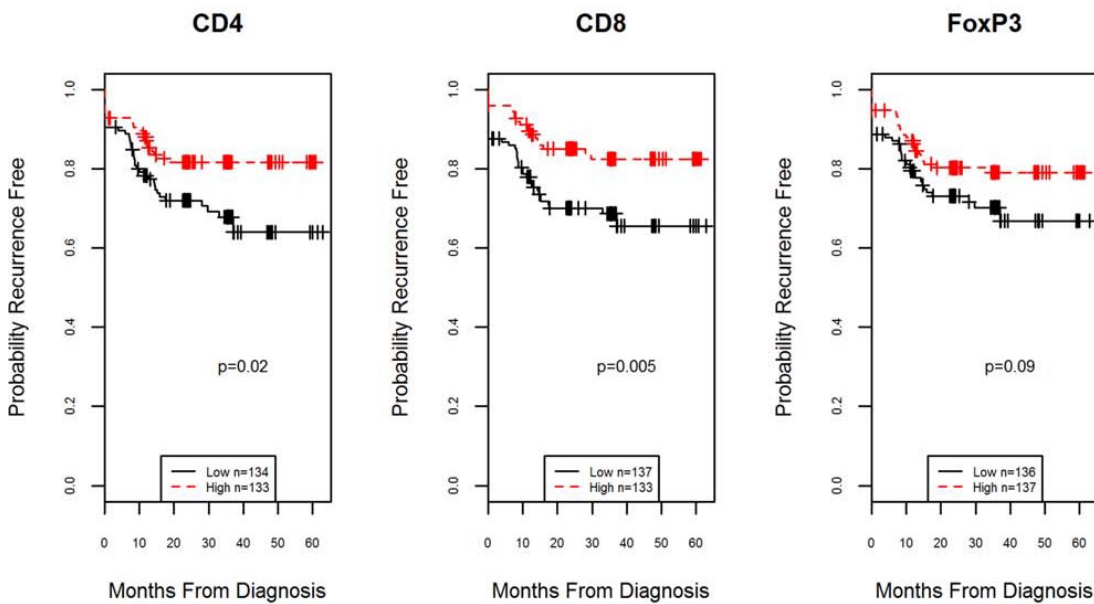
Los autores propusieron un modelo según el cual en los pacientes tratados con quimio-radioterapia, un nivel elevado de infiltración por CD8 (CD3) TIL se asoció con una mejoría significativa en el pronóstico para los tumores HPV-negativos, en tanto que para los tumores HPV-positivos el beneficio pronóstico fue moderado. En contraste, los pacientes con un nivel de CD8 (CD3) TIL bajo contaron con mal pronóstico, independientemente del estatus HPV<sup>(25)</sup>.



**Figura 7.** Modelo presentado donde se observa el pronóstico según la infiltración CD8 y el status HPV (tomada de Balermipas<sup>25</sup>).

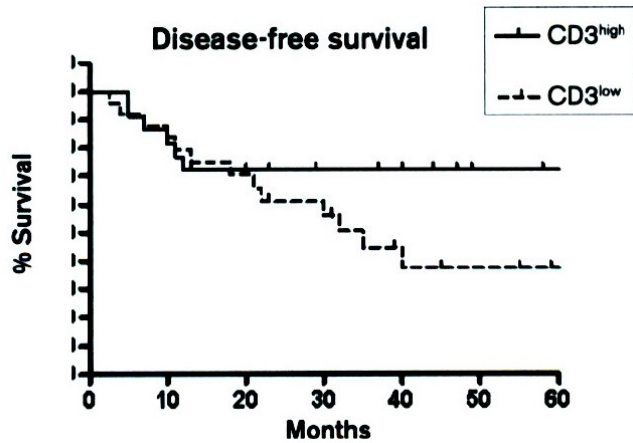
Nguyen y cols<sup>(26)</sup> realizaron un estudio a partir de un *tissue array* con muestras de 278 pacientes con CECC que recibieron un tratamiento quirúrgico (59.3%) o no quirúrgico (40.7%), analizando mediante inmunohistoquímica el grado de TIL de LT helper (CD4+), LT citotóxicos (CD8+), y LT reguladores (FoxP3+). Existió un elevado nivel de correlación entre los valores de TIL correspondientes a los diferentes subtipos celulares analizados. Al evaluar de forma independiente los tumores de orofaringe en función del estatus HPV, pudieron observar como los tumores HPV-positivos contaron con un grado de infiltración linfocitaria significativamente superior.

Se categorizó a los pacientes como TIL elevado o bajo en función del valor de la mediana del TIL. Los pacientes con unos niveles de infiltración linfocitaria elevada tuvieron una mejor supervivencia global, supervivencia ajustada, y supervivencia libre de recidiva. La siguiente figura muestra las curvas de supervivencia libre de recidiva en función de la categoría de TIL para cada uno de los subtipos linfocitarios analizados.



**Figura 8.** Curva de supervivencia libre de recidiva de acuerdo a los niveles de los subtipos de linfocitos, por encima (alto) o por debajo (bajo) del valor de la mediana. (tomada de Nguyen <sup>26</sup>)

Rajjoub y cols<sup>(27)</sup> fueron de los primeros autores que analizaron el significado pronóstico del TIL en pacientes con carcinomas de orofaringe considerando el estatus HPV. Los autores evaluaron 48 pacientes tratados con cirugía, de los cuales un 68.8% eran HPV-positivos. A partir de un estudio inmunohistoquímico para CD3 (LT) se clasificó a los tumores como TIL alto o bajo. La proporción de tumores con CD3 alto en los casos HPV-positivos fue del 51.5%, y para los HPV-negativos del 33.3%. Los pacientes con un grado elevado de infiltración por CD3 tuvieron una tendencia a contar con una mejor supervivencia libre de enfermedad (P=0.09).



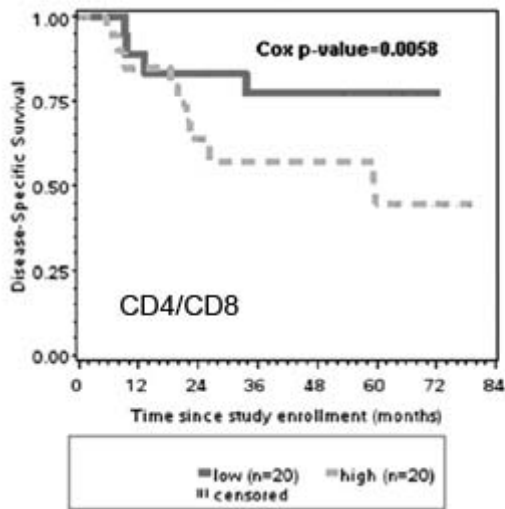
**Figura 9.** Curva de supervivencia libre de enfermedad en relación de los niveles de infiltración por CD3 (tomada de Rajjoub <sup>27</sup>)

Los autores describieron una relación intensa entre el grado de TIL y la presencia de afectación regional. El porcentaje de pacientes N+ entre aquellos que tuvieron un TIL elevado fue del 40.0% (8/20), en tanto que para los tumores con un TIL bajo fue del 88.5% (23/26) (P=0.001). Las diferencias en el grado de afectación regional en función del TIL aparecieron básicamente a expensas de los pacientes HPV-positivos.

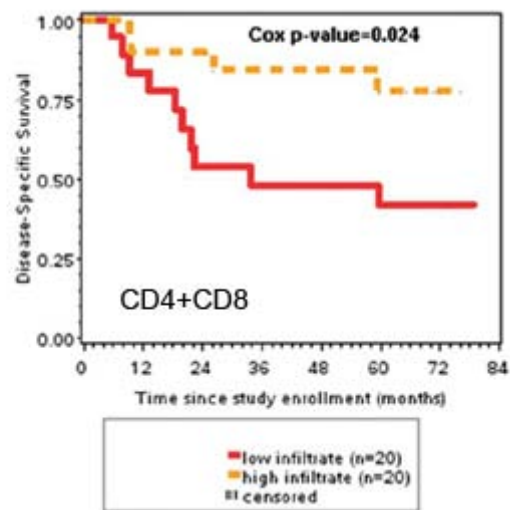
Wansom y cols<sup>(28)</sup> estudiaron pacientes con carcinomas de orofaringe en función del estatus HPV-16. Se dispuso de información referente a la infección por HPV de 38 tumores, de los cuales 25 resultaron positivos (65.7%). Los autores analizaron un total de 46 pacientes con tumores de orofaringe en estadios avanzados (III-IV) tratados con quimioterapia de inducción y cirugía o quimio-radioterapia en función de la respuesta conseguida. Se llevó a cabo una determinación inmunohistoquímica del grado de TIL con tinciones para CD4, CD8, FoxP3 y CD68 (marcador de macrófago). A diferencia de otros estudios, los autores no encontraron diferencias significativas en el infiltrado de LT en función del estatus HPV de los pacientes.

La supervivencia ajustada apareció relacionada con la relación CD4/CD8 (P=0.0058), la relación FoxP3/CD8 (P=0.0457), y la suma de CD4 y CD8 (P=0.0244). Los pacientes con un valor bajo en la relación CD4/CD8, y los pacientes con un conteo elevado en la suma de CD4+CD8 contaron con una mejor supervivencia.

A.



B.

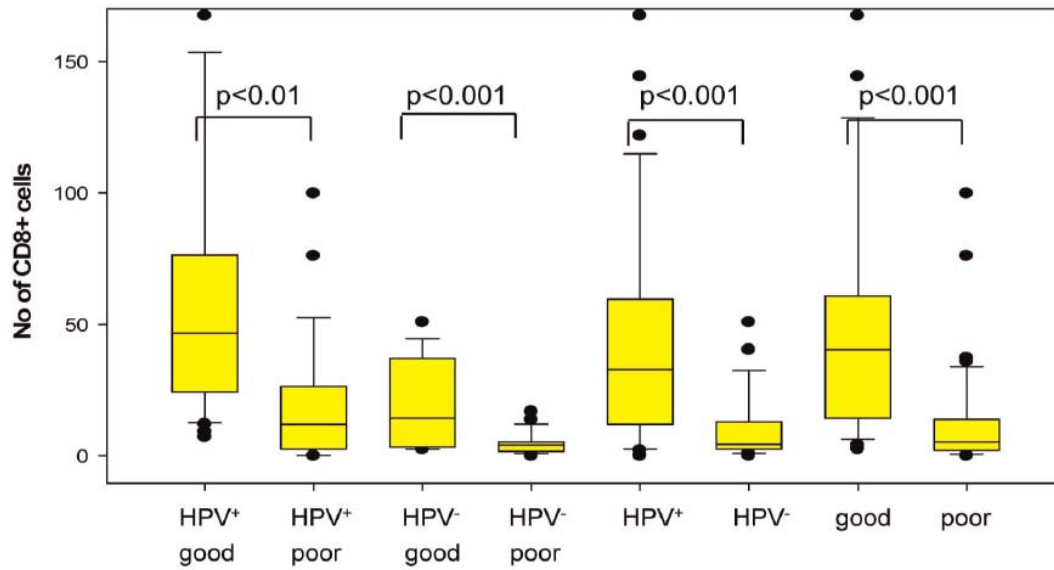


**Figura 10. A.** La supervivencia específica de la enfermedad fue significativamente superior en pacientes con un bajo ratio CD4/CD8 en comparación con un alto ratio (>mediana)( $P=0.0058$ ); **B.** La supervivencia específica de la enfermedad fue significativamente superior en pacientes con un alto CD4 y CD8 TIL en comparación con pacientes con bajo TIL (<mediana) ( $P=0.024$ ). (tomada de Wansom<sup>28</sup>)

Tras ajustar por el estatus HPV en un estudio multivariante, se pudo comprobar como los valores individuales de CD8 y FoxP3 contaban con capacidad pronóstica ( $P=0.0236$  y  $p=0.004$ , respectivamente).

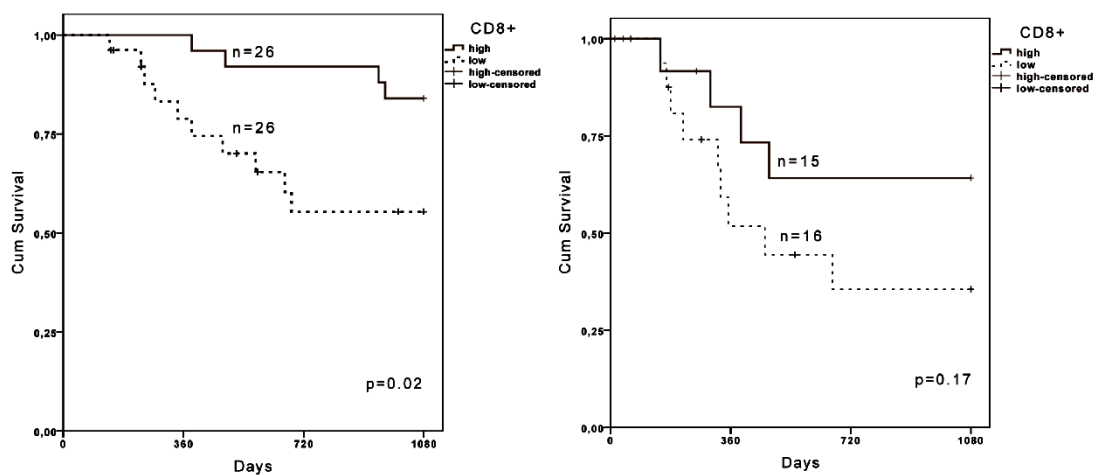
Se dispuso además de una muestra de sangre periférica de los pacientes, sin que apareciese una correlación entre el grado de infiltración por subtipos de LT a nivel del tumor y los niveles de los diferentes subtipos linfocitarios en sangre periférica.

Näsman y cols<sup>(29)</sup> analizaron 83 pacientes con carcinomas de orofaringe tratados con radioterapia o quimioradioterapia, de los cuales 52 (62.6%) eran HPV-positivos, efectuando un conteo del TIL por células CD8+ y FoxP3+. Los pacientes con un buen resultado clínico tuvieron un conteo superior de CD8+, independientemente del estatus HPV. Además, el conteo de CD8+ para los pacientes HPV-positivos fue significativamente superior.



**Figura 11.** Número de CD8+ TILs (tomada de Näsman <sup>29</sup>)

Una categorización del TIL por CD8+ a partir del valor de la mediana mostró que los pacientes con unos contajes elevados contaron con una mejor supervivencia libre de recidiva, si bien para el grupo de pacientes HPV-negativos las diferencias no alcanzaron la significación estadística.



**Figura 12.** Curva de supervivencia libre de enfermedad según el status HPV y del TIL. **A.** Pacientes HPV-positivos. **B.** Pacientes HPV-negativos. (tomada de Näsman <sup>29</sup>).



En el caso del TIL por células FoxP3+, pudo apreciarse como los tumores HPV-positivos tuvieron unos contajes significativamente superiores, sin que el valor de TIL por FoxP3 contase con capacidad pronóstica.

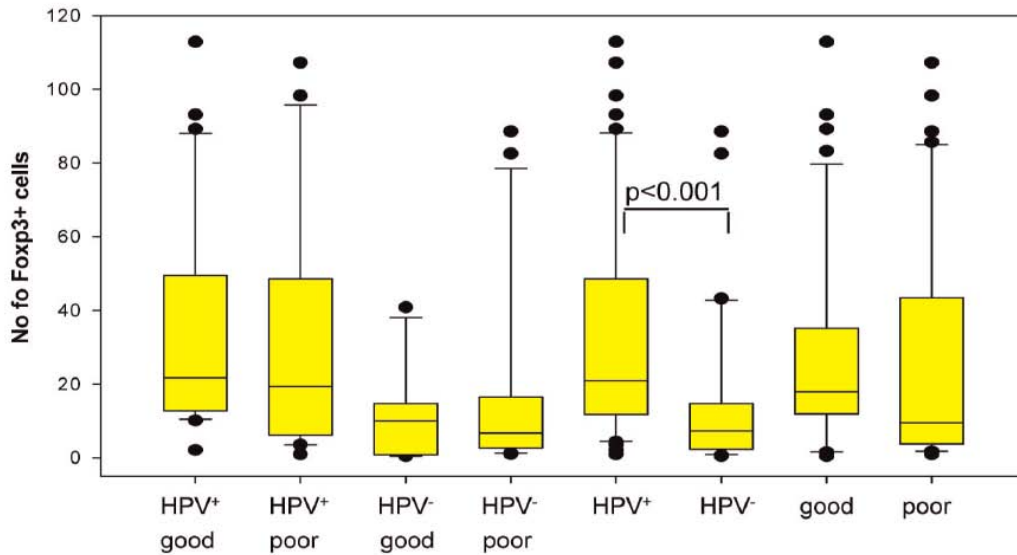


Figura 13. Número de FoxP3 TILs (tomada de Näsman <sup>29</sup>)

Se observó cómo los pacientes con unos valores más elevados de la relación CD8/FoxP3 contaron con una mejor supervivencia libre de recidiva, independientemente del estatus HPV.

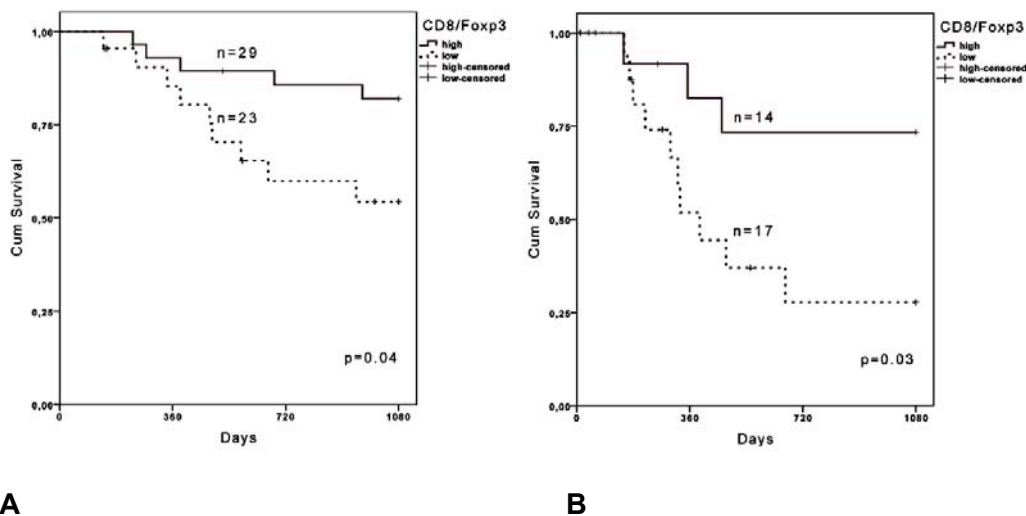


Figura 14. Curva de supervivencia libre de enfermedad según el status HPV y la relación CD8/FoxP3. **A.** Pacientes HPV-positivos; **B.** Pacientes HPV-negativos. (tomada de Näsman <sup>29</sup>).

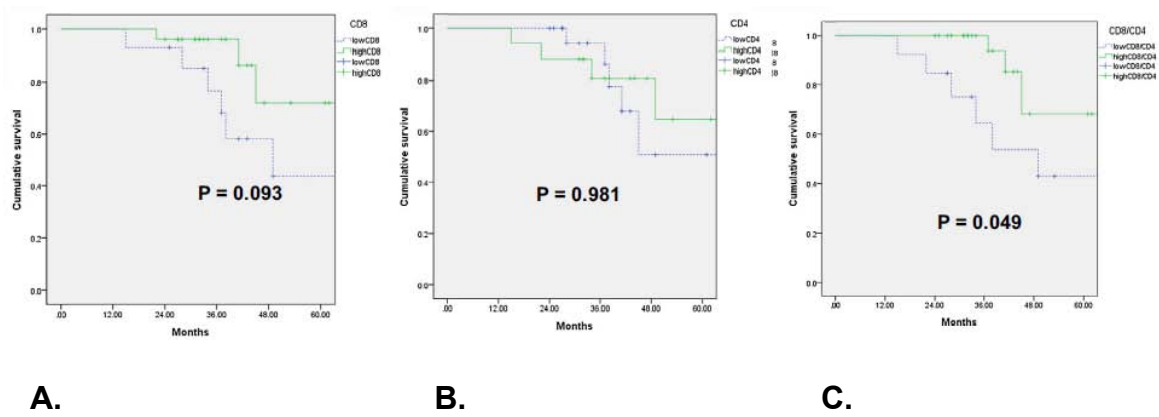
De acuerdo con el resultado de un estudio multivariante, para los pacientes HPV-positivos el nivel de TIL por células CD8+ conto con capacidad pronóstica independiente en relación a la supervivencia libre de recidiva (HR 0.28, IC 95%: 0.084-0.91, P=0.034), en tanto que para los pacientes con tumores HPV-negativos fue la relación CD8/FoxP3 la variable que se relacionó con la supervivencia (HR 0.21, IC 95%: 0.057-0.81, P=0.023).

Nordfors y cols<sup>(30)</sup> analizaron 280 pacientes con tumores de fosa amigdalalar (n=203) o base de lengua (n=77) tratados de forma preferente con radioterapia, de los cuales 220 (78.5%) fueron considerados HPV-positivos. A partir de un estudio inmunohistoquímico pudieron comprobar como los pacientes HPV-positivos contaron con CD8 y CD4 TIL significativamente superior (cifra mediana de infiltración 36.0 versus 6.2, P<0.001; y 13.3 versus 7.3, P=0.001, respectivamente). Los valores de CD8 TIL se correlacionaron de forma significativa con la supervivencia para los pacientes HPV-positivos, en tanto que para los HPV-negativos apareció sólo una tendencia según la cual los pacientes con un valor elevado de CD8 TIL contaron con un mejor pronóstico. El nivel de CD4 TIL careció de capacidad pronóstica tanto para los pacientes HPV-positivos como negativos.

A partir de estos resultados, los autores han propuesto un modelo de predicción para los pacientes con carcinomas de orofaringe HPV-positivos en el que se incluyen una serie de variables clínicas y de biomarcadores. De acuerdo con el modelo, los pacientes jóvenes, con tumores iniciales, de localización en base de lengua, con ausencia de expresión de HLA clase I, y con un conteo de CD8 TIL elevado contarían con un mejor pronóstico de la enfermedad<sup>(31)</sup>.

En otro estudio realizado en 53 pacientes con carcinomas amigdalares tratados con quimioradioterapia, de los cuales 39 (73.5%) contaron con la presencia de HPV en un estudio con PCR, Lee y cols<sup>(32)</sup> encontraron una relación entre los valores de inmunopositividad elevada de la relación CD8/CD4 y la supervivencia específica, en tanto que los valores de expresión de CD8 y CD4 no se relacionaron de forma significativa con el control de la enfermedad.

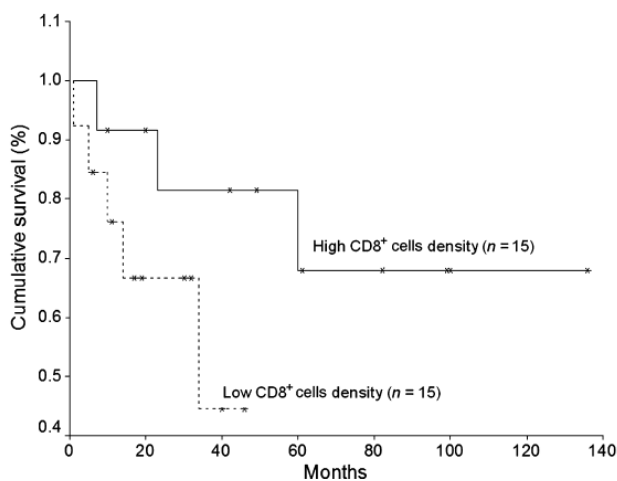
## Introducción



**Figura 15.** Curva de supervivencia específica de la enfermedad de acuerdo a los resultados de la inmunohistoquímica. **A.** Células CD8 (+); **B.** Células CD4 (+); **C.** Ratio entre células CD8 (+) y CD4 (+) (tomada de Lee <sup>32</sup>).

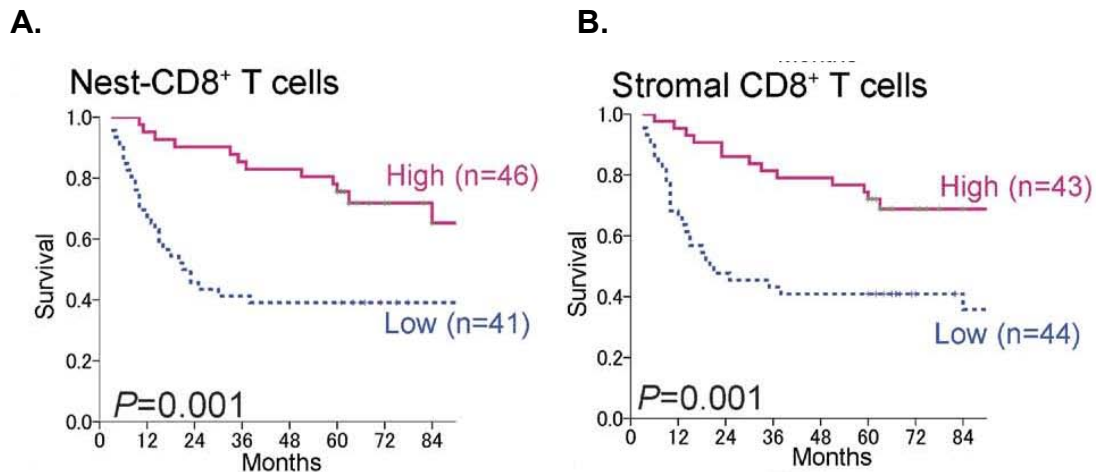
De acuerdo con los autores, más que los valores absolutos de los diferentes subtipos celulares, el elemento más relacionado con la respuesta del tumor al tratamiento sería la prevalencia relativa de estos subtipos.

Otros autores han analizado el significado pronóstico del TIL de forma específica en pacientes con tumores localizados en la cavidad oral. En un estudio inmunohistoquímico realizado en pacientes con tumores de cavidad oral tratados de forma quirúrgica (n=70), Zancope y cols<sup>(33)</sup> encontraron una correlación inversa entre el grado de infiltración por CD8+ y el índice mitótico, y para los pacientes con tumores localmente avanzados (T3-T4) apareció una tendencia de acuerdo con la cual la densidad de células CD8+ se relacionó con una mejor supervivencia.



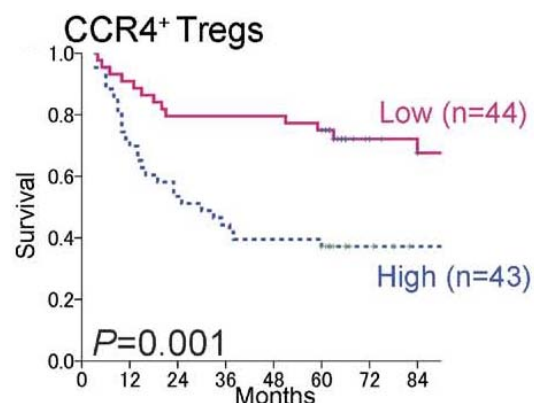
**Figura 16.** Curva de supervivencia de acuerdo a la densidad de células CD8+ (tomada de Zancope <sup>33</sup>).

En otro estudio inmunohistoquímico en pacientes con carcinomas de cavidad oral tratados de forma quirúrgica (n=87), Watanabe y cols<sup>(34)</sup> encontraron igualmente una relación entre el grado de infiltración por células CD8+ tanto a nivel del tumor como del estroma peritumoral y la supervivencia global.



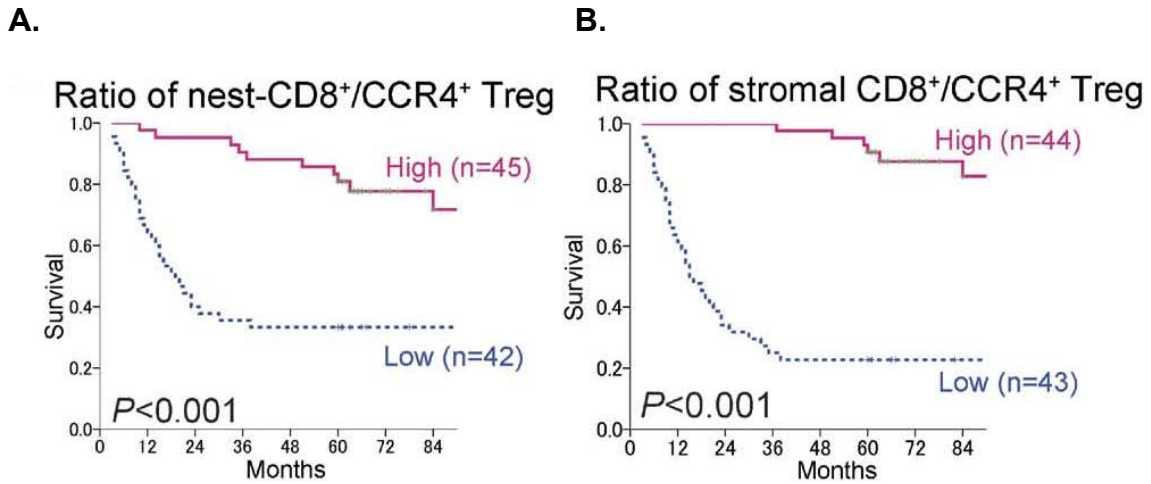
**Figura 17.** Curva de supervivencia y grado de infiltración por células CD8+. **A.** Tumor. **B.** Estroma tumoral (tomada de Watanabe<sup>34</sup>).

Además, encontraron como los pacientes con un nivel de infiltración inferior por LT reguladores (CCR4+), con capacidad de producir IL-10 y TGF- $\beta$ , tuvieron un mejor control de la enfermedad (ver figura 18).



**Figura 18.** Curva de supervivencia en función de CCR4+ (tomada por Watanabe<sup>34</sup>).

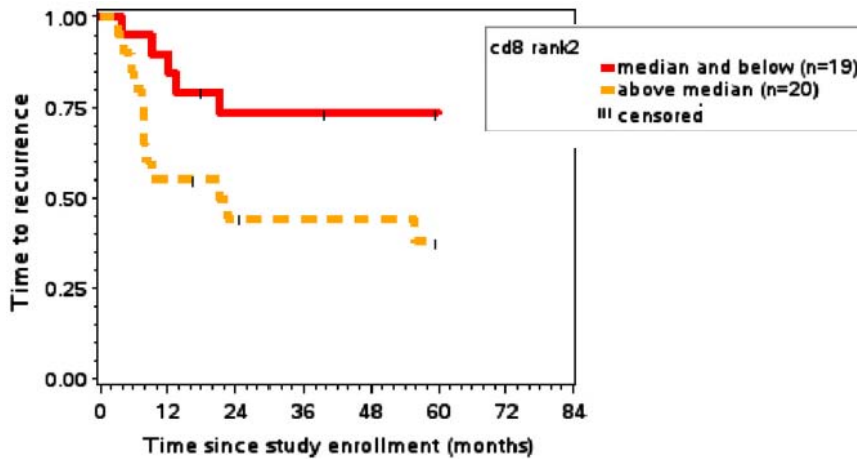
Finalmente, el parámetro que contó con una mejor capacidad pronóstica fue la relación CD8+/CCR4+, tal como muestran las siguientes figuras.



**Figura 19.** Curva de supervivencia según relación CD8+/CCR4+. (A) Tumor; (B) Estroma tumoral (tomada de Watanabe<sup>34</sup>).

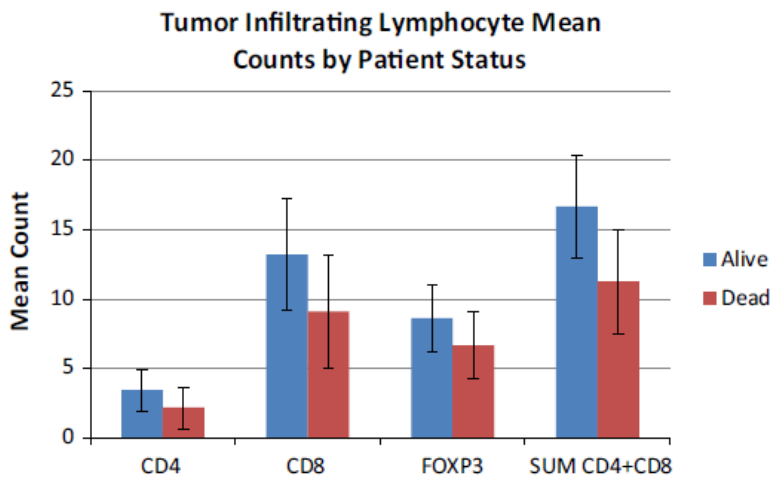
De acuerdo con los resultados de un análisis multivariante, la mortalidad para los pacientes con un valor bajo del cociente CD8+estromal/CCR4+ fue significativamente superior que para los pacientes con un valor elevado (HR 11.0, IC 95%: 4.6-28.0, P<0.001).

Por su parte, Wolf y cols<sup>(35)</sup> estudiaron 39 pacientes con carcinomas de cavidad oral tratados de forma quirúrgica, alcanzando unos resultados opuestos a los obtenidos en la mayoría de los estudios analizados. A partir de un estudio inmunohistoquímico pudieron observar como los pacientes con tumores con niveles de infiltración más elevados de células CD8+ contaron con una tendencia a un incremento en el riesgo de recidiva (P=0.05).



**Figura 20.** Intervalo libre de enfermedad según el grado de infiltración tumoral de células CD8 +. (tomada de Wolf <sup>35</sup>).

Sin embargo, la media de TIL para los LT CD4+, CD8+ y FoxP3+, así como la suma de CD4+ y CD8+ tendió a ser superior en los pacientes supervivientes.

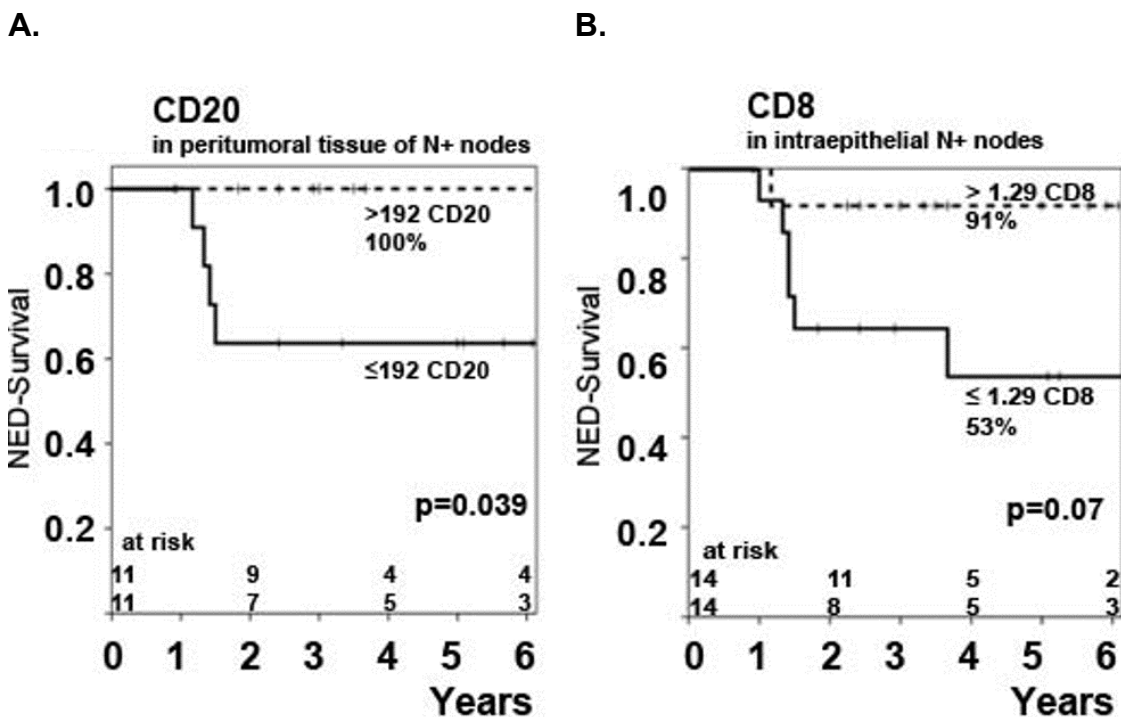


**Figura 21.** Media de TIL para CD4+, CD8+, FoxP3+ y suma de CD4+ + CD8+, según status del paciente (tomada de Wolf <sup>35</sup>).

Distel y cols<sup>(36)</sup> analizaron la relación del TIL con el control de la enfermedad en función del tipo de tratamiento y del estadio del tumor. Los autores analizaron dos cohortes de pacientes con carcinomas de oro-hipofaringe: 62 pacientes con tumores iniciales de bajo riesgo (T1-2N0) tratados con cirugía, y 53 pacientes con tumores avanzados de alto riesgo (T3-4N2-3) tratados con quimio-radioterapia. A partir de un estudio inmunohistoquímico pudieron

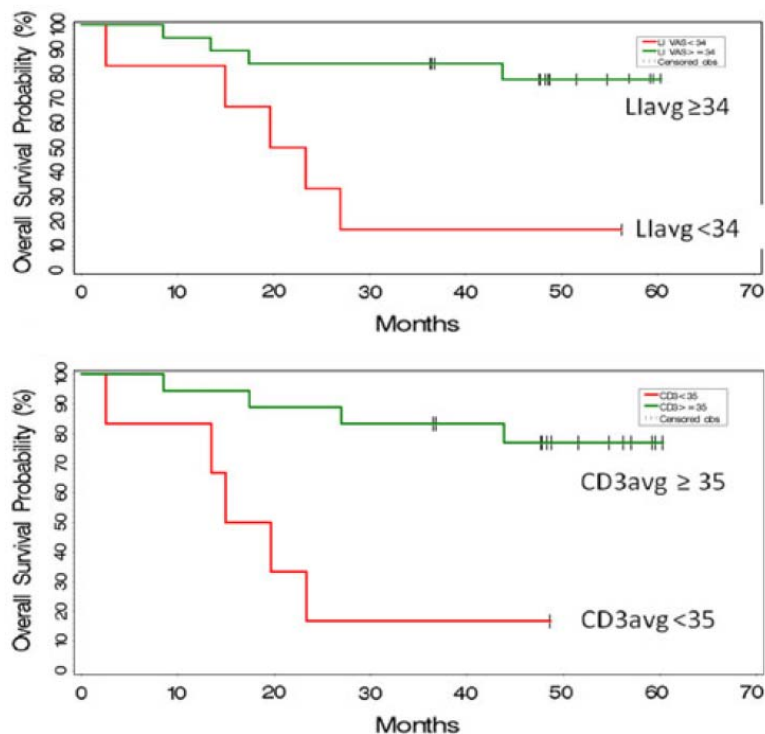
observar como los TIL CD8 y CD20 se relacionaron con la supervivencia libre de enfermedad en el grupo de bajo riesgo, de manera que un incremento en el grado de infiltración linfocitaria se asoció con un mejor pronóstico.

Además de existir una relación entre el grado de infiltración linfocitaria del tumor y el control de la enfermedad, Pretscher y cols<sup>(37)</sup> describieron como el nivel de TIL en las adenopatías metastásicas también se correlacionaba con el pronóstico. Los autores analizaron un total de 33 pacientes con tumores de orohipofaringe tratados quirúrgicamente, 31 de los cuales contaron con metástasis ganglionares. El nivel de CD8 TIL fue significativamente superior en los ganglios no tumorales ( $P=0.022$ ). Utilizando la mediana como punto de corte para la categorización de los tumores, los pacientes con un CD8 o CD20 TIL elevado en las adenopatías metastásicas tuvieron una mejor supervivencia libre de enfermedad, tal como aparece en la siguiente figura.



**Figura 22.** Impacto del CD20+ TIL en el tejido linfático peritumoral (A); Impacto del CD8+ TIL en las adenopatías metastásicas (B) (tomada de Pretscher<sup>37</sup>).

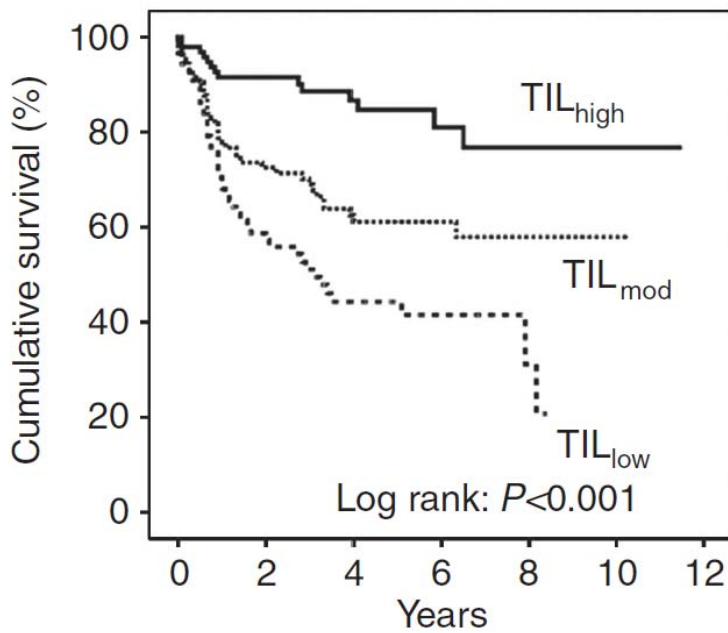
Una mayoría de los trabajos en los que se relaciona el grado de TIL con el control de la enfermedad se han realizado a partir de estudios inmunohistoquímicos que tiñen de forma específica una determinada población linfocitaria. Sin embargo, algunos autores han determinado el grado de infiltración linfocitaria de los tumores a partir de la valoración de preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina (H&E), alcanzando unas conclusiones similares a las obtenidas con los estudios inmunohistoquímicos. Beristein y cols<sup>(38)</sup> presentaron los resultados obtenidos en un estudio en el que se utilizó un régimen de inmunoterapia basado en la inyección peritumoral de un compuesto rico en citoquinas, especialmente de IL-2, en una cohorte de 25 pacientes con CECC tratados de forma quirúrgica. Se llevó a cabo una evaluación del TIL en las piezas de resección realizando en contaje de linfocitos en H&E y con inmunohistoquímica. Los autores comunicaron como los pacientes con un TIL elevado, tanto considerando el contaje realizado con H&E como el de células CD3+ (linfocitos T), contaron con una mejor supervivencia.



**Figura 23.** Curva de supervivencia global según los niveles de TIL evaluado a través de H&E o IHC (tomada de Beristein<sup>38</sup>).

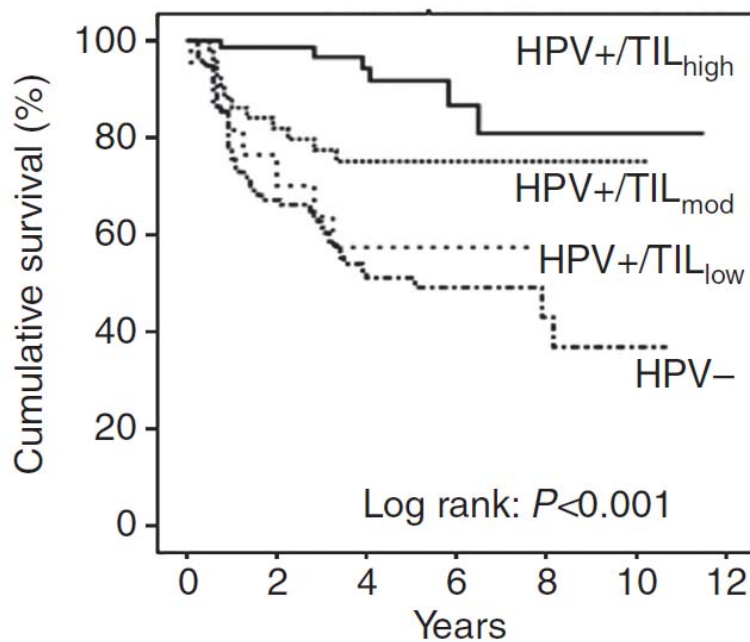


Ward y cols<sup>(39)</sup> también evaluaron el TIL a partir de un conteo de linfocitos con una tinción de H&E. Los autores analizaron un total de 274 pacientes con carcinomas de orofaringe, 149 (54.4%) de los cuales eran HPV-positivos. Se categorizó el grado de TIL en bajo, moderado o alto. Los pacientes con tumores HPV-positivos contaron con unos niveles de TIL significativamente superiores que los HPV-negativos ( $P < 0.001$ ). El porcentaje de pacientes con un nivel de TIL alto, moderado o bajo para los pacientes HPV-positivos fue del 49%, 36% y 15%, respectivamente, en tanto que para los pacientes HPV-negativos fue del 16%, 38% y 46%. El grado de TIL se relacionó de forma significativa con la supervivencia, tal como aparece en la siguiente figura.



**Figura 24.** Curva de supervivencia según grado de TIL (tomada de Ward<sup>39</sup>).

Al considerar sólo a los pacientes HPV-positivos, el grado de TIL mantuvo una capacidad de discriminar el pronóstico de los pacientes.

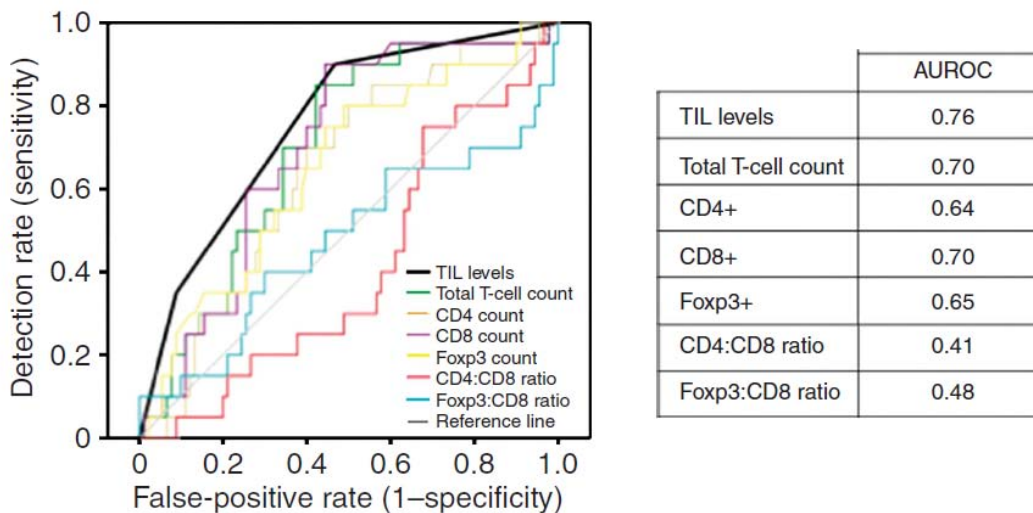


**Figura 25.** Curva de supervivencia según grado de TIL y status HPV (tomada de Ward<sup>39</sup>).

De acuerdo con los resultados de un análisis multivariante, tanto el estatus HPV como el TIL mantuvieron su capacidad pronóstica. Considerando la supervivencia ajustada como la variable dependiente, y los pacientes con un TIL bajo como categoría de referencia, los pacientes con un TIL moderado tuvieron un HR de 0.66 (IC 95%: 0.39-1.13,  $P=0.13$ ), y los pacientes con un TIL elevado de 0.28 (IC 95%: 0.13-0.62,  $P=0.002$ ). En relación a los pacientes HPV-negativos, los HPV-positivos tuvieron un HR de 0.45 (IC 95%: 0.26-0.79,  $P=0.005$ ). Al considerar de forma aislada a los pacientes HPV-positivos, considerando los pacientes con TIL alto como categoría de referencia, el HR para los pacientes con TIL moderado fue de 2.47 (IC 95%: 0.72-8.50,  $P=0.15$ ), y para los de TIL bajo de 4.86 (IC 95%: 1.34-17.60,  $P=0.02$ ). En el caso de los pacientes con tumores HPV-negativos el valor de TIL no contó con una capacidad pronóstica significativa. En relación a los pacientes con TIL elevado, los de TIL moderado tuvieron un HR de 1.59 (IC 95%: 0.54-4.71,  $P=0.40$ ), y los de TIL bajo de 2.11 (IC 95%: 0.73-6.16,  $P=0.17$ ).

Para los pacientes con tumores HPV-positivos las variables con una mayor capacidad pronóstica fueron el TIL, seguida por el consumo de tabaco y la categoría de extensión local del tumor. Para los pacientes con tumores HPV-negativos lo fueron la edad, el estadio y el grado de diferenciación tumoral.

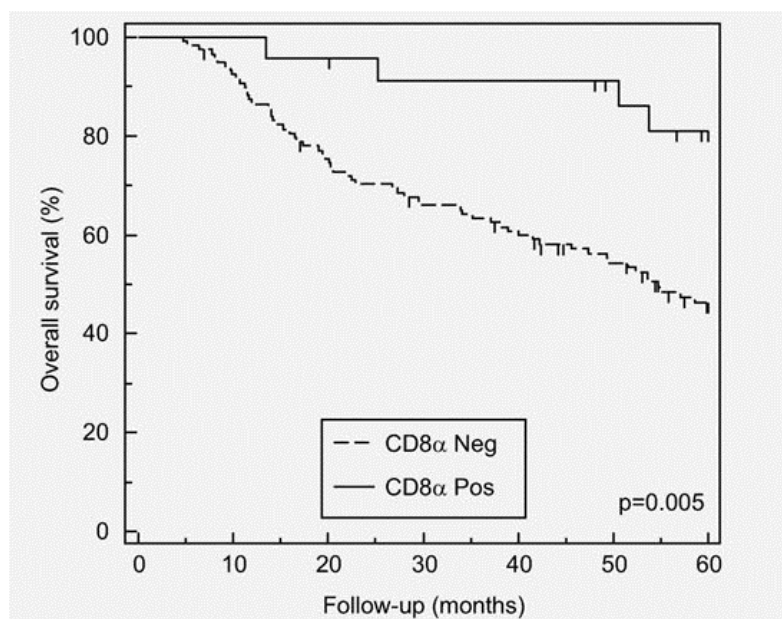
A partir de un estudio inmunohistoquímico, los autores llevaron a cabo además una cuantificación de la infiltración por LT (CD3+) y diferentes subtipos de LT (CD4+, CD8+, FoxP3+). La cuantificación inmunohistoquímica no mejoró la capacidad pronóstica del conteo de TIL obtenido con H&E.



**Figura 26.** Cuantificación inmunohistoquímica de la infiltración por LT (CD3+) y diferentes subtipos de LT (CD4+, CD8+, FoxP3+) (tomada de Ward <sup>39</sup>).

Tal como hemos venido exponiendo, la práctica totalidad de estudios que han analizado el TIL en muestras de tumores de cabeza y cuello lo han hecho a partir de estudios inmunohistoquímicos o valorando el grado de infiltración linfocitaria en preparaciones teñidas con H&E. Jung y cols<sup>(40)</sup> llevaron a cabo un estudio en que se analizó el grado de infiltración por parte de diferentes subpoblaciones linfocitarias a partir de un análisis de expresión transcripcional .

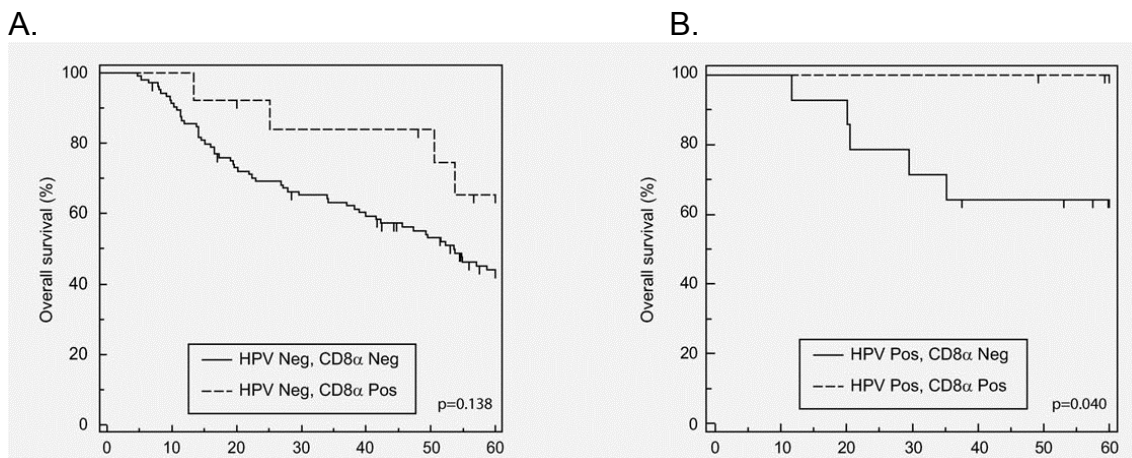
Los autores estudiaron una cohorte de 144 pacientes con carcinomas de orofaringe tratados con cirugía y radioterapia o quimiorradioterapia postoperatoria, de los cuales 24 (16.6%) eran HPV-positivos. En un estudio inmunohistoquímico realizado en 10 tumores HPV-positivos y 7 HPV-negativos, se pudo observar como el número de células CD3+ y CD4+, así como la intensidad de tinción fueron superiores en los tumores HPV-positivos. Igualmente, los tumores HPV-positivos contaron con una expresión transcripcional de CD3, CD4 y CD8 analizada mediante RT-PCR significativamente superior a la de los tumores HPV-negativos. A partir de la expresión transcripcional de CD8, se clasificó a los pacientes como CD8-positivos o negativos. El 10% de los pacientes HPV-negativos fue considerado como CD8-positivo, frente a un 42% de los pacientes HPV-positivos ( $P=0.0006$ ). Además, apareció una buena correlación entre la categoría transcripcional de CD8 y el número células positivas en la valoración inmunohistoquímica. Los pacientes con una categoría de expresión transcripcional de CD8-positiva contaron con una mejor supervivencia global.



**Figura 27.** Curva de supervivencia global según categoría de expresión transcripcional CD8 (tomada de Jung <sup>40</sup>).

En un estudio multivariante la expresión transcripcional de CD8 mantuvo su capacidad pronóstica. Los pacientes CD8-positivos contaron con una mejor supervivencia global que los CD8-negativos (HR 0.27, IC 95%: 0.10-0.73,

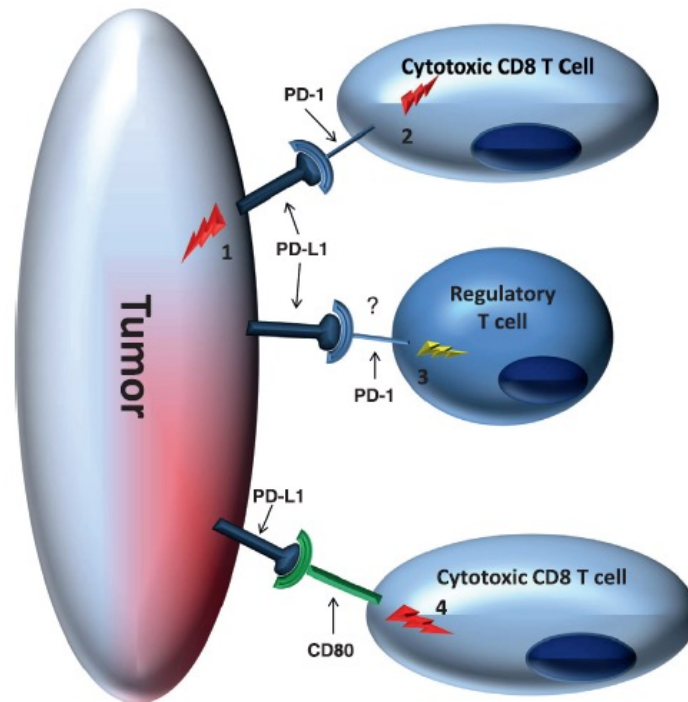
P=0.011). Para los pacientes HPV-negativos, la expresión transcripcional de CD8 perdió parte de su capacidad pronóstica, en tanto que se mantuvo de forma aumentada para los pacientes con tumores HPV-positivos.



**Figura 28.** Curva de supervivencia global según categoría de expresión CD8 y status HPV. (A) HPV-negativos; (B) HPV positivos (tomada de Jung<sup>40</sup>).

Igualmente, apareció una tendencia de acuerdo con la cual los pacientes con una expresión transcripcional elevada de CD3 contaron con un mejor pronóstico.

Uno de los mecanismos a través de los cuales las células tumorales cuentan con la capacidad de evadir la vigilancia del sistema inmune es a través de la expresión de ligandos del programmed death 1 (PD-1) receptor, que se encuentra expresado en los LT activados. La activación del LT depende de la unión del receptor celular T (TCR) con un antígeno adecuado, presentado por proteínas del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC). La unión TCR/MHC está regulada por la actividad de receptores con actividad estimuladora y represora. Entre estos últimos, el receptor PD-1 es una proteína transmembrana tipo I que se encuentra en los LT CD4 y CD8, y promueve su desactivación a partir de su unión con su ligando PD-L1 o PD-L2, expresados por la célula diana<sup>(14)</sup>.



**Figura 29.** Actividad del receptor PD-1 (tomada de Zandberg <sup>14</sup>).

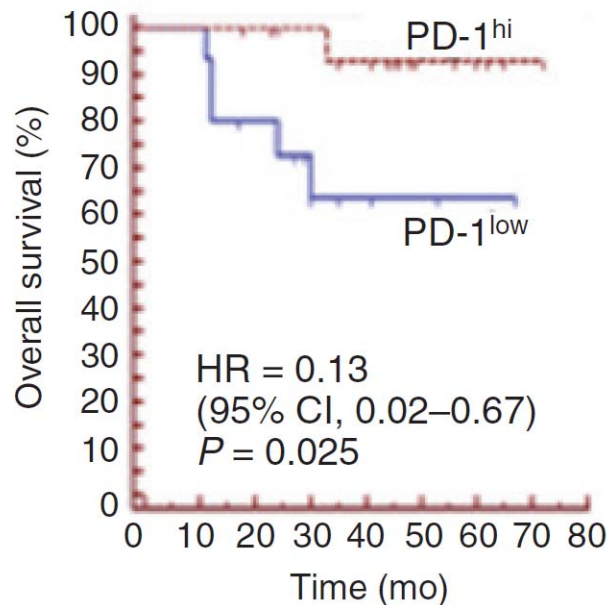
La expresión de PD-L1 por parte de las células tumorales se ha relacionado con un incremento en la agresividad tumoral y una disminución en la supervivencia en algunos modelos de tumor<sup>(41, 42)</sup>.

Cho y cols<sup>(43)</sup> estudiaron la relación entre la expresión de PD-L1 en 45 tumores de cavidad oral tratados de forma quirúrgica y el TIL. Observaron una positividad inmunohistoquímica frente a PD-L1 a nivel tumoral en el 87%, con una positividad en los fibroblastos asociados al tumor en el 40%. Se pudo apreciar como la densidad de CD8 TIL se correlacionó de forma inversa con el grado de expresión de PD-L1 a nivel del tumor. EL TIL dependió básicamente de células CD8, que aparecieron tanto a nivel peri como intratumoral, en tanto que las células CD4, más escasas, aparecieron de forma preferente a nivel peritumoral. No se apreció una relación significativa entre los niveles de CD8 o CD4 TIL y la supervivencia.

Badoual y cols<sup>(44)</sup> analizaron un grupo de 62 muestras de pacientes con CECC, de los cuales 30 eran HPV-positivos. Un 51.1% de los tumores expresaron de forma significativa PD-L1 en un análisis inmunohistoquímico. Los tumores HPV-

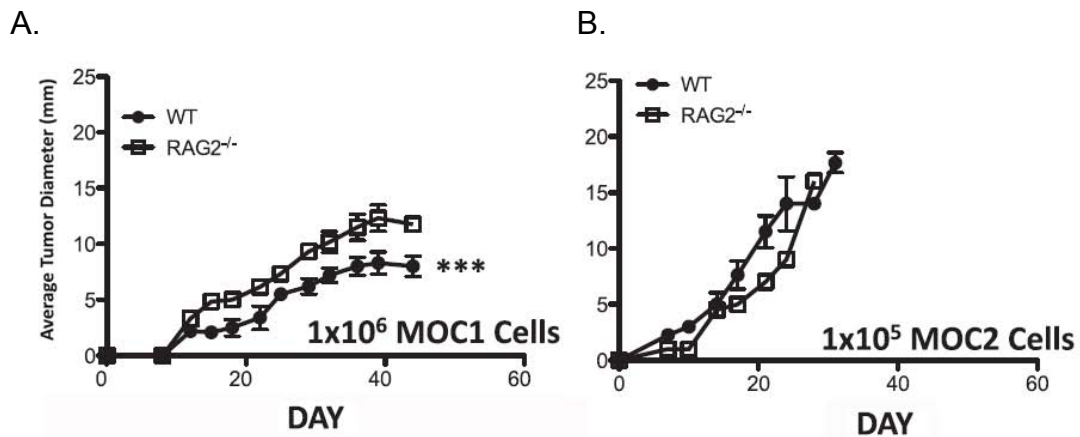


positivos tuvieron una mayor infiltración de LT CD8 y CD4, así como una mayor proporción de LT PD-1<sup>+</sup>. Se pudo observar como los pacientes HPV-positivos con un mayor número de LT PD-1<sup>+</sup> tuvieron una mejor supervivencia.



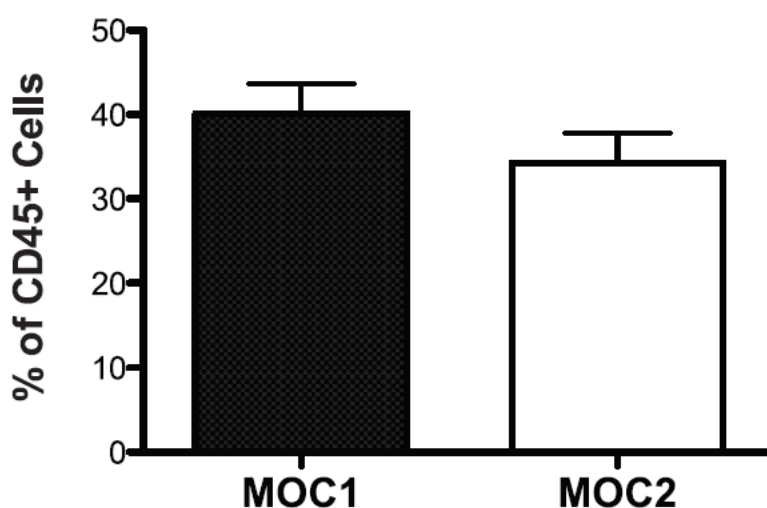
**Figura 30.** Curva de supervivencia global según proporción LT PD-1 (tomada de Badoual<sup>44</sup>).

Es muy limitado el número de estudios preclínicos realizados en modelos murinos inmunocompetentes que permitan evaluar la respuesta inmune en implantes de CECC. La mayoría de estudios se realizan con implantes heterotópicos que simulan el crecimiento local y la capacidad de diseminación, pero requieren huéspedes inmunodeprimidos con ausencia de componentes de la inmunidad adaptativa<sup>(45, 46)</sup>. Judd y cols<sup>(47)</sup> realizaron un estudio en el que compararon la capacidad de infiltración de dos líneas celulares de CECC, una poco agresiva (MOC1) y otra con un elevado potencial de invasividad (MOC2) en ratones inmunocompetentes (WT) e inmunodeprimidos (RAG2<sup>-/-</sup>). Se pudo comprobar como el crecimiento de la línea agresiva fue significativamente más rápido, sin que se produjeran diferencias significativas en la proliferación celular para la línea agresiva MOC2 en función del estado de inmunocompetencia del huésped, en tanto que para la línea MOC1 el crecimiento en los ratones inmunocompetentes (WT) fue significativamente inferior.



**Figura 31.** Se compara el crecimiento tumoral según el estado inmune. **A.** Línea celular de CECC poco agresiva; **B.** Línea celular de CECC agresiva (tomada de Judd<sup>47</sup>).

Pudo comprobarse cómo existían diferencias en la expresión de los antígenos de histocompatibilidad clase I entre las células MOC1 y MOC2 que se correlacionaron con el crecimiento tumoral. Al analizar el microambiente tumoral de los tumores derivados de las dos líneas celulares, se constató como los tumores de MOC1 contaban con una mayor proporción de células CD45+, y como los tumores derivados de MOC1 contaron con un incremento en la expresión de linfocitos T CD8+ y una disminución en CD4+ en comparación con los tumores derivados de la línea más agresiva MOC2.



**Figura 32.** Proporción de células CD45+ en cada línea celular (MOC1: poco agresiva; MOC2: agresiva) (tomada de Judd<sup>47</sup>).



## *Introducción*

De acuerdo con los autores, el comportamiento menos agresivo de los tumores MOC1 podría estar relacionado con el incremento en la presencia de linfocitos citotóxicos CD8+, o la disminución de CD4+.

En los tumores derivados de MOC2 se comprobó como el infiltrado de células CD4+ aparecía de forma precoz y no se modificaba de forma sustancial a lo largo del periodo de crecimiento del tumor. En un análisis por citometría se observó que un porcentaje elevado de células CD4+ contaban con positividad frente a FoxP3, lo que las caracterizaba como T reguladoras. La instauración de un régimen que indujo la depleción de estas células T reguladoras condujo a una disminución significativa en la proliferación de las células MOC2.

## **Proteína CD45**

### - Generalidades.

Las primeras referencias sobre CD45 fueron realizadas en el año 1989 por Matt Thomas<sup>(48)</sup> y más adelante en el año 1994 por Trowbridge y Thomas<sup>(48, 49)</sup>.

La CD45, también conocida como antígeno leucocitario común, es una glicoproteína transmembrana con un peso molecular de 180-220 kD<sup>(50)</sup>. Pertenece a la familia de glicoproteínas de alto peso molecular y se expresa con diferentes isoformas en todas las células nucleadas del sistema hematopoyético. Posee actividad tirosin-fosfatasa. Esta actividad es esencial en la regulación de la fosforilación, estando implicado en la transducción de la señal mediada por el receptor específico de antígeno en los linfocitos (TCR y BCR), IgEFcRI, en la adhesión mediada por integrinas, y puede desfosforilar también las cinasas Janus que intervienen en la señalización de los receptores de citosinas<sup>(50, 51)</sup>.

### - Estructura.

La CD45 es una de las glicoproteínas más abundantes en la membrana de los linfocitos, pudiendo ocupar hasta un 10% de toda el área de superficie de la célula. Posee un dominio extracelular con 400-500 aminoácidos (dependiendo de la isoforma), un porción transmembrana simple con 22 aminoácidos y un dominio citoplasmático con 705 aminoácidos<sup>(48, 49)</sup>. El dominio extracelular está altamente glicosilado y el dominio citoplasmático consta de una estructura en forma de cuña seguida de una estructura en tándem: los dominios PTP (D1 y D2, de los cuales sólo D1 es enzimáticamente activo), y un aminoácido 79 C-terminal. Se cree que D2 es necesario para la estabilidad de CD45<sup>(50)</sup>. La región citoplasmática comparte un 95% de homología entre todos los mamíferos, sin embargo, el dominio extracelular es solo un 35% homólogo<sup>(52)</sup>.

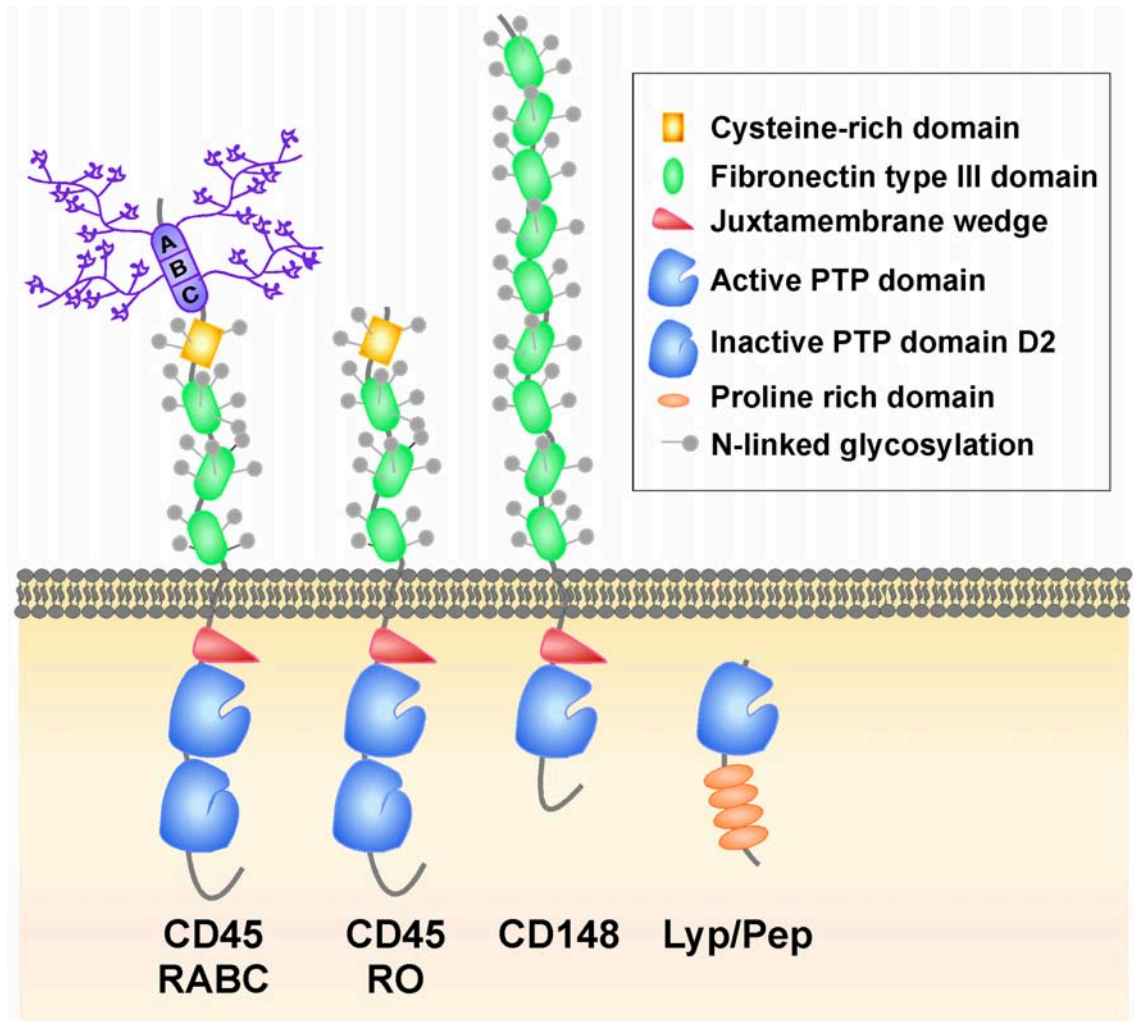


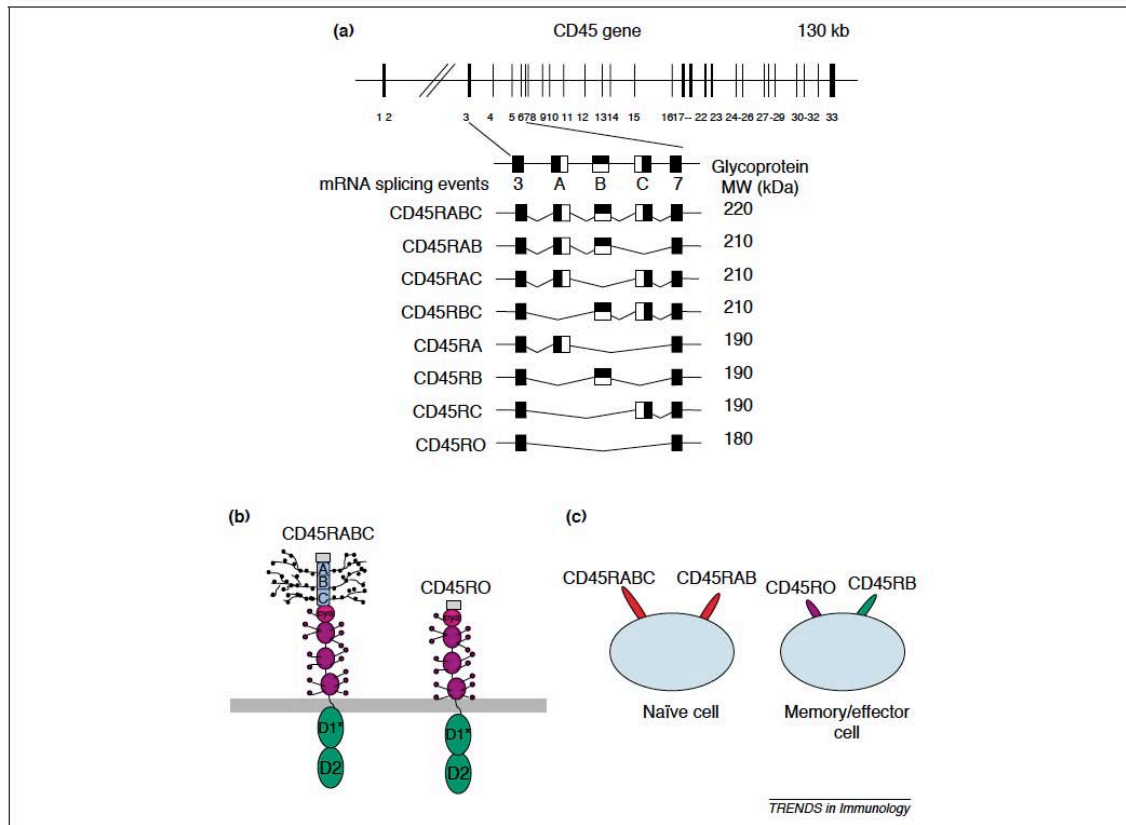
Figura 33. Estructura CD45 (tomada de Hermiston <sup>54</sup>).

- Expresión de CD45.

El gen que codifica la molécula CD45 se localiza en 1q31-q32. Esta molécula presenta al menos 8 isoformas producidas por el splicing alternativo de 3 de sus 34 exones, los exones 4, 5 y 6 que codifican múltiples sitios de glicosilación en su dominio extracelular<sup>(53)</sup>.

Las dos isoformas de la CD45 de mayor importancia son CD45 RO y CD45 RA. La isoforma CD45RA es la isoforma de mayor peso molecular, puesto que conserva la expresión de los 3 exones, y se presenta en los linfocitos T circulantes, siendo reconocida por anticuerpos monoclonales anti-CD45RA. La otra isoforma, la CD45RO, es la forma de menor peso molecular, ya que carece de los 3 exones, y está menos glicosilada. Esta isoforma de CD45 se expresa

en los linfocitos T circulantes tras la activación y se asocia con la adquisición de memoria inmunológica (célula T de memoria)<sup>(54)</sup>.



**Figura 34.** Gen que codifica la CD45. Isoformas (tomada de Tchilian <sup>66</sup>)

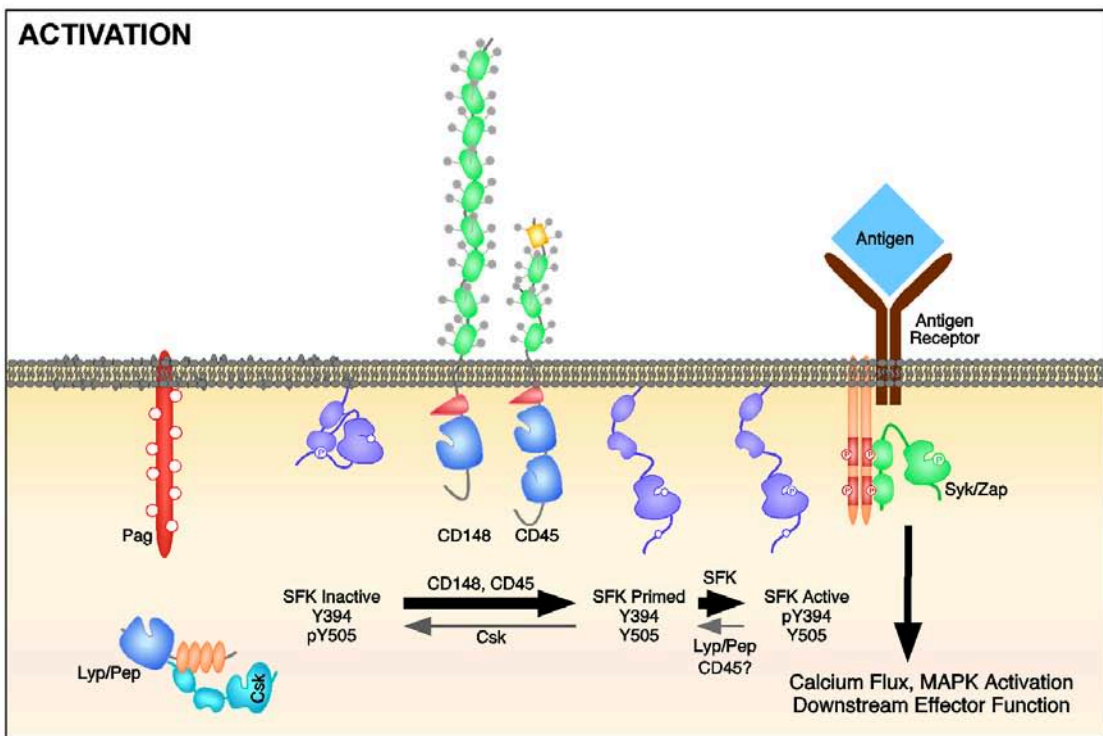
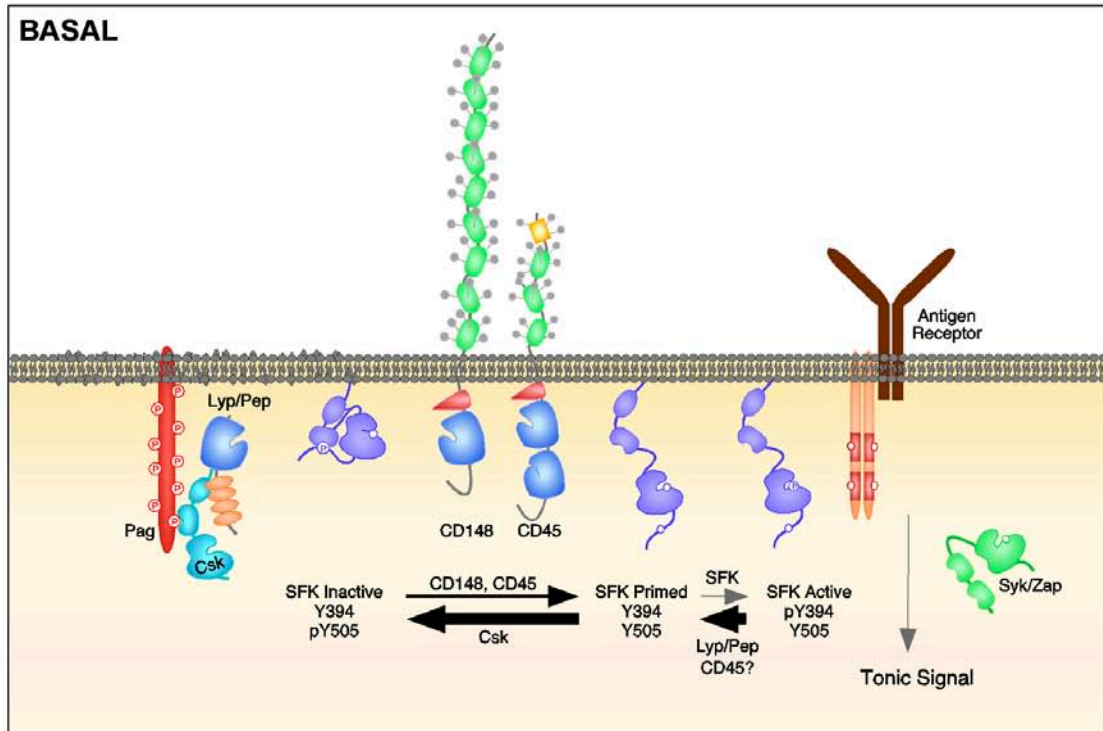
#### - Función de CD45 en las células T.

Los estudios que emplean líneas de células deficientes en CD45 identificaron inicialmente a CD45 como un regulador positivo de la señalización del receptor de antígeno en los linfocitos.

La unión del receptor de células T (TCR) y el péptido antígeno presentado por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) inicia una cascada de transducción de señales que en última instancia conduce a la activación del linfocito T. Uno de los primeros acontecimientos es la activación de una familia de proteínas tirosin- cinasas (SFK). Estas tirosin-cinasas fosforilan los inmunoreceptores presentes en las subunidades del TCR. El resultado en el

aumento de la actividad es la fosforilación de numerosas proteínas y enzimas que facilitan la estimulación de las vías de señalización corriente abajo, culminando en la activación de células T con la transcripción de nuevos genes, reorganización del citoesqueleto, la producción de citoquinas y la proliferación. Los miembros de la familia Src (SFK) son el sustrato primario para CD45 y son responsables de la iniciación de la respuesta inmune en las células T y B. En los linfocitos T existen 2 miembros identificados: Lck y Fyn<sup>(55)</sup>. Lck es único en su asociación no covalente con los correceptores CD4 y CD8. Debido a su posición proximal en la transducción de señal de TCR y la activación rápida del TCR, la modulación de la actividad de SFK representa un punto crítico de regulación en las células T<sup>(50, 56, 57)</sup>.

La evidencia actual resalta el papel de CD45 como un regulador predominantemente positivo de la SFKs.



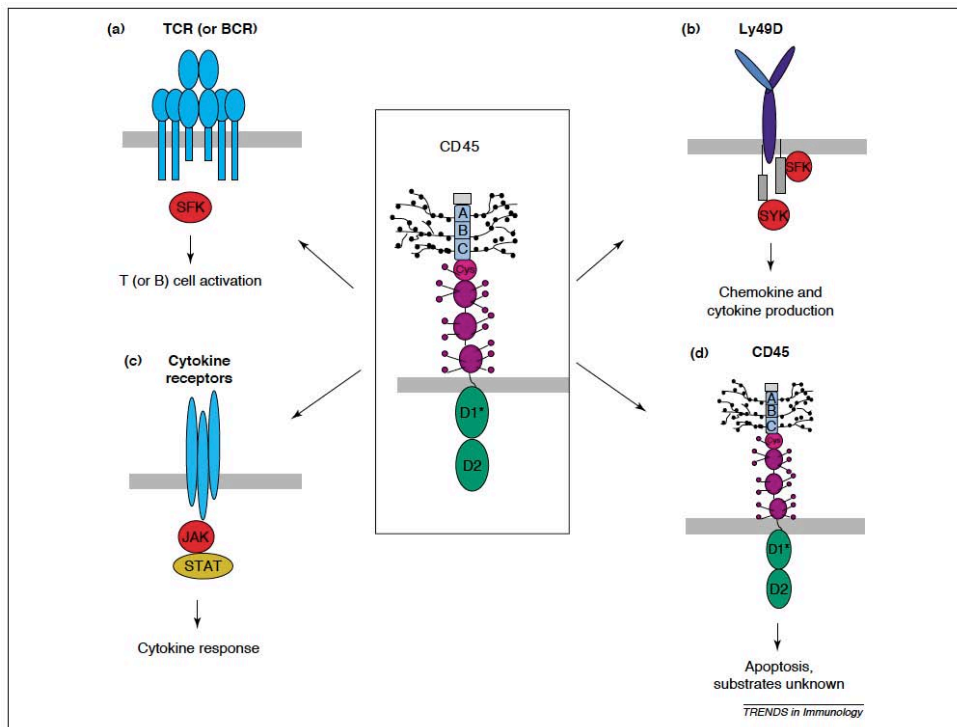
**Figura 35.** Función de la CD45 (A) Estado basal; (B): Estado activado (tomada de Hermiston<sup>54</sup>).

- Función de CD45 en las células B.

El destino de las células B está determinada por las señales que emanan del receptor de células B (BCR), que a su vez están influenciados por una variedad de factores, incluyendo la etapa de maduración de las células, fuerza de unión al antígeno, y la presencia de correceptores. De manera similar a las células T, CD45 es un elemento esencial y crítico en la modulación del umbral de señalización en las células B. En esta línea celular, la CD45 puede regular la señal de transducción de forma positiva o negativa, lo que se traduciría en un aumento o disminución de la respuesta de las células B<sup>(50)</sup>.

- Función de CD45 en otros tipos celulares.

Se ha observado que CD45 es importante en la adhesión mediada por macrófagos<sup>(58)</sup>, esencial para la desgranulación de histamina<sup>(59)</sup>, la regulación de las quimiocinas y producción de citoquinas por las células NK<sup>(60)</sup>, regulación de la apoptosis<sup>(61)</sup> y que también puede modular la señalización inducida por quimiocinas en los neutrófilos<sup>(62)</sup>.



**Figura 36.** CD45 y señalización. CD45 puede influir en diversas vías de señalización en diferentes células hematopoyéticas. (A) Linfocitos T; (B) Células NK; (C) Quinasas Janus (JAK); (D) Inducción apoptosis (tomada de Tchilian<sup>66</sup>).

- Regulación de la expresión de CD45.

A pesar que la proteína CD45 ha sido conocida por ser una tirosin-fosfatasa desde hace más de 20 años, es sorprendente lo poco que se sabe acerca de cómo se regula la actividad fosfatasa. Teniendo en cuenta el papel fundamental de CD45 en la transducción de señales en múltiples tipos de células, dilucidar cómo es regulado es fundamental para comprender el desarrollo de las células hematopoyéticas y su función. Se han propuesto como posibles formas de regulación: Ligando / lectina de unión, dimerización, la localización diferencial con acceso regulado a sustrato, fosforilación, y la oxidación. Cabe destacar que estos métodos no son mutuamente excluyentes y, posiblemente, podría ser distinto en diferentes tipos de células y / o estados de activación<sup>(50, 63)</sup>.

La falta de evidencia del ligando-receptor en la activación de CD45 (un mecanismo común para el receptor de tirosin-quinasa) condujo a la idea de que la actividad fosfatasa de CD45 no está conectado por un ligando extracelular específico. En cambio, se piensa que es constitutivamente activa, proporcionando una desfosforilación y ayudando a mantener a los miembros de la familia Src preparada en su estado no fosforilado. En ausencia de evidencia para la regulación de la actividad catalítica de CD45, los trabajos volcaron la investigación sobre la regulación de la actividad de CD45 por su nivel de expresión y su ubicación en la célula<sup>(55, 56)</sup>.

- CD45 y enfermedad.

Teniendo CD45 un papel fundamental en la regulación de las redes de señalización, y por tanto esencial para múltiples funciones del sistema inmune, sería lógico un papel en la enfermedad. La modulación de la función de CD45 podría proporcionar un medio para controlar las respuestas inmunitarias en autoinmunidad, inmunodeficiencia y cáncer.

Sin embargo, actualmente, el conocimiento del impacto potencial de CD45 en la enfermedad es incompleta. Si bien es evidente que la deficiencia de CD45 resulta en una Inmunodeficiencia Combinada Severa (SCID)<sup>(64, 65)</sup>, y existen trabajos donde se observa la asociación de CD45 con diferentes



enfermedades<sup>(65)</sup>, si CD45 afecta a la susceptibilidad a otras enfermedades es menos definitivo.

**Tabla 1.** Frecuencia de la variantes C77G y A138G de la CD45 en la enfermedad y grupo-control (tomada de Tchilian<sup>66</sup>)

Disease/population	Total patient number (allele frequency, %)	Total control number (allele frequency, %)	Refs
<b>Exon 4 C77G</b>			
<b>Autoimmune hepatitis</b>			
Iran	70 (0.0)	140 (0.4)	[69]
Germany	178 (3.2)*	207 (0.7)	[29]
<b>Common variable immunodeficiency</b>			
Sweden	44 (2.3)	1044 (1.4)	[23]
UK	98 (1.5)	232 (0.9)	[23]
<b>Diabetes</b>			
Germany	228 (0.2)	196 (1.3)	[30]
Germany	165 (1.2)	220 (1.1)	[31]
<b>Graves' disease</b>			
Germany	297 (1.3)	196 (1.3)	[30]
<b>Multiple sclerosis</b>			
Germany	327 (3.2)*	303 (0.0)	[19]
Germany	76 (3.3)*	119 (0.4)	[19]
Germany	454 (0.8)	347 (1.4)	[68]
Italy	194 (1.3)*	222 (0.0)	[20]
Italy	448 (1.2)	529 (0.9)	[16]
Sweden	1044 (1.4)	630 (1.5)	[23]
UK	330 (2.6)	197 (2.0)	[24]
US	122 (1.6)	244 (0.4)	[19]
US	450 (1.7)	253 (1.2)	[22]
<b>Langerhans cell histiocytosis</b>			
Italy	41 (3.7)*	199 (0.3)	[27]
<b>HIV</b>			
UK	197 (2.8)*	236 (0.9)	[26]
<b>Systemic sclerosis</b>			
Germany	67 (3.7)*	205 (0.7)	[28]
<b>Systemic lupus erythematosus</b>			
Germany	98 (2.0)	205 (0.7)	[28]
<b>Exon 6 A138G – Japan</b>			
Graves' disease	175 (9.0)*	176 (23.7)	[38]
Hashimoto thyroiditis	126 (19.8)	176 (23.7)	[38]
Hepatitis B	113 (11.9)*	176 (23.7)	[38]
Hepatitis C	173 (19.4)	176 (23.7)	[38]

\*Statistically significant associations of CD45 C77G or A138G polymorphisms with disease.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## **Hipótesis**

La hipótesis de la que parte el presente estudio es que el análisis de la expresión transcripcional de CD45 analizado en muestras de tumor se correlaciona de forma significativa con el grado de infiltración linfocitaria (TIL), y contaría con capacidad pronóstica en relación al control de la enfermedad y la supervivencia en pacientes con un CECC.

## **Objetivos**

El objetivo general del presente estudio es valorar la capacidad pronóstica de la expresión transcripcional de CD45 en los pacientes con CECC.

Como objetivos concretos del presente trabajo de investigación nos planteamos:

1. Comparar la expresión transcripcional de CD45 en función de la extensión local o regional de la enfermedad o el grado histológico del tumor.
2. Evaluar la capacidad pronóstica de la expresión transcripcional de CD45 en relación a la supervivencia libre de enfermedad en los pacientes con CECC.
3. Analizar la existencia de correlación entre la expresión transcripcional de CD45 y la infiltración tumoral por linfocitos.
4. Valorar la existencia de diferencias en la expresión transcripcional de CD45 en los pacientes con carcinomas de orofaringe en función del estatus HPV.



# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## **Material y métodos**

Para la realización del presente estudio se analizaron dos grupos de pacientes. En primer lugar se estudió una cohorte de pacientes con CECC diagnosticados y tratados en el Hospital de Sant Pau de Barcelona durante el periodo 2004-2011 (cohorte HSP). De forma adicional se evaluaron los resultados correspondientes al The Cancer Genome Atlas (cohorte TCGA).

Este estudio forma parte de un proyecto de investigación desarrollado con la ayuda de la beca FIS “Herramienta de predicción de respuesta a la radioterapia basada en la expresión de genes relacionados con la transición epitelial-mesenquimal en cáncer de cabeza y cuello” (PI14/01918), aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y bajo los principios de la Declaración de Helsinki.

### **Cohorte HSP**

Se analizaron biopsias de tumor previas al inicio del tratamiento de 160 pacientes consecutivos afectos de un CECC confirmado histológicamente, tratados en nuestro centro con intención radical entre 2004 y 2011. Todos los pacientes fueron evaluados por el Comité de Oncología y la decisión terapéutica (cirugía, radioterapia o quimio-radioterapia) se basó en los protocolos terapéuticos institucionales existentes para cada una de las localizaciones del tumor. En 77 ocasiones se dispuso de una muestra de mucosa sana de los pacientes incluidos en el estudio.

Los datos clínicos se obtuvieron de una base de datos oncológica que incluye información epidemiológica, terapéutica y de seguimiento de la totalidad de pacientes con tumores malignos de cabeza y cuello diagnosticados y tratados en el Hospital de Sant Pau desde 1985<sup>(66)</sup>.



La siguiente tabla muestra las características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio.

**Tabla 2.** Características de los pacientes incluidos en el estudio. Cohorte H. Sant Pau.

<b>Características</b>		<b>N (%)</b>
<b>Edad: media/desviación estándar</b>		62.1(37.1-86.1)
<b>Sexo</b>	Masculino	143 (89.4%)
	Femenino	17 (10.6%)
<b>Localización tumoral.</b>	Cavidad oral/orofaringe	64 (40.0%)
	Laringe/hipofaringe	96 (60.0%)
<b>Categoría T</b>	cT1-2	75 (46.9%)
	cT3-4	85 (53.1%)
<b>Categoría N</b>	cN0	87 (54.4%)
	cN+	73 (45.6%)
<b>Diferenciación tumoral</b>	Bueno	13 (8.1%)
	Moderado	129 (80.6%)
	Pobre	18 (11.3%)
<b>Tratamiento</b>	Cirugía ± radioterapia	41 (25.6%)
	Radioterapia ± quimioterapia	119 (74.4%)

La media de seguimiento de los pacientes fue de 4.4 años (desviación estándar 2.8 años). Durante el periodo de seguimiento, 46 pacientes (28.7%) presentaron una recidiva local, 28 pacientes (17.5%) una recidiva regional y 23 pacientes (14.4%) una metástasis a distancia. En global, 72 pacientes (45.0%) de los pacientes contaron con una recidiva de la enfermedad durante el periodo de seguimiento.

## **Métodos**

### - Expresión de mRNA.

Todas las determinaciones se realizaron en el Laboratorio de Angiología, Biología Vascular e Inflamación (LABVI) del Instituto de Investigación Biomédica del Hospital Sant Pau, dirigido por el Dr. Luis Vila y la Dra. Mercedes Camacho.

Inmediatamente tras la obtención de las biopsias, una parte del tejido se estabilizó mediante inclusión en RNA-later (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania) y se almacenó a -80°C hasta su procesamiento. Los tejidos fueron homogeneizados en 1 ml de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA). La extracción del RNA se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. La expresión de RNAm se estudió mediante PCR a tiempo real en un ABI Prism 7900HT utilizando ensayos prediseñados validados (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems) y parámetros de amplificación universales. La expresión relativa de cada transcrito se expresó como el cociente de transcrito del gen/transcrito  $\beta$ -actina.

Se llevó a cabo un análisis de la expresión transcripcional de CD45, así como de la expresión de una serie de citoquinas con capacidad quimiotáctica frente a diferentes tipos leucocitarios como CXCL1, IL8, MPC-1, GCP-2 y RANTES

### - Análisis del grado de TIL.

Con la finalidad de evaluar las características celulares de los componentes del infiltrado inflamatorio presente en los tumores y compararlo con los valores de expresión transcripcional del CD45, se analizó el nivel infiltración por TIL en 20 muestras de tumores de los pacientes incluidos en el presente estudio.

Se seleccionaron 10 pacientes con unos niveles de expresión elevada de CD45 y 10 pacientes con unos niveles de expresión baja. Para la determinación de grado de TIL se analizaron las preparaciones teñidas con H&E utilizadas para el diagnóstico histológico de los tumores primarios, conservadas en el archivo del Servicio de Anatomía Patológica de nuestro centro.

La intensidad del grado de TIL fue analizada por un anatomopatólogo experto a partir de la valoración de una única preparación. El examinador desconocía el grado de expresión de CD45 correspondiente a cada uno de los tumores evaluados. Se valoró el grado de infiltración linfocitaria tanto a nivel del parénquima tumoral como del estroma peritumoral, clasificándose a los tumores en base a una puntuación semicuantitativa: 0- ausencia de infiltración linfocitaria; 1- infiltración linfocitaria leve; 2- infiltración linfocitaria moderada; 3- infiltración linfocitaria severa.

- Inmunohistoquímica.

Con el objetivo de caracterizar el inmunofenotipo correspondiente a las células CD45+, se realizó un estudio inmunohistoquímico en muestras de 10 de los tumores incluidos en el estudio. El análisis inmunohistoquímico se realizó a partir de secciones de 3 µm con el sistema de visualización Envision FLEX (Dako, Glostrup, Denmark). Se realizaron tinciones para CD45, CD3, CD20, mieloperoxidasa y CD68 (Dako Glostrup, Denmark).

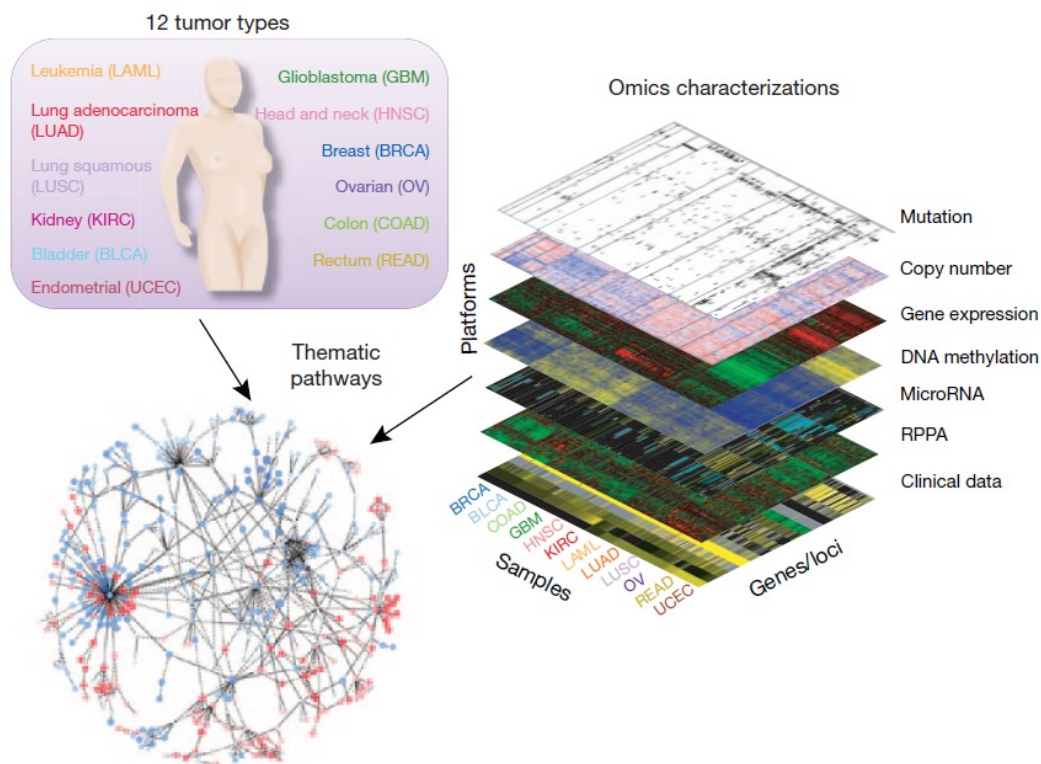
- Determinación del estatus HPV.

Se contó con información relativa al estatus HPV para 35 de los pacientes con carcinomas de orofaringe incluidos en el estudio para los cuales se dispuso de bloque de parafina correspondiente a la biopsia del tumor previa al inicio del tratamiento. La determinación del estatus HPV se realizó a partir de la identificación de ADN viral en las muestras de biopsia mediante el sistema SPF-10 PCR/DEIA/LiPA25. Para todos los casos que resultaron HPV-positivos, se procedió a la extracción de ARN y la detección del nivel de expresión del E6\*I mRNA mediante RT-PCR.

## Cohorte TCGA

Para validar los resultados conseguidos con la determinación de la expresión de CD45 en la cohorte de muestras del HSP, se llevó a cabo un análisis de los resultados contenidos en el The Cancer Genome Atlas (TCGA). El TCGA es un proyecto iniciado en 2005 y supervisado por el National Cancer Institute y el National Human Genome Research Institute cuya finalidad es catalogar cambios moleculares de importancia biológica responsables de la aparición de cáncer haciendo uso de la secuenciación genómica y la bioinformática.

El proyecto incluye resultados de seis tipos de caracterización “ómica” de las muestras.



**Figura 37.** Caracterización “ómica”. Proyecto TGA.

Los resultados incluidos en el TCGA son de acceso libre a través del enlace: <http://cancergenome.nih.gov/>.

En el caso de los CECC, el TCGA incluye información de un total de 520 muestras de tumor primario, 2 muestras de tumor metastásico, y 43 muestras de mucosa sana. En la realización del presente estudio evaluamos los

resultados correspondientes a la expresión transcripcional del genoma, que incluye información cuantitativa de la expresión de más de 20000 genes.

Se analizó la expresión transcripcional de CD45, CD3 (D, E, F), CD20, CD8, CD4, CD68, CD66a, CD66b, y FoxP3 en las 520 muestras de tumor primario incluidas en el TCGA. La siguiente tabla resume las características de los pacientes a los que correspondieron las muestras analizadas.

**Tabla 3.** Características de los pacientes de las muestras analizadas.

<b>Características</b>		<b>N (%)</b>
<b>Edad</b> (media / desviación estándar)		61.4 / 11.8 años
<b>Sexo</b>	Masculino	384 (73.8%)
	Femenino	136 (26.2%)
<b>Localización</b>	Cavidad oral	315 (60.6%)
	Orofaringe	79 (15.2%)
	Hipofaringe	10 (1.9%)
	Laringe	116 (22.3%)
<b>Tabaco</b>	No fumador	117 (22.5%)
	Exfumador (> 15 años)	73 (14.0%)
	Fumador	318 (61.2%)
	Desconocido	12 (2.3%)
<b>Categoría T</b>	T1	35 (6.7%)
	T2	151 (29.0%)
	T3	135 (26.0%)
	T4	183 (35.2%)
	Desconocido	16 (3.1%)
<b>Categoría N</b>	N0	244 (46.9%)
	N1	83 (16.0%)
	N2	162(31.2%)
	N3	9 (1.7%)
	Desconocido	22 (4.2%)

Se dispuso de información referente al estatus HPV de un total de 42 de las muestras correspondientes a pacientes con carcinomas localizados en la orofaringe, de los cuales un 81.0% (n=34) fueron catalogados como HPV-positivos.

Además de la expresión génica, en una proporción de los casos incluidos en el TCGA se dispuso de información clínica relacionada con el seguimiento. Para la realización del presente estudio se evaluaron un total de 108 pacientes en los que se incluía información correspondiente a más de 1 año de seguimiento. La siguiente tabla muestra las características de los pacientes para los cuales se dispuso de esta información clínica.

**Tabla 4.** Características de los pacientes con disposición de información clínica.

<b>Características</b>		<b>N (%)</b>
<b>Edad:</b> (media/desviación estándar)		61.9 (24.6-88.2)
<b>Sexo</b>	Masculino	82 (75.9%)
	Femenino	26 (24.1%)
<b>Localización</b>	Cavidad oral/orofaringe	87 (80.6%)
	Laringe/hipofaringe	21 (19.4%)
<b>Categoría T</b>	cT1-2	38 (35.2%)
	cT3-4	70 (64.8%)
<b>Categoría N</b>	cN0	65 (60.2%)
	cN+	43 (39.8%)
<b>Diferenciación tumoral</b>	Bueno	17 (15.7%)
	Moderado	65 (60.2%)
	Pobre	26 (24.1%)

El periodo medio de seguimiento de los pacientes de la cohorte TCGA incluidos en el estudio fue de 2.2 años (desviación estándar 2.4 años). Durante el periodo de seguimiento, un total de 48 pacientes (44.4%) tuvieron una recidiva local, regional o a distancia del tumor.

#### Análisis estadístico

Se comprobó inicialmente cómo los datos correspondientes a los valores de expresión de CD45 no seguían una distribución normal mediante el test de Kolmogorov-Smirnof, por lo que las comparaciones de los niveles de expresión en función de variables cualitativas se realizaron utilizando test no paramétricos: test de Wilcoxon para datos apareados, test de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis para la comparación de muestras independientes con dos o más de dos categorías, respectivamente. La determinación del nivel de correlación existente entre variables continuas se realizó con el test de correlación de Pearson.

Se definió como supervivencia libre de enfermedad el periodo existente entre el diagnóstico de la enfermedad y la fecha de diagnóstico de una recidiva local, regional o a distancia de la enfermedad. Se utilizó el método de árbol de clasificación y regresión (CART) para categorizar el valor continuo del nivel de expresión de mRNA de CD45, considerando la supervivencia libre de enfermedad o libre de recidiva local del tumor como variable dependiente. Mediante el análisis CART se dividieron los datos en segmentos homogéneos de acuerdo a la variable dependiente.

Los cálculos de supervivencia actuarial se llevaron a cabo utilizando el método de Kaplan-Meier. Las diferencias entre las tasas de supervivencia se compararon mediante el test log-rank.

Se realizó un análisis multivariante usando el modelo de regresión de Cox. Se tomó como variable dependiente la supervivencia libre de enfermedad y como variables independientes: la localización del tumor primario (cavidad oral – orofaringe vs. laringe-hipofaringe), extensión local (T1-2 vs. T3-4), extensión regional (N0 vs. N+), tipo de tratamiento (cirugía ± radioterapia vs radioterapia/quimioterapia), y categoría de expresión transcripcional de CD45 definida por método el CART.

Se consideró significativa un valor de P inferior a 0.05.

El análisis estadístico se realizó con software SPSS v. 17.0 (SPS, Chicago, IL) y software Sigma-Plot.





# RESULTADOS

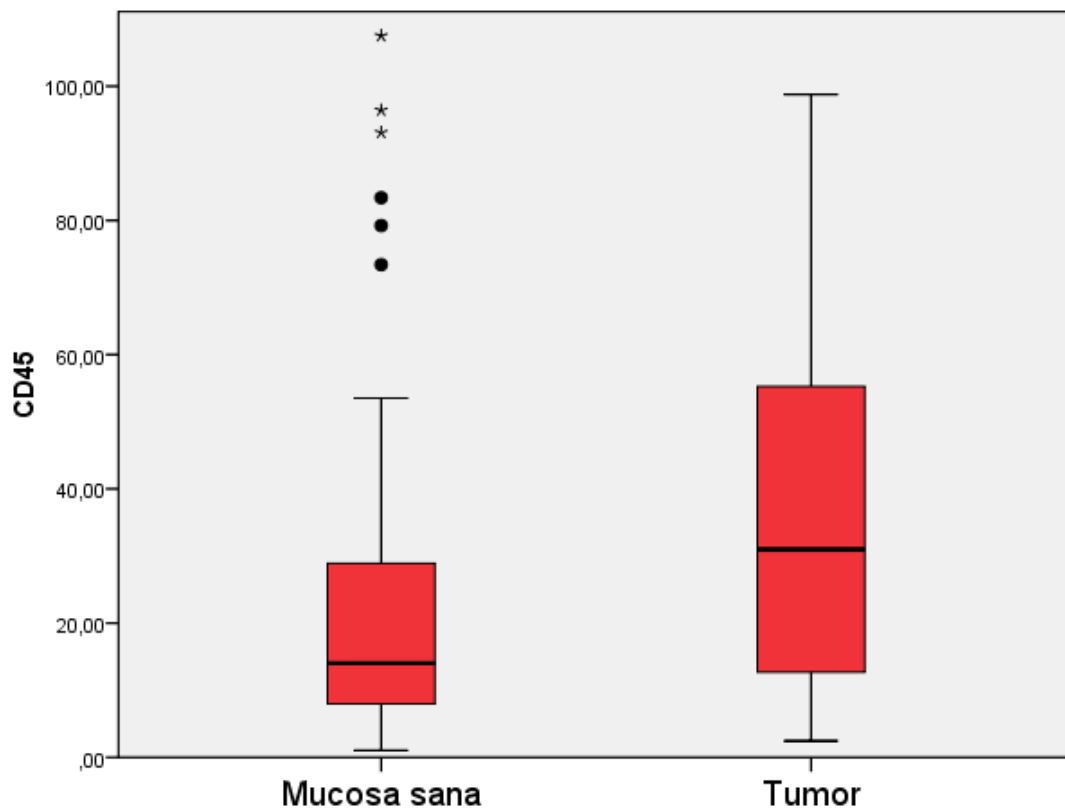


## Resultados

### Cohorte HSP

- Diferencias en la expresión de CD45 entre las muestras de tumor y de mucosa sana.

Se dispuso de parejas de muestras de mucosa sana y tumor para 74 de los pacientes incluidos en el estudio. Al analizar la distribución de los valores transcripcionales de CD45 se pudo comprobar cómo no seguían una distribución normal (test de Kolmogorov-Smirnov  $P=0.0001$ ), por lo que la comparación entre los valores de expresión correspondientes a las muestras de tumor y mucosa sana se llevó a cabo con el test no paramétrico. Se observó como las muestras de tumor contaron con unos niveles de expresión transcripcional superiores a los de la mucosa sana (Wilcoxon Signed Rank Test,  $P=0.016$ ). La siguiente figura muestra la distribución de la expresión de CD45 en las muestras de mucosa sana y tumor.

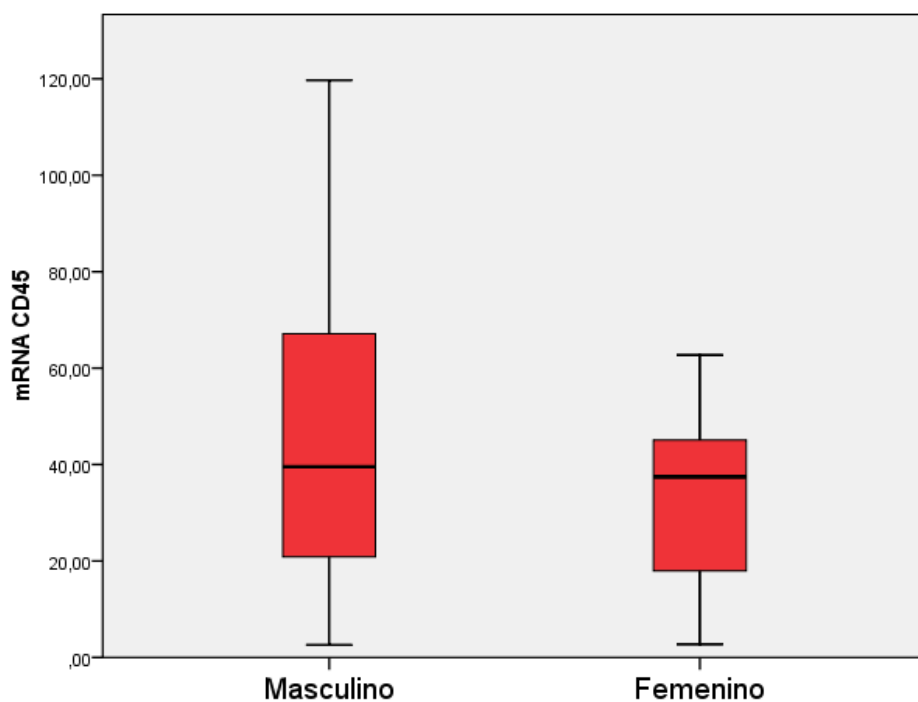


**Figura 38.** Distribución de la expresión de CD45 en muestras de mucosa sana y tumor.

- Expresión transcripcional de CD45 en función de las características clínicas.

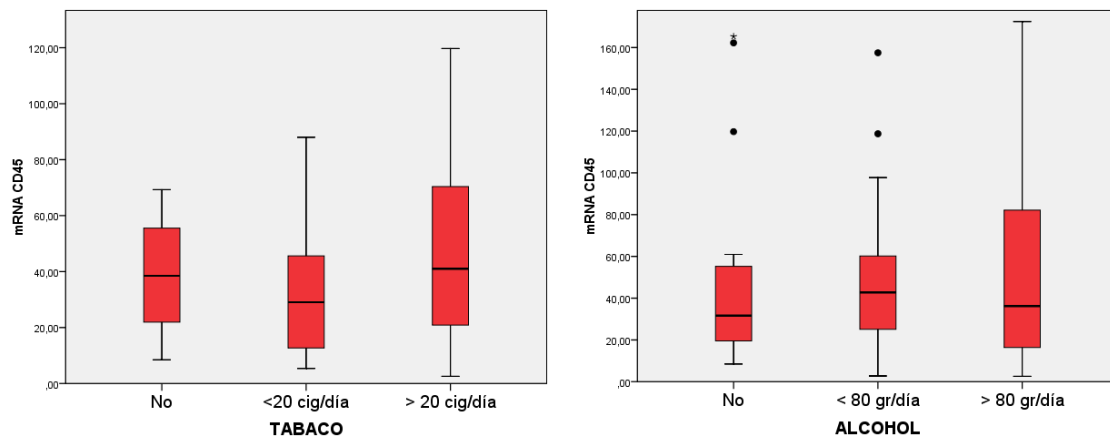
Se analizó a continuación la existencia de diferencias en la distribución de los valores de expresión transcripcional del CD45 en las muestras de tumor en función del sexo, la existencia de antecedentes en el consumo de tabaco y alcohol, la localización del tumor primario, la categoría de extensión local (T) y regional (N) del tumor, y el grado histológico. La expresión de CD45 no siguió una distribución normal (test de Kolmogorov-Smirnov  $P=0.0001$ ), por lo que las comparaciones se realizaron mediante test no paramétricos.

No aparecieron diferencias significativas en los valores de expresión de CD45 en función del sexo de los pacientes (Mann-Whitney U Test,  $P=0.239$ ).



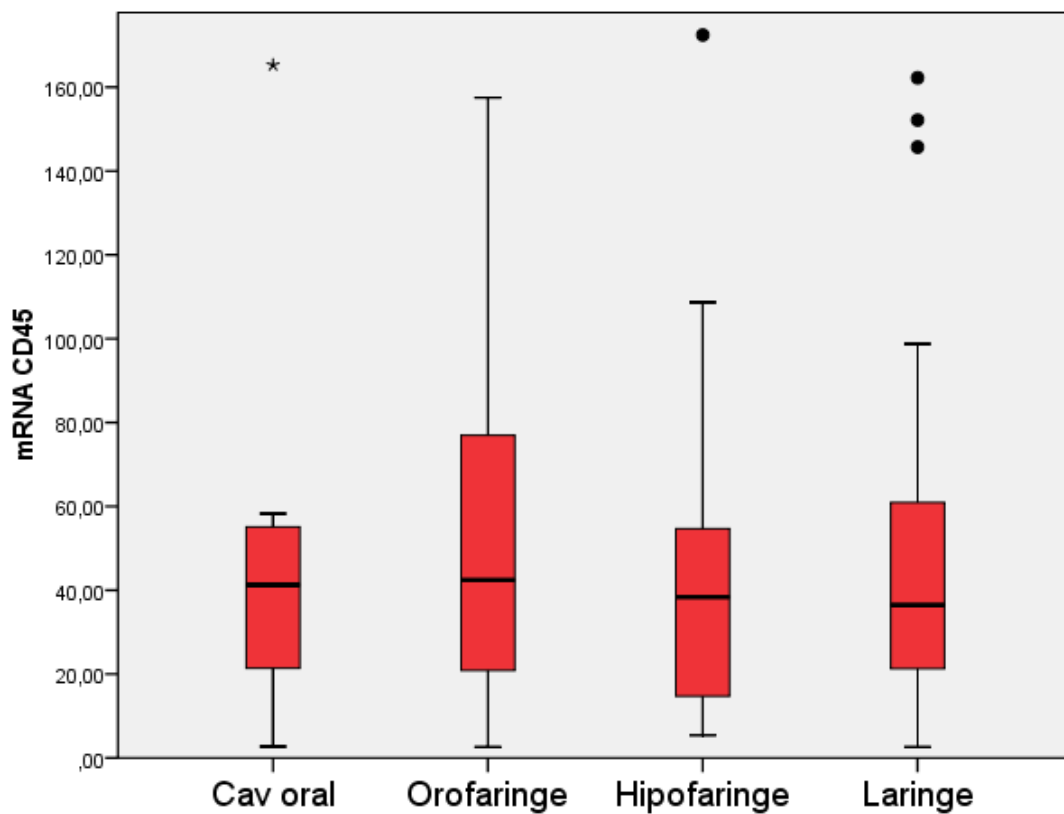
**Figura 39.** Distribución de valores de expresión de CD45 en función del sexo.

Igualmente, no aparecieron diferencias en función de los consumos de tabaco y alcohol (Kruskal-Wallis test,  $P=0.232$  y  $P=0.648$ , respectivamente).



**Figura 40.** Distribución de valores de expresión de CD45. **A.** En función del consumo de tabaco; **B.** En función del consumo de alcohol.

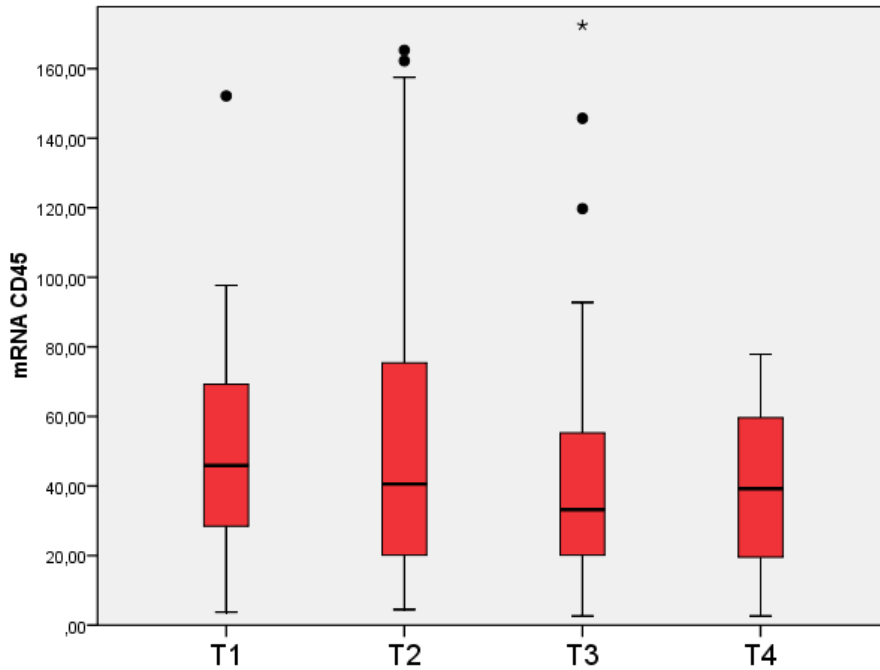
Tampoco existieron diferencias significativas en la expresión de CD45 en función de la localización del tumor primario (Kruskal-Wallis test,  $P=0.588$ )



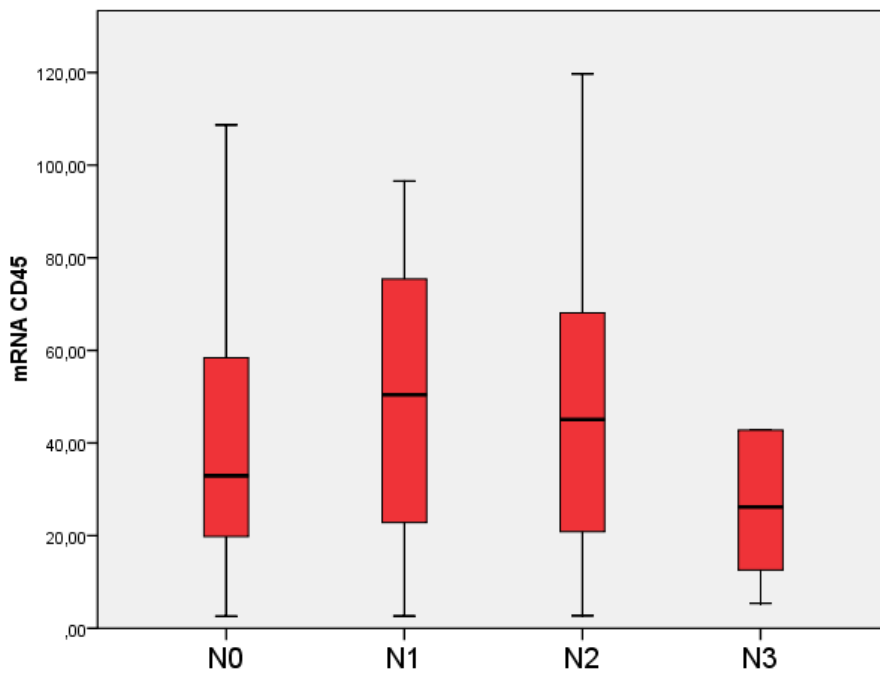
**Figura 41.** Distribución de valores de expresión de CD45 en función de la localización del tumor primario.

Resultados

No existieron diferencias significativas en los valores de expresión de CD45 en función de la extensión local (T) o regional (N) del tumor (Kruskal-Wallis test,  $P=0.611$  y  $P=0.465$ , respectivamente).

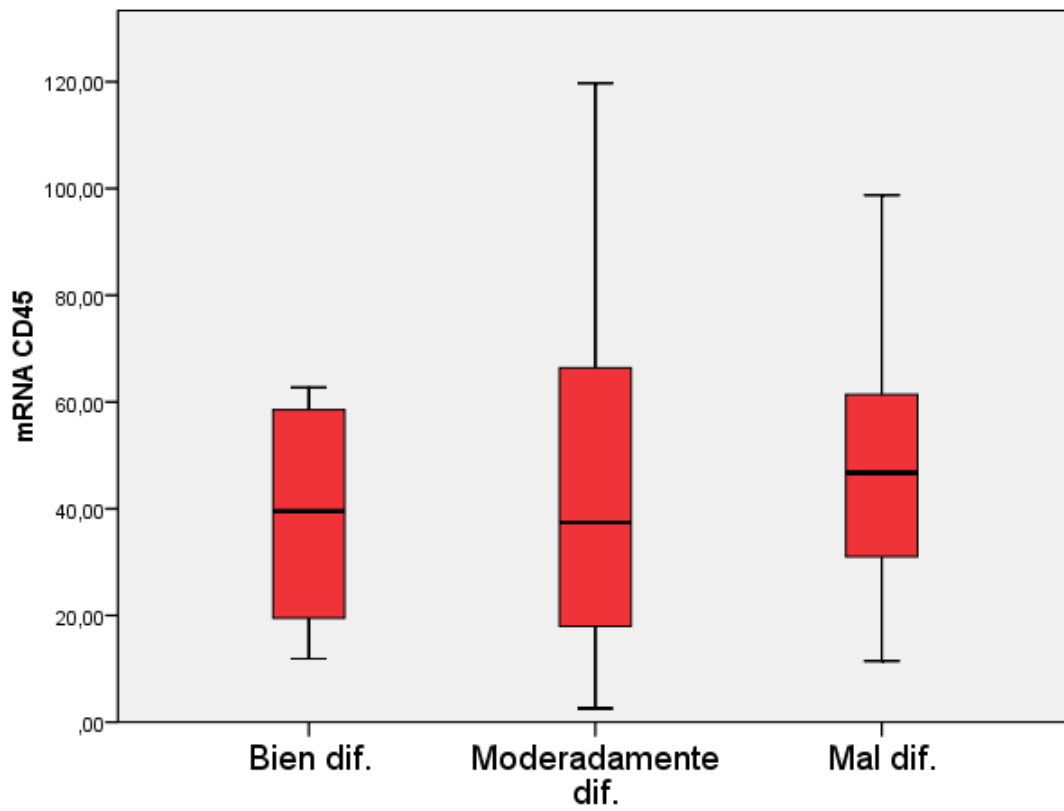


**Figura 42.** Distribución de valores de expresión de CD45 en función de la extensión local.



**Figura 43.** Distribución de valores de expresión de CD45 en función de la extensión regional.

Finalmente, no se apreciaron diferencias en la expresión de CD45 en función del grado de diferenciación tumoral (Kruskal-Wallis test,  $P=0.631$ )

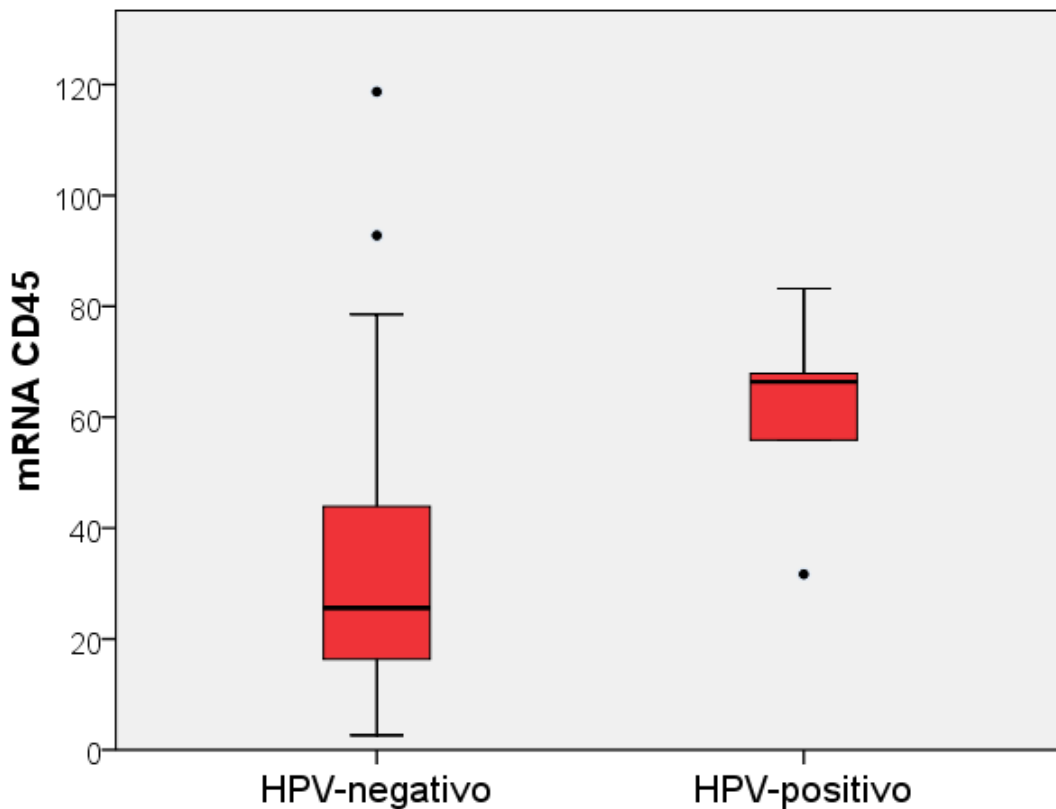


**Figura 44.** Distribución de valores de expresión de CD45 en función del grado de diferenciación tumoral.



- Expresión transcripcional de CD45 en función del estatus HPV para los pacientes con carcinomas de orofaringe.

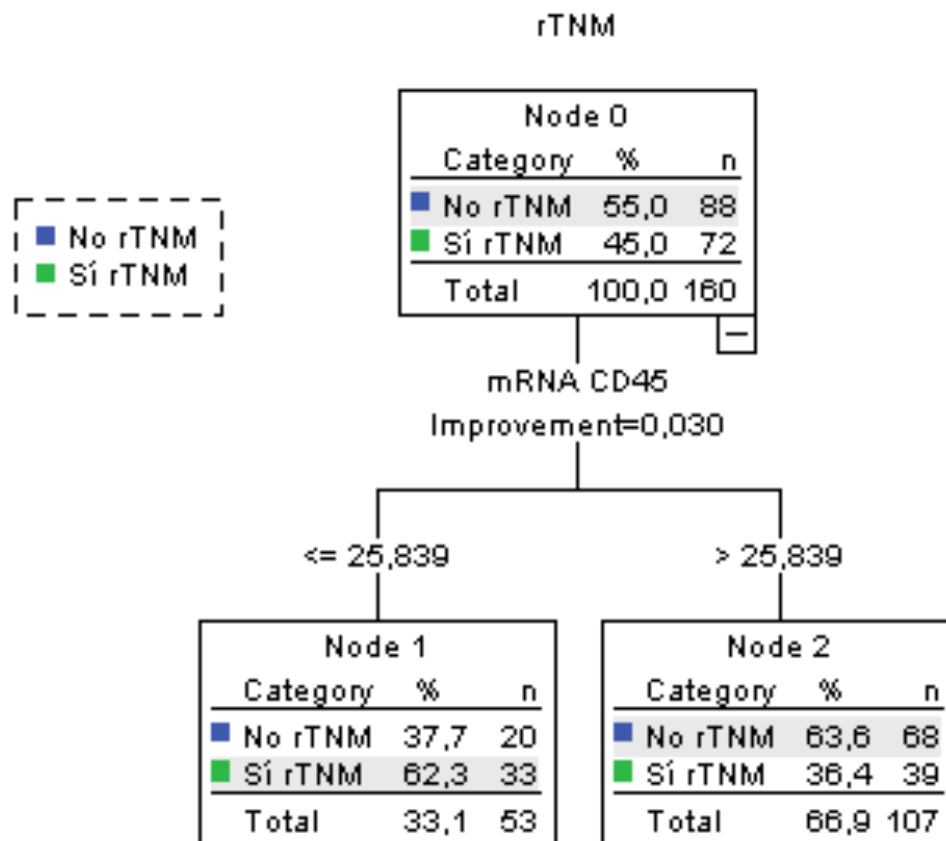
Se dispuso de información referente al estatus HPV para 35 de los pacientes con carcinomas de orofaringe incluidos en el estudio. Cinco de los pacientes fueron considerados HPV-positivos (14.3%). Los pacientes con carcinomas de orofaringe HPV-positivos contaron con una tendencia a presentar unos niveles de expresión transcripcional de CD45 superiores al de los pacientes con tumores HPV-negativos (Mann-Whitney U Test,  $P=0.064$ ).



**Figura 45.** Distribución de valores de expresión de CD45 en función del status HPV.

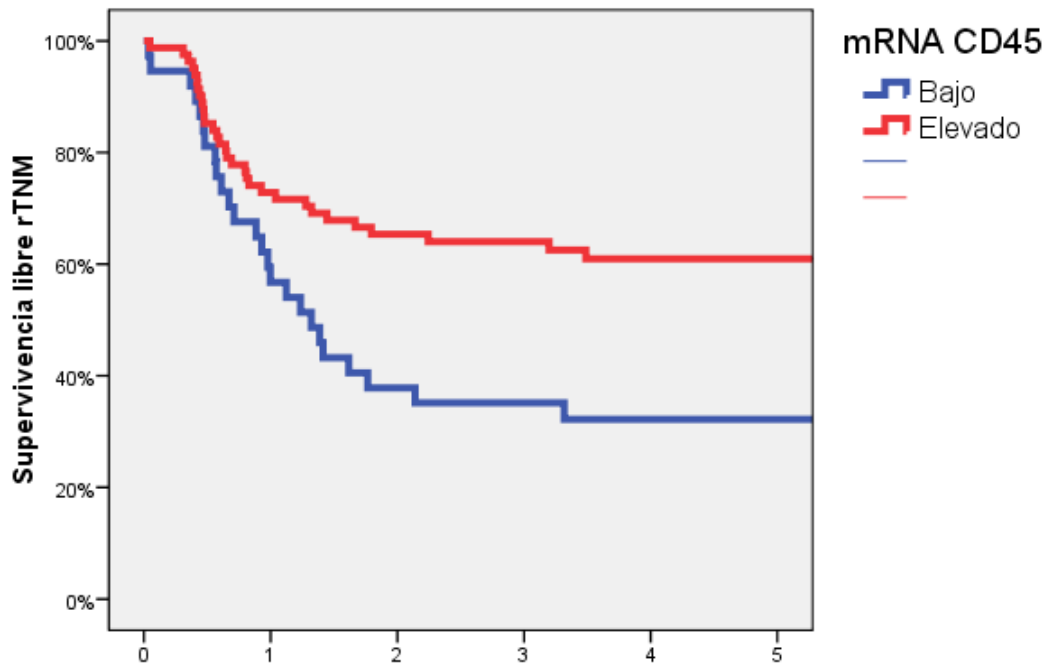
- Capacidad pronóstica de la expresión transcripcional de CD45 en los pacientes con CECC.

Utilizando la supervivencia libre de enfermedad como variable dependiente, el análisis de partición recursiva clasificó a los pacientes en dos categorías en función de la expresión de CD45: pacientes con expresión elevada (n=107, 66.9%), y pacientes con expresión baja (n=53, 33.1%).



Los pacientes con unos niveles de expresión elevados de CD45 contaron con una frecuencia de recidiva significativamente inferior al de los pacientes con una expresión baja.

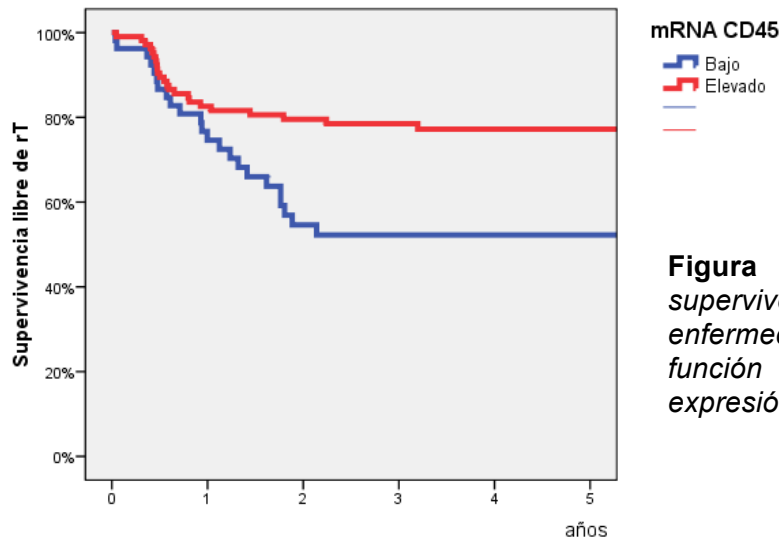
La siguiente figura muestra las curvas de supervivencia libre de enfermedad para los pacientes incluidos en el estudio de acuerdo con la categoría de expresión definida por el análisis de partición recursiva.



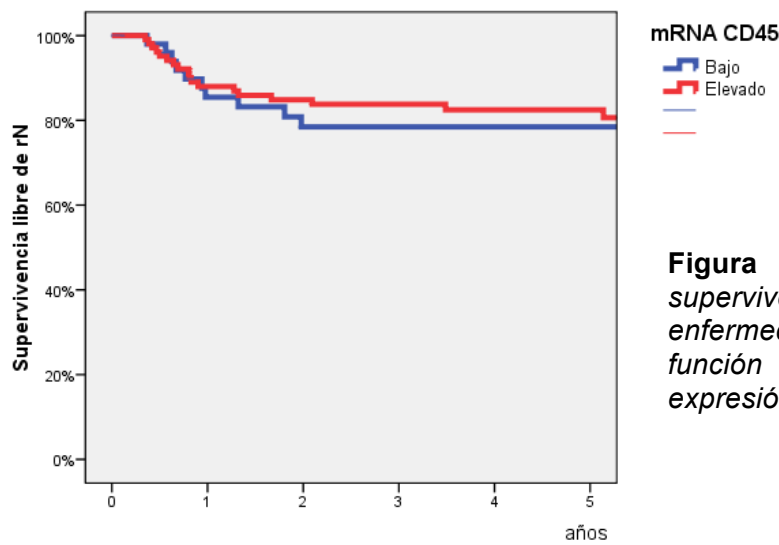
**Figura 46.** Curva de supervivencia libre de enfermedad en función de los niveles de expresión de CD45.

La supervivencia actuarial libre de enfermedad a los 5 años para los pacientes con unos niveles de expresión elevados de CD45 fue del 62.4% (IC 95%: 53.0-71.8%), en tanto que para los pacientes con unos niveles de expresión bajos se redujo al 36.2% (IC 95%: 23.1-49.3%). Existieron diferencias significativas en la supervivencia libre de enfermedad en función de la categoría de expresión de CD45 (Log rank test,  $P=0.003$ ).

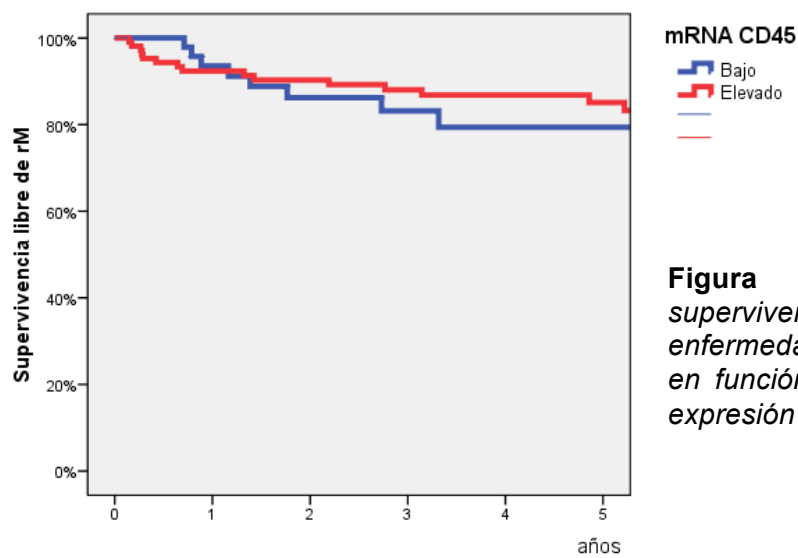
Se procedió a continuación a valorar la supervivencia libre de enfermedad local, regional y a distancia en función de las categorías de expresión de CD45 definidas por el análisis de partición recursiva. Las siguientes figuras muestran las curvas de supervivencia libre de enfermedad local (rT), regional (rN) o a distancia (rM) en función de la expresión de CD45.



**Figura 47.** Curva de supervivencia libre de enfermedad local (rT) en función de los niveles de expresión de CD45.



**Figura 48.** Curva de supervivencia libre de enfermedad regional (rN) en función de los niveles de expresión de CD45.

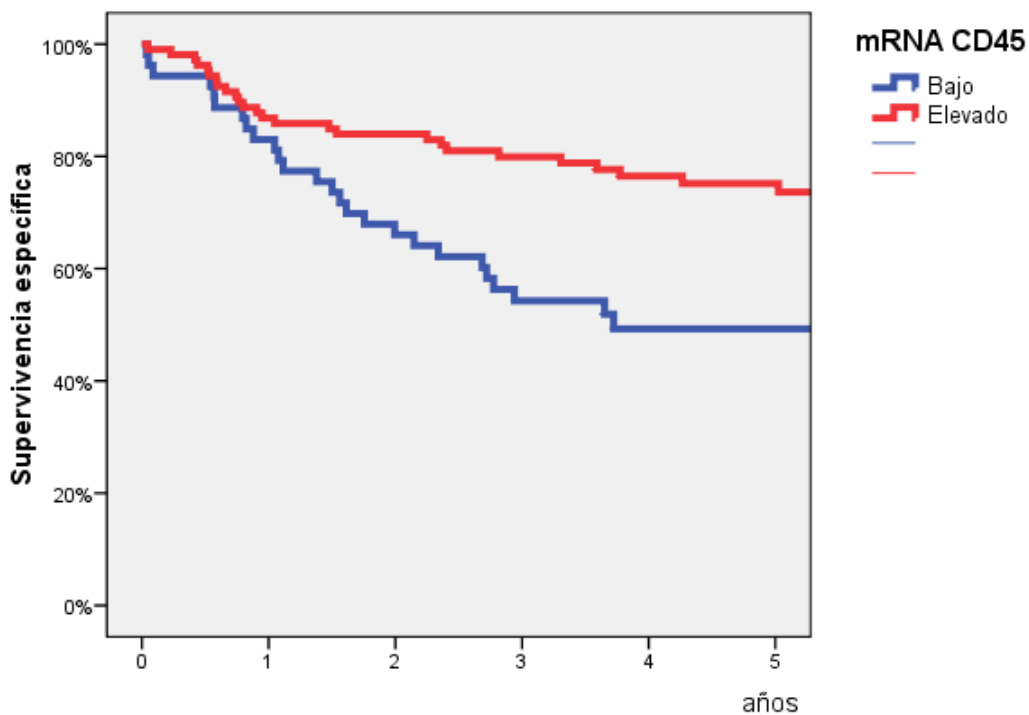


**Figura 49.** Curva de supervivencia libre de enfermedad a distancia (rM) en función de los niveles de expresión de CD45.

## Resultados

Aparecieron diferencias significativas en el control local de la enfermedad en función de la expresión de CD45 ( $P=0.004$ ), en tanto que ni el control regional ( $P=0.635$ ) ni a distancia ( $P=0.594$ ) difirieron de forma significativa de acuerdo con la categoría de expresión de CD45.

Las diferencias en el control local tuvieron una repercusión en la supervivencia específica de los pacientes, tal como muestran las siguientes curvas de supervivencia.



**Figura 50.** Curva de supervivencia específica a los 5 años función de los niveles de expresión de CD45.

La supervivencia específica a los 5 años para los pacientes con unos niveles de CD45 elevados fue del 75.2% (IC 95%: 66.6-83.8%), en tanto que para los pacientes con unos niveles de expresión bajos disminuyó al 45.5% (IC 95%: 30.8-60.2%) ( $P=0.001$ ).

La siguiente tabla muestra los valores de supervivencia libre de enfermedad local (rT), regional (rN) y a distancia (rM) a los 5 años, así como la supervivencia específica a los 5 años en función de las categorías de expresión de CD45.

**Tabla 5.** Valores de supervivencia libre de enfermedad local (rT), regional (rN) y a distancia (rM) a los 5 años, y valores de supervivencia ajustada a los 5 años en función de las categorías de expresión de CD45.

	CD45 Bajo	CD45 Elevado	P
rT	52.3% (38.0-66.6%)	77.2% (69.0-85.4%)	0.004
rN	78.5% (66.6-90.4%)	80.7% (71.3-90.1%)	0.635
rM	79.4% (66.3-92.5%)	83.2% (75.2-91.2%)	0.594
Supervivencia	45.5% (30.8-60.2%)	75.2% (66.6-83.8%)	0.001

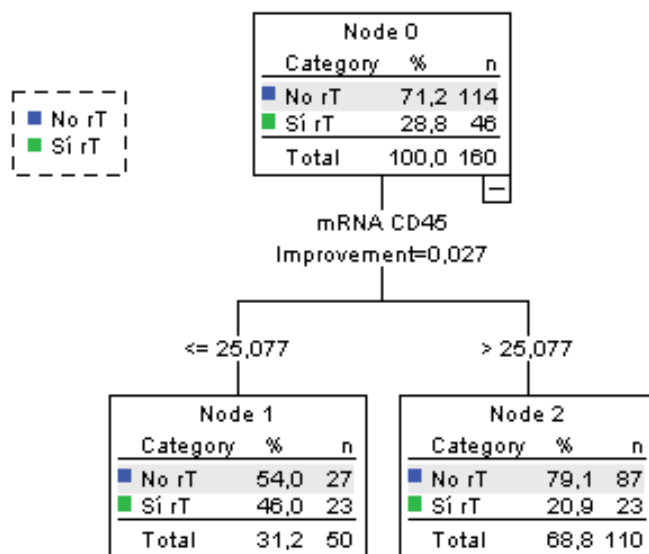
Se llevó a cabo un análisis multivariante considerando la supervivencia libre de enfermedad como la variable dependiente, y la localización del tumor primario (cavidad oral-orofaringe versus laringe-hipofaringe), la categoría de extensión local (T1-2 versus T3-4) y regional (N0 versus N+) de la enfermedad, el tipo de tratamiento realizado (cirugía±radioterapia versus radioterapia±quimioterapia), y la categoría de expresión de CD45 como variables dependientes. La siguiente tabla muestra los resultados del análisis multivariante.

**Tabla 6.** Análisis multivariante.

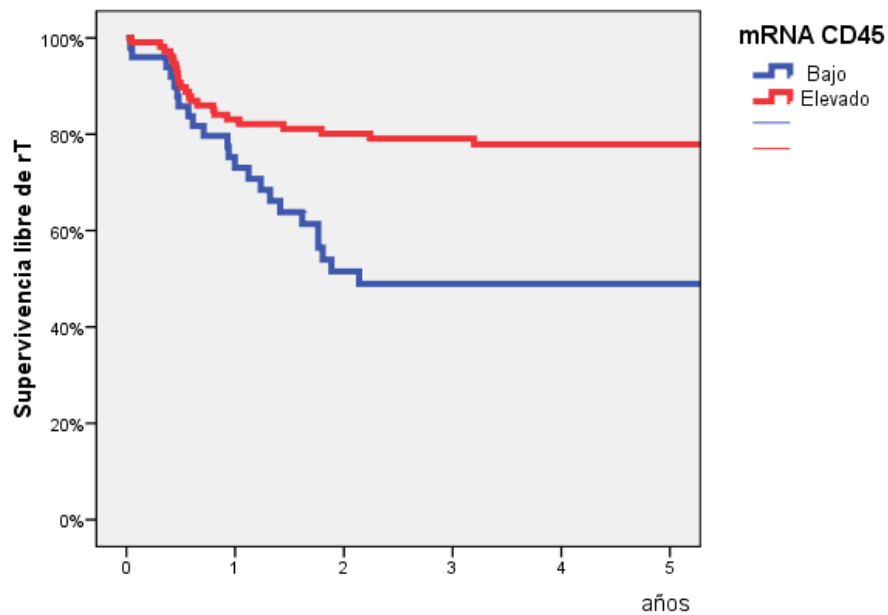
		HR (CI 95%)	P
<b>T</b>	T1-2	1	
	T3-4	1.31 (0.81-2.12)	0.260
<b>N</b>	N0	1	
	N+	1.21 (0.74-1.99)	0.435
<b>Localización</b>	Cavidad oral-orofaringe	1	
	Laringe-hipofaringe	1.13 (0.69-1.85)	0.616
<b>Tratamiento</b>	Cirugía ± RT	1	
	RT / QT-RT	1.40 (0.79-2.49)	0,238
<b>CD45</b>	CD45 elevado	1	
	CD45 bajo	2.02 (1.26-3.23)	0,003

La única variable que se relacionó de forma significativa con la supervivencia libre de enfermedad fue la categoría de expresión de CD45. Considerando como categoría de referencia a los pacientes con unos niveles de expresión elevada de CD45, los pacientes con unos niveles de expresión baja contaron con un riesgo 2.0 veces superior de recidiva (IC 95%: 1.2-3.2, P=0.003).

Si en lugar de utilizar como variable dependiente en el análisis de partición recursiva el control de la enfermedad (supervivencia libre de enfermedad local, regional y a distancia), se utiliza el control local de la enfermedad, se obtuvo un árbol de clasificación muy semejante.



Se obtuvieron dos grupos de pacientes con unos niveles de expresión bajos (n=50, 31.2%) o elevados (n=110, 68.8%) de CD45. En este caso, el punto de corte con la mayor capacidad de discriminación correspondió a un valor de expresión de CD45 de 25.077, en tanto que en el caso de la supervivencia libre de enfermedad el punto de corte contó con un valor de 25.839. La siguiente figura muestra la curva de supervivencia libre de recidiva local en función de las categorías de expresión de CD45 al considerar la respuesta local como la variable dependiente en el modelo.



**Figura 51.** Curva de supervivencia libre de recidiva local función de los niveles de expresión de CD45.

Se realizó un análisis multivariante incluyendo variables que podrían contar con relevancia en relación con el control local de la enfermedad, incluyendo los antecedentes en consumo de tabaco y alcohol, el índice de Karnofsky, la localización del tumor primario, el grado histológico, la categoría de extensión local T, el tipo de tratamiento utilizado, y la categoría de expresión de CD45 al considerar como variable dependiente la recidiva local de la enfermedad (ver tabla 7).



Tabla 7. Análisis multivariante.

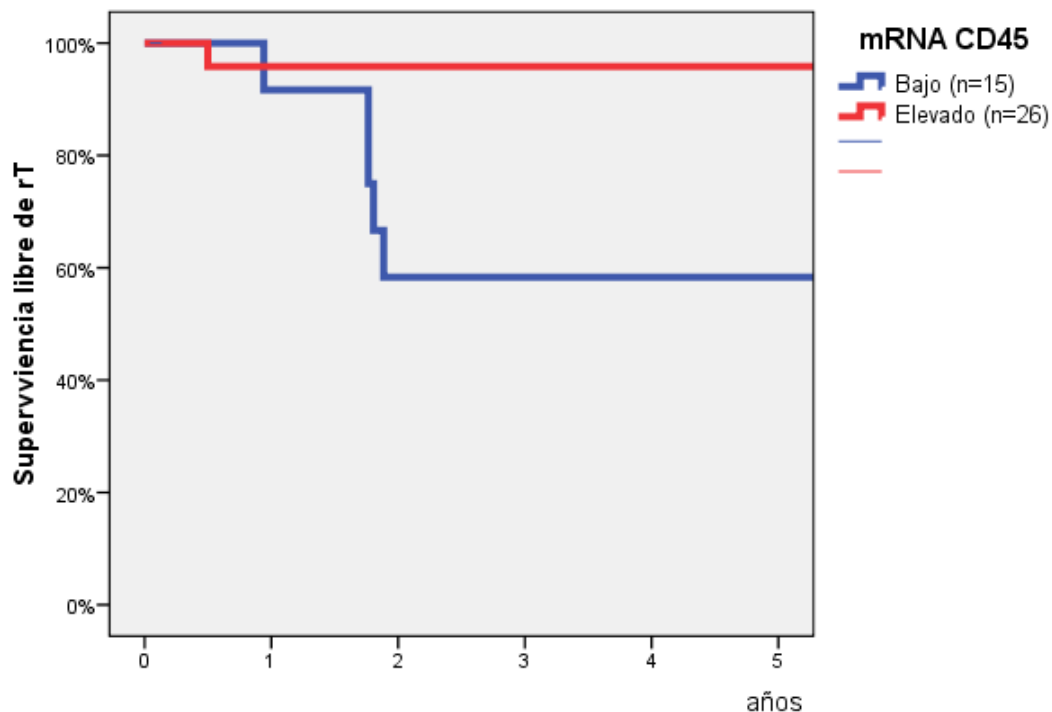
		HR (CI 95%)	P
<b>Tabaco</b>	No	1	
	<20 cig/día	0.62 (0.15-2.57)	0.516
	≥20 cig/día	0.52 (0.14-1.92)	0.334
<b>Alcohol</b>	No	1	
	<80 gr/día	0.68 (0.27-1.67)	0.402
	≥80 gr/día	0.88 (0.32-2.39)	0.811
<b>Karnofsky</b>	≤80	1	
	90	0.57 (0.25-1.29)	0.177
<b>Grado histológico</b>	Bien diferenciado	1	
	Moderadamente diferenciado	0.84 (0.30-2.35)	0.754
	Mal diferenciado	0.72 (0.15-3.35)	0.677
<b>Localización</b>	Cavidad oral	1	
	Orofaringe	0.79 (0.23-2.75)	0.722
	Hipofaringe	1.13 (0.28-4.49)	0.855
	Laringe	1.47 (0.45-4.79)	0.523
<b>Categoría T</b>	T1	1	
	T2	1.64 (0.43-6.21)	0.465
	T3	1.38 (0.35-5.47)	0.641
	T4	6.92 (1.45-33.04)	0.015
<b>Tratamiento</b>	Cirugía	1	
	Cirugía + radioterapia	0.19 (0.03-1.23)	0.082
	Radioterapia	4.07 (1.21-13.72)	0.023
	Quimioradioterapia	2.38 (0.70-7.99)	0.160
<b>CD45</b>	CD45 elevado	1	
	CD45 bajo	3.09 (1.63-5.86)	0.001

La variable que se relacionó de forma más significativa con la aparición de una recidiva del tumor a nivel local fue la categoría de expresión de C45. En relación a los pacientes con niveles de expresión elevados, los pacientes con

niveles de expresión bajos de CD45 tuvieron 3.09 veces más riesgo de sufrir una recidiva local del tumor (IC 95%: 1.63-5.86,  $P=0.001$ ). Las otras variables que se relacionaron con un incremento en la frecuencia de recidiva local fueron que el paciente hubiese seguido un tratamiento a nivel local con radioterapia, o que contase con una categoría T4 de extensión local del tumor.

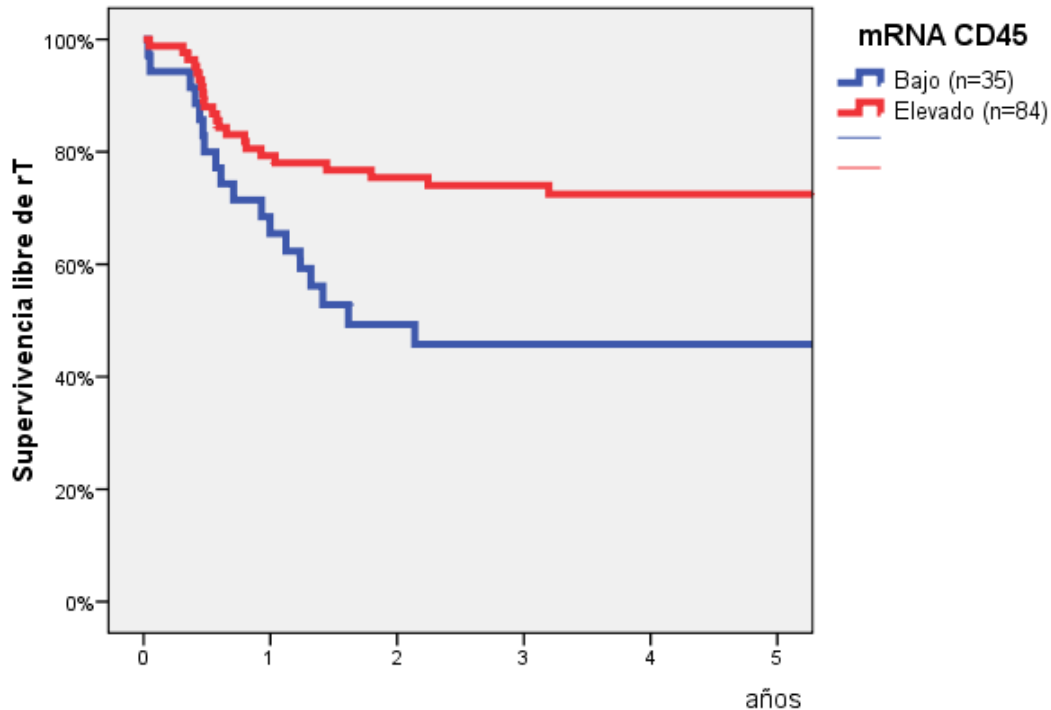
Se exploró la capacidad predictiva de la expresión transcripcional del CD45 en función del tipo de tratamiento realizado. Dado que la capacidad pronóstica del CD45 se relacionaba básicamente con el control local de la enfermedad, para esta parte del estudio se categorizó la expresión de CD45 en base al modelo de partición recursiva que consideró como variable dependiente el control local de la enfermedad.

En el grupo de pacientes tratados con cirugía  $\pm$  radioterapia ( $n=41$ ), la expresión elevada de CD45 se relacionó de forma significativa con un incremento en el control local de la enfermedad ( $P=0.006$ ), tal como aparece en la siguiente figura.



**Figura 52.** Curva de supervivencia libre de enfermedad local (rT) en función de los niveles de expresión de CD45 en pacientes tratados con cirugía +/- radioterapia.

Igualmente, para los pacientes tratados con radioterapia ± quimioterapia (n=119) existieron diferencias significativas en el control local de la enfermedad en función de la categoría de expresión de CD45 (P=0.008).



**Figura 53.** Curva de supervivencia libre de enfermedad local (rT) en función de los niveles de expresión de CD45 en pacientes tratados con radioterapia +/- quimioterapia.

La siguiente tabla muestra los valores de supervivencia libre de recidiva local a los 5 años para los pacientes en función de la expresión de CD45 considerando los pacientes tratados de forma quirúrgica y no quirúrgica en relación con la localización del tumor primario (cavidad oral-orofaríngea versus laringe-hipofaríngea) o la categoría de extensión local de la enfermedad (T1-2 versus T3-4).

**Tabla 8.** Valores de supervivencia libre de recidiva local a los 5 años para los pacientes en función de la expresión de CD45 considerando el tratamiento en función de la localización del primario o categoría de extensión local.

		CD45	n	Sup (IC 95%)	P
Cir ± RT	Cav oral-orofar.	Bajo	5	40.0% (0.0-82.9%)	0.079
		Elevado	10	88.9% (68.4-100%)	
	Laringe-hipofar.	Bajo	10	71.4% (37.9-100%)	0.031
		Elevado	16	100%	
	T1-2	Bajo	6	50.0% (0.0-89.9%)	0.080
		Elevado	13	90.9% (73.9-100%)	
	T3-4	Bajo	9	66.7% (37-96.4%)	0.029
		Elevado	13	100%	
RT ± QT	Cav oral-orofar.	Bajo	13	44.0% (16.0-72.0%)	0.004
		Elevado	36	85.1% (73.2-97.0%)	
	Laringe-hipofar.	Bajo	22	46.5% (24.4-68.6%)	0.234
		Elevado	48	63.5% (49.6-77.4%)	
	T1-2	Bajo	16	45.1% (18.5-71.7%)	0.026
		Elevado	40	76.9 (63.6-90.2%)	
	T3-4	Bajo	19	45.6% (22.7-68.5%)	0.118
		Elevado	44	68.2% (53.7-82.7%)	

Para todos los grupos de pacientes estudiados el control local de la enfermedad en los tumores con expresión elevada de CD45 fue superior al de los tumores con expresión baja. El grupo en los que las diferencias fueron más significativas estuvo compuesto por los pacientes con tumores de cavidad oral-orofaríngea tratados de forma no quirúrgica, en tanto que el grupo de pacientes en los que estas diferencias fueron menos manifiestas fue el perteneciente a los pacientes con tumores localizados en laringe-hipofaríngea igualmente tratados de manera no quirúrgica.

## Resultados

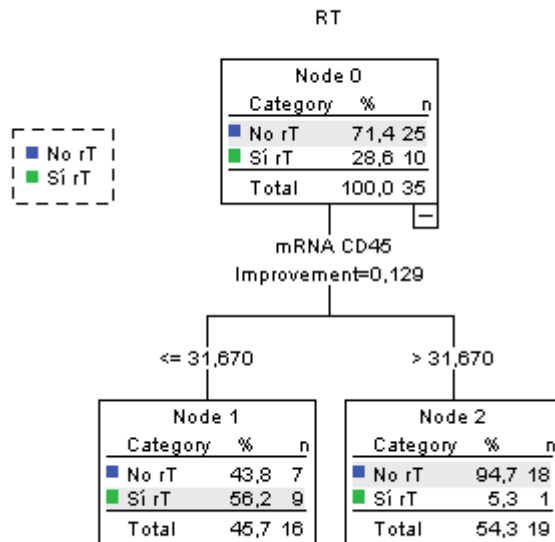
- Control local en función de la expresión de CD45 en los pacientes con carcinomas de orofaringe.

Tal como establecimos anteriormente, se dispuso de información relativa al estatus HPV para 35 de los pacientes con carcinomas de orofaringe. La siguiente tabla muestra las categorías de extensión local y regional, así como el tipo de tratamiento realizado para este subgrupo de pacientes en función de la positividad HPV.

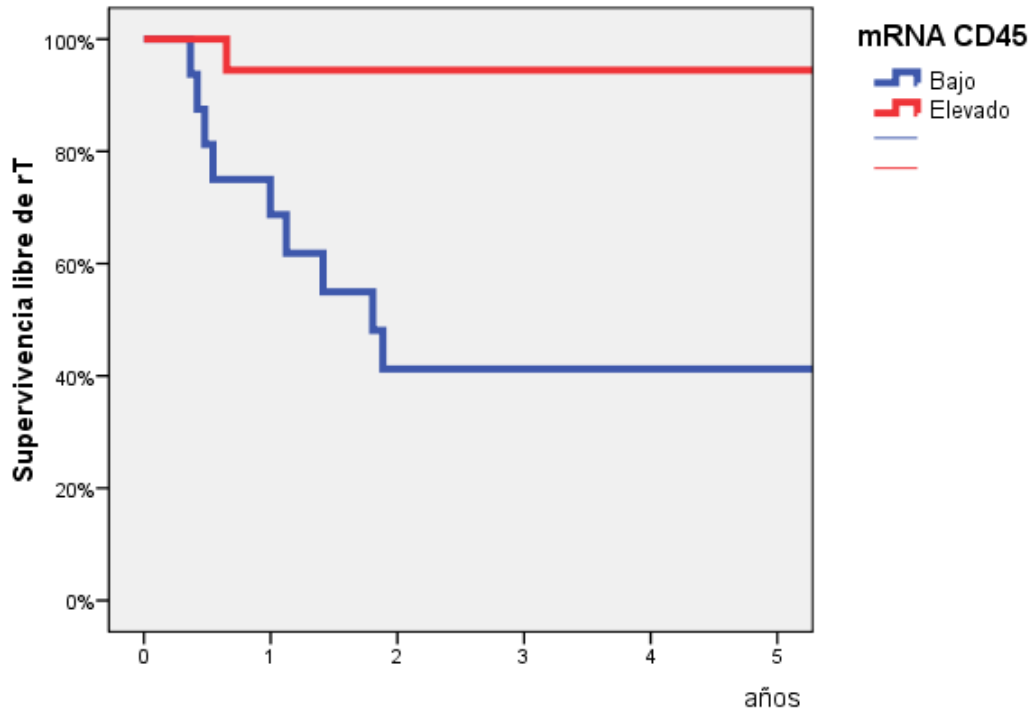
**Tabla 9.** *Categorías de extensión local, regional y tipo de tratamiento según status HPV.*

		HPV-negativo (n=30)	HPV-positivo (n=5)
Categoría T	T1-2	13	4
	T3-4	17	1
Categoría N	N0	10	1
	N+	20	4
Tratamiento	Cirugía ± radioterapia	4	1
	Radioterapia ± QT	26	14

Se realizó un análisis de partición recursiva para la categorización de este grupo de pacientes considerando el control local de la enfermedad como la variable dependiente.



Con un punto de corte en el nivel de expresión de 31.6, el análisis de partición recursiva discrimino dos grupos de pacientes con unos niveles de expresión elevada (n=19, 54.3%) o baja (n=16, 46.7%) de CD45. Los pacientes con unos niveles de expresión elevados de CD45 tuvieron una supervivencia libre de recidiva local significativamente superior que los pacientes con una expresión baja, tal como muestran las siguientes curvas de supervivencia.



**Figura 54.** Curva de supervivencia libre de enfermedad local (rT) en función de los niveles de expresión de CD45 en pacientes HPV-positivos.

La totalidad de los 5 pacientes HPV-positivos estuvieron incluidos en el grupo de pacientes con unos niveles de expresión elevada de CD45, y ninguno de ellos sufrió la aparición de recidiva local del tumor durante el periodo de seguimiento.

- Correlación entre los niveles de expresión de CD45 y diversas citoquinas con capacidad quimiotáctica.

Se efectuó un estudio de las correlaciones existentes entre los niveles de expresión transcripcional de una serie de citoquinas relacionadas con los procesos de quimiotaxis leucocitaria y la expresión de CD45 en las muestras de tumor. Se estudió la expresión de CXCL1, IL8, MPC-1, GCP-2 y RANTES.

La quimioquina CXCL1 (C-X-C motif ligand 1), también conocida como GRO $\alpha$ , KC, neutrophil-activating protein 3 (NAP-3) o melanoma growth stimulating activity-alpha (MSG $\alpha$ ), se encuentra codificada en humanos por el gen CXCL1. CXCL1 es expresada de forma habitual por macrófagos, neutrófilos y células epiteliales, y cuenta con una actividad quimiotáctica para los neutrófilos.

La interleuquina 8 (IL8 or chemokine (C-X-C motif) ligand 8, CXCL8) es una quimioquina producida por los macrófagos y otros tipos celulares como las células epiteliales, las células de la musculatura lisa de las vías aéreas, y el endotelio. IL8 es también conocida como factor quimiotáctico de neutrófilos. Sus funciones principales son la de inducir la quimiotaxis de células diana, principalmente neutrófilos pero también de otros granulocitos, inducir la fagocitosis, y ser un potente promotor de angiogénesis.

La CCL2 (chemokine (C-C motif) ligand 2), o MPC1 (monocyte chemoattractant protein 1), es una quimioquina que cuenta con la capacidad de reclutar monocitos, linfocitos T de memoria y células dendríticas.

CXCL6 (Chemokine (C-X-C motif) ligand 6), o GCP-2 (granulocyte chemotactic protein 2) es otra quimioquina con capacidad quimiotáctica para los neutrófilos, ejerciendo su efecto a partir de la interacción con los receptores CXCR1 and CXCR2.



Resultados

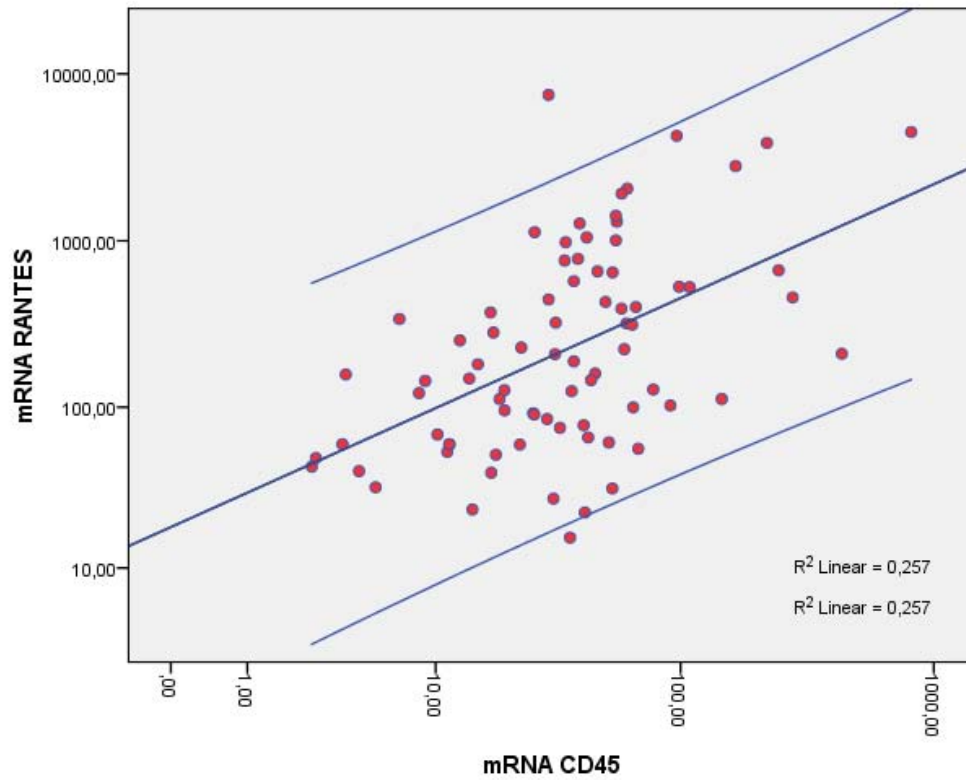
Finalmente, la CCL5 (Chemokine (C-C motif) ligand) o RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted), cuenta con la capacidad de inducir la quimiotaxis de células T, eosinófilos y basófilos, contando con una papel activo en el reclutamiento leucocitario en los focos inflamatorios (ver tabla 10).

**Tabla 10.** Correlación entre los niveles de expresión de CD45 y diversas quimiocinas con capacidad quimiotáctica.

		CD45	CXCL1	IL-8	MCP-1	GCP-2	RANTES
CD45	Coeficiente r	1	0,263*	0,121	0,106	0,101	0,406**
	Valor P		0,019	0,208	0,365	0,376	0,000
CXCL1	Coeficiente r	0,263*	1	0,609**	0,553**	0,744**	0,260*
	Valor P	0,019		0,000	0,000	0,000	0,020
IL-8	Coeficiente r	0,121	0,609**	1	0,283*	0,406**	0,165
	Valor P	0,208	0,000		0,014	0,000	0,146
MCP-1	Coeficiente r	0,106	0,553**	0,283*	1	0,472**	0,301**
	Valor P	0,365	0,000	0,014		0,000	0,009
GCP-2	Coeficiente r	0,101	0,744**	0,406**	0,472**	1	0,145
	Valor P	0,376	0,000	0,000	0,000		0,201
RANTES	Coeficiente r	0,406**	0,260*	0,165	0,301**	0,145	1
	Valor P	0,000	0,020	0,146	0,009	0,201	

Destaca el elevado nivel de correlación existente entre la expresión de CD45 y la correspondiente a RANTES.

La siguiente figura muestra la distribución en los valores de expresión de CD45 y RANTES en las muestras tumorales.

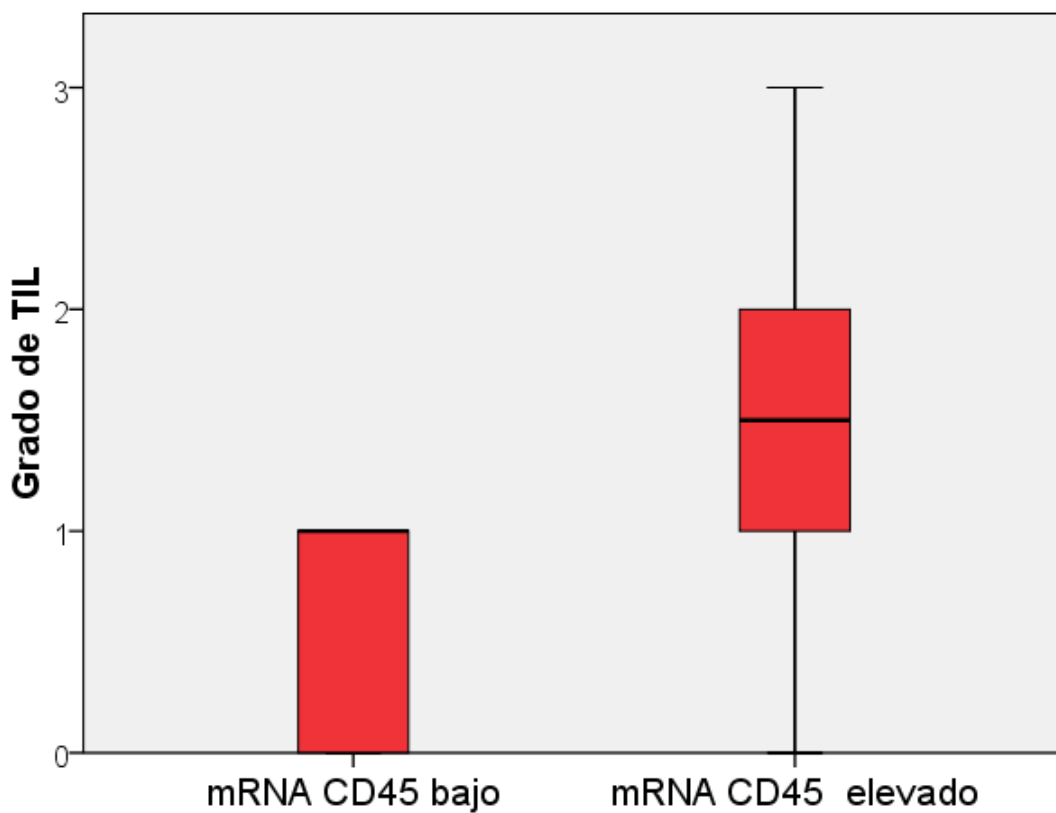


**Figura 55.** Distribución en los valores de expresión de CD45 y RANTES.

- Correlación entre la expresión transcripcional de CD45 y el TIL.

Se dispuso de un análisis del grado de infiltración por TIL para 20 de los tumores incluidos en el estudio (10 tumores incluidos en el grupo de expresión transcripcional elevada de CD45, y 10 en el grupo de expresión baja).

La siguiente figura muestra la distribución en el resultado del grado de TIL en función del nivel de expresión de CD45 (0- ausencia de infiltración linfocitaria; 1- infiltración linfocitaria leve; 2- infiltración linfocitaria moderada; 3- infiltración linfocitaria severa).



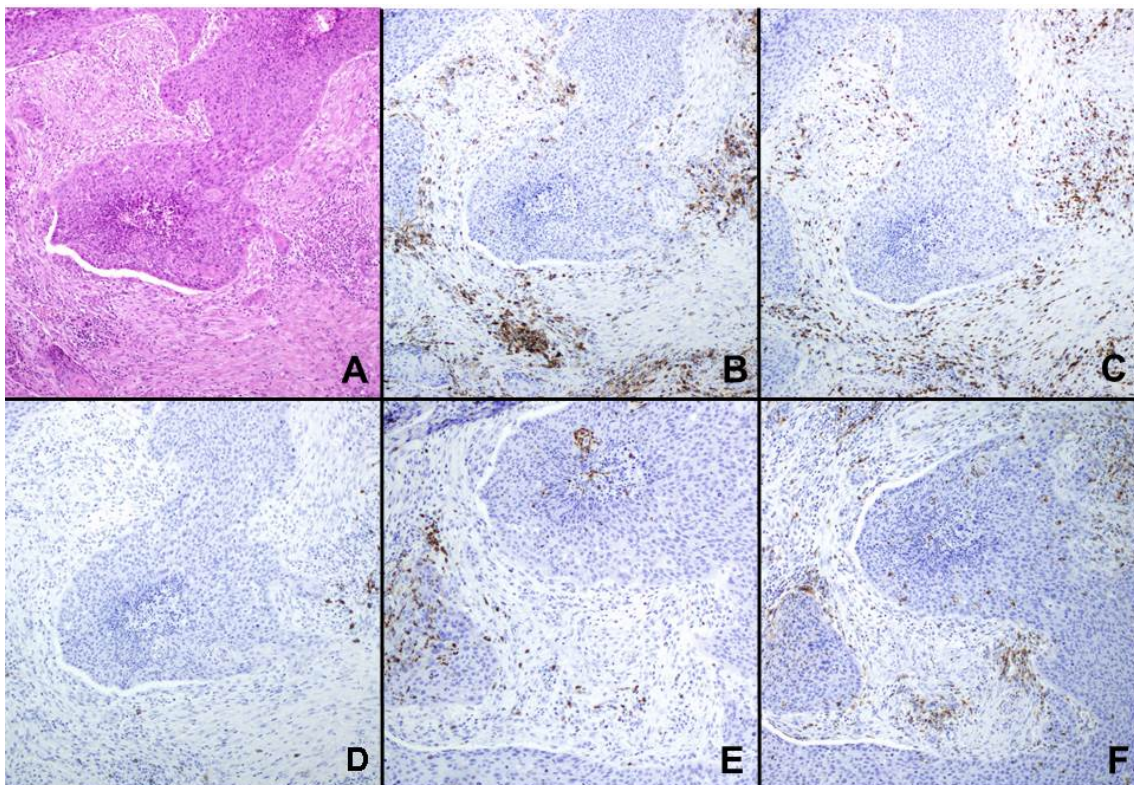
**Figura 56.** Distribución del grado de TIL en función del nivel de expresión de CD45.

Los pacientes con unos niveles de expresión de CD45 más elevados contaron con un incremento significativo en el nivel de TIL (test U Mann-Whitney, P=0.023).

-Estudio inmunohistoquímico.

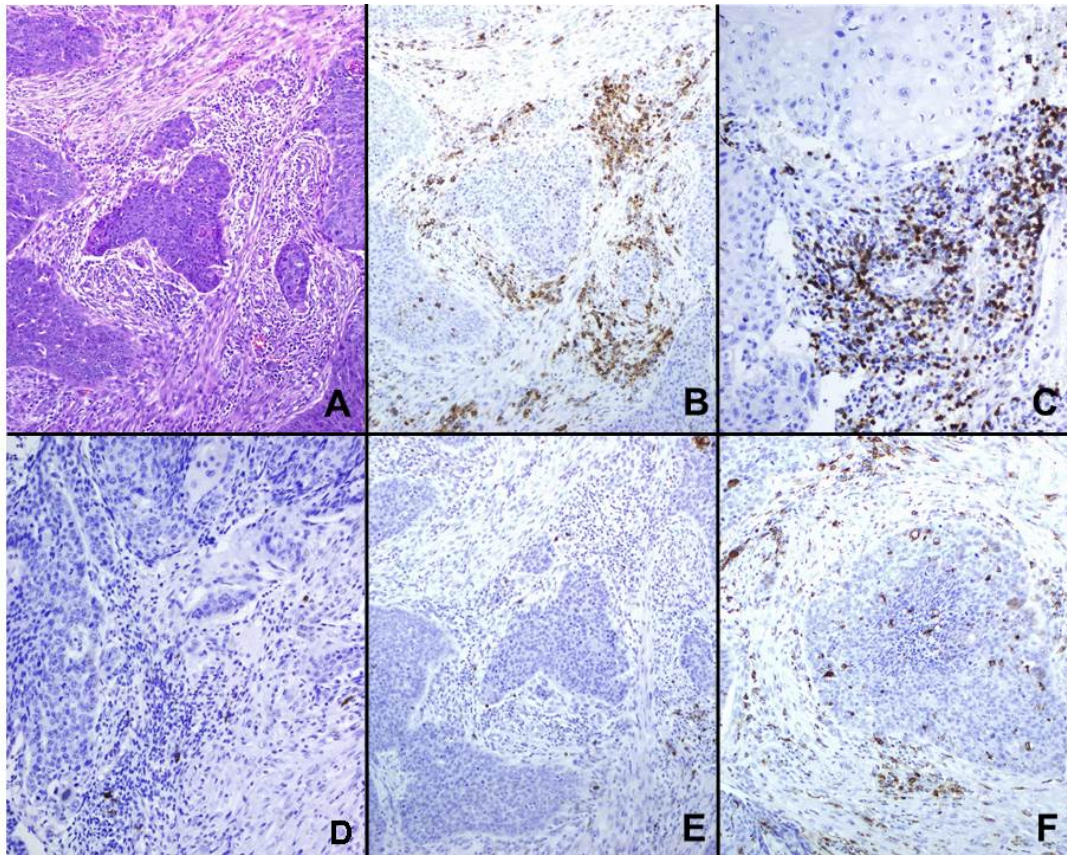
Se realizó un estudio inmunohistoquímico en 10 muestras de tumor con la finalidad de categorizar desde un punto de vista fenotípico a las células CD45+. Los resultados de este análisis mostraron como las células CD45+ se localizaban de forma preferente a nivel del estroma peritumoral, y como estas células CD45+ eran en su gran mayoría linfocitos T (CD3+), y en mucha menor medida linfocitos B (CD20+). Pudimos observar además la existencia de una infiltración por parte de neutrófilos de manera preferente a nivel del parénquima tumoral (células positiva para mieloperoxidasa), así como la presencia de algún macrófago CD68+.

Las siguientes figuras muestran dos ejemplos del estudio inmunohistoquímico realizado.



**Figura 57.** A. hematoxilina-eosina; B. CD45; C. CD3; D. CD20; E. mieloperoxidasa; F. CD68).





**Figura 58.** A. *hematoxilina-eosina*; B. *CD45*; C. *CD3*; D. *CD20*; E. *mieloperoxidasa*; F. *CD68*).

## Cohorte TCGA

- Diferencias en la expresión de genes relacionados con la infiltración leucocitaria entre las muestras de tumor y de mucosa sana.

En primer lugar se llevó a cabo una comparación entre el grado de expresión de una serie de genes relacionados con la infiltración local por diversos tipos de leucocitos en 43 muestras pareadas de tumor y de mucosa sana.

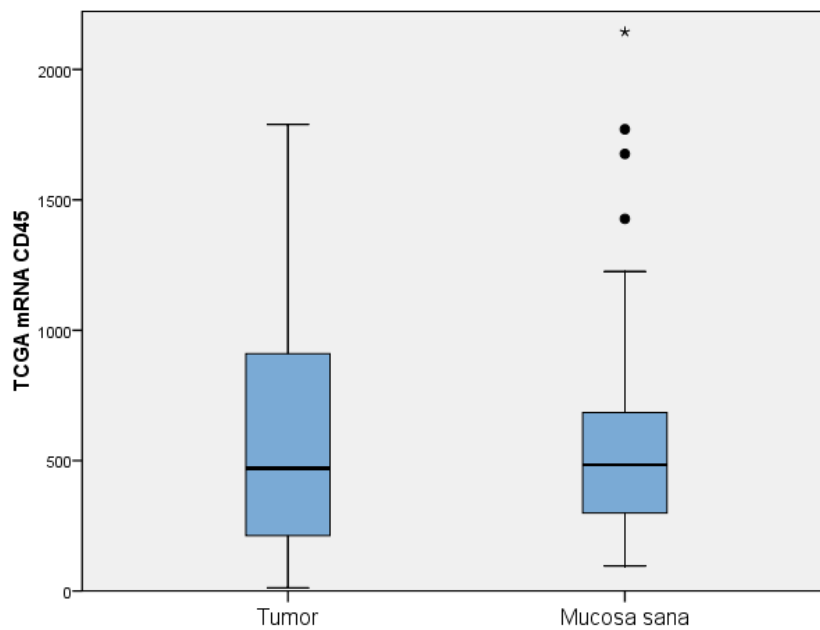
Tal como se muestra en la siguiente tabla, no aparecieron diferencias significativas en la expresión de la mayoría de los genes evaluados (Wilcoxon sign rank test).

**Tabla 11.** *Valores de expresión de genes relacionados con la infiltración leucocitaria en muestras tumorales y de mucosa sana.*

	Tumor	Mucosa sana	P
CD45	636.7	614.1	0.425
CD3D	109.3	112.0	0.241
CD3E	274.7	284.2	0.288
CD3G	32.4	33.9	0.283
CD20	28.6	41.0	0.461
CD8	244.9	196.2	0.562
CD4	867.0	718.5	0.461
CD68	3590.7	2492.6	0.002
CD66a	644.2	3609.0	0.0001
CD66b	0.160	0.325	0.351
FoxP3	127.4	53.36	0.0001

## Resultados

En concreto, no aparecieron diferencias en los niveles de expresión de CD45 entre las muestras de tumor y de mucosa sana.

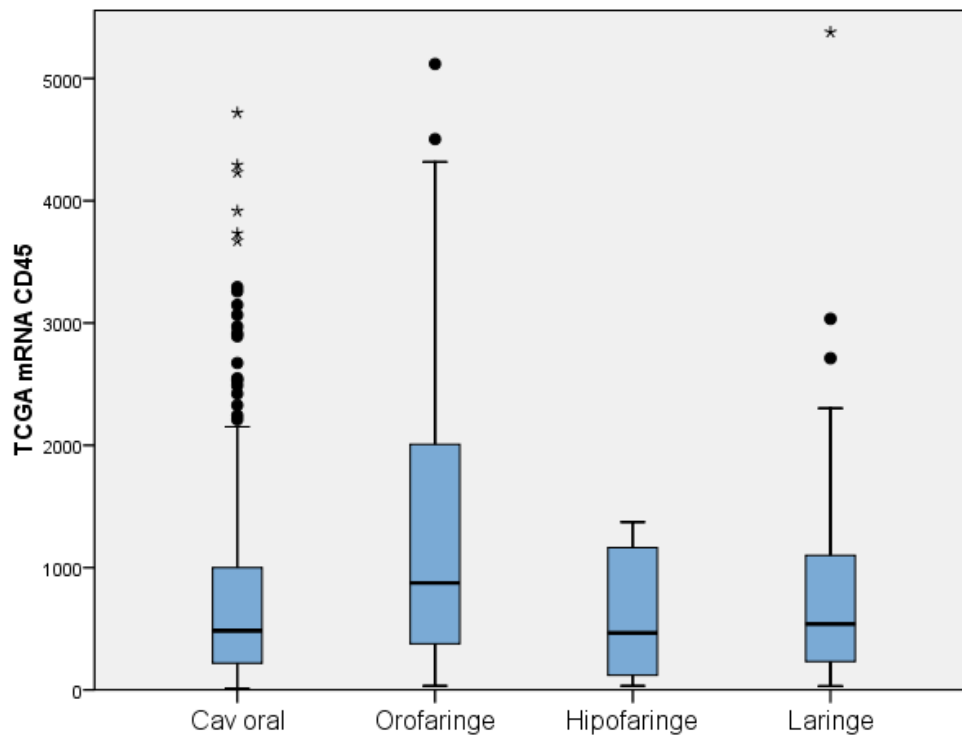


**Figura 59.** Niveles de expresión de CD45 en muestras de tumor y mucosa sana. Cohorte TCGA.

Las muestras de tumor contaron con unos niveles de expresión superiores de CD68 (macrófagos) y FoxP3 (LT reguladores), en tanto que la expresión de CD66a (neutrófilos) se mostró reducida en relación a las muestras de mucosa sana.

- Expresión transcripcional de CD45 en función de las características clínicas.

Existieron diferencias significativas en los valores de expresión de CD45 en función de la localización del tumor primario (Kruskal-Wallis test,  $P=0.0001$ ). Los tumores localizados en la orofaringe contaron con unos niveles de expresión de CD45 significativamente superiores al del resto de pacientes.

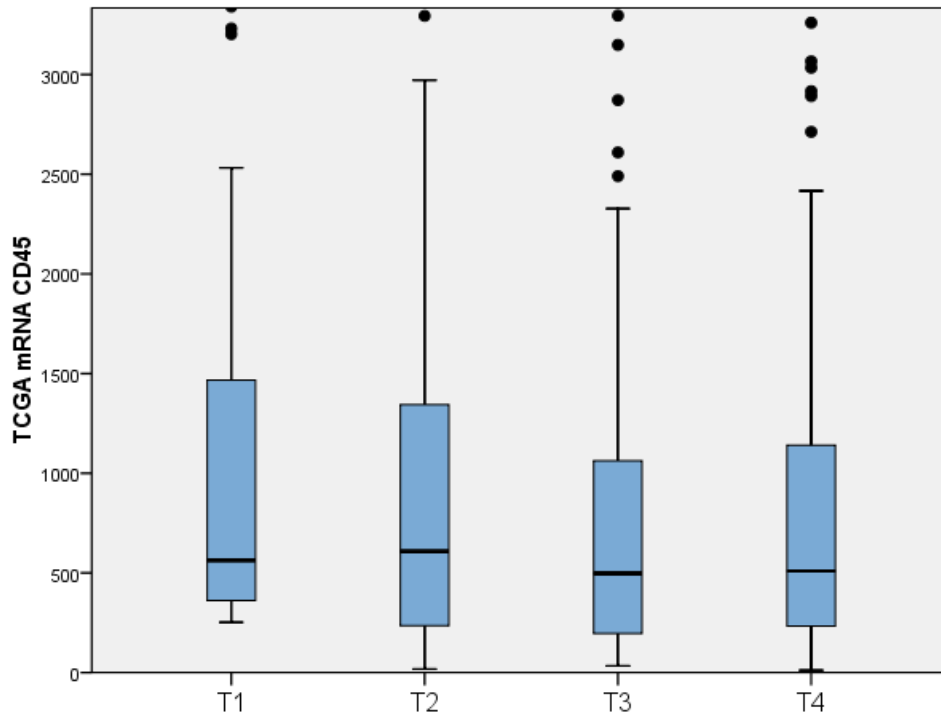


**Figura 60.** Niveles de expresión de CD45 según localización. Cohorte TCGA.

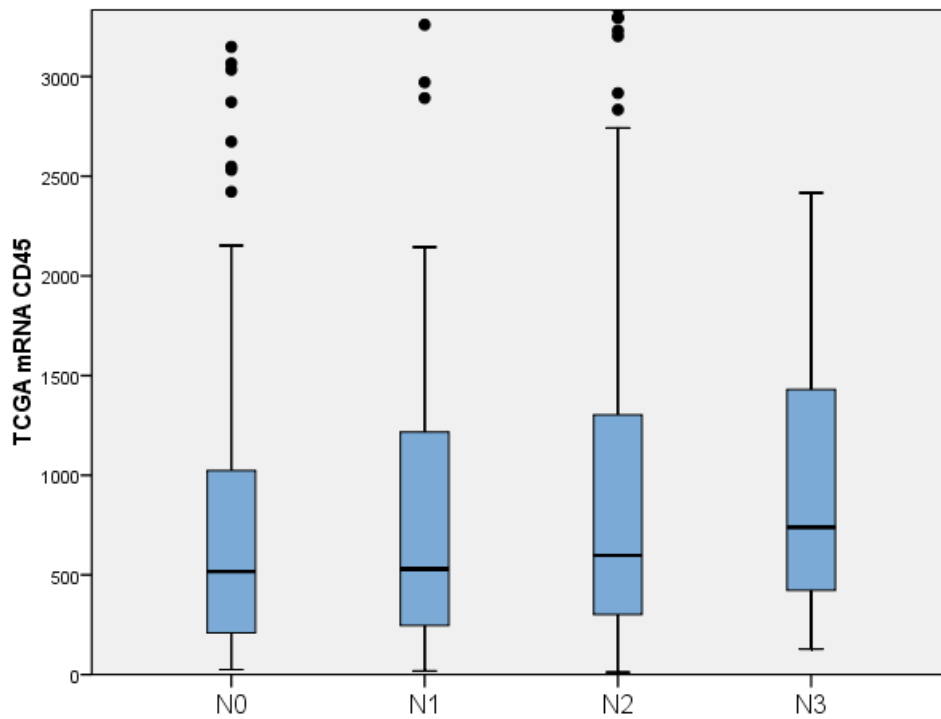
Se analizó también la expresión de CD45 en función de la extensión local y regional de la enfermedad. No aparecieron diferencias significativas en los valores de expresión transcripcional de CD45 en función de la categoría de extensión local o regional del tumor (Kruskal-Wallis test,  $P=0.127$  y  $P=0.168$ , respectivamente).



Resultados



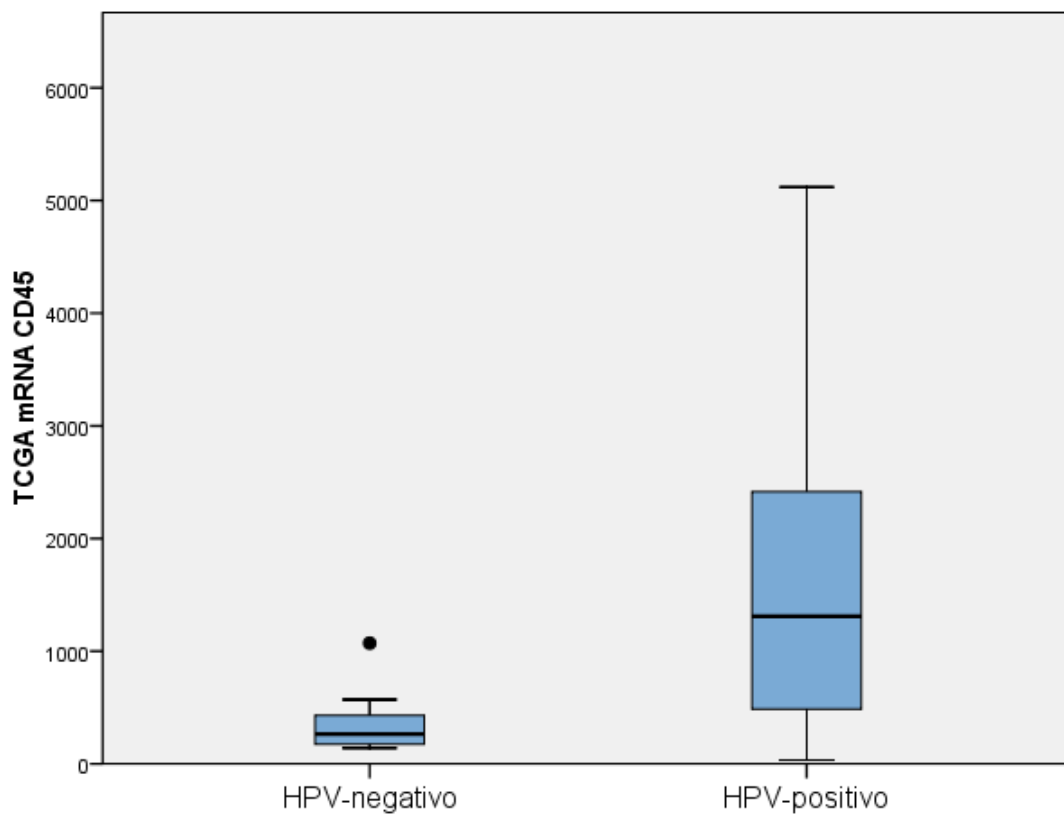
**Figura 61.** Niveles de expresión de CD45 en función de la extensión local. Cohorte TCGA.



**Figura 62.** Niveles de expresión de CD45 en función de la extensión regional. Cohorte TCGA.

- Expresión transcripcional de CD45 en función del estatus HPV para los pacientes con carcinomas de orofaringe.

Se dispuso de información relativa al estatus HPV para un total de 42 pacientes con carcinomas de orofaringe obtenida a partir de un análisis inmunohistoquímico de la expresión de p16 (estudiada en 40 pacientes) o mediante FISH (estudiada en 24 pacientes). Un 81.0% de los pacientes (n=34) contaron con tumores HPV-positivos. Los pacientes con tumores HPV-positivos tuvieron unos niveles de expresión de CD45 significativamente superiores a los correspondientes a pacientes HPV-negativos (Mann-Whitney U test,  $P=0.001$ ).



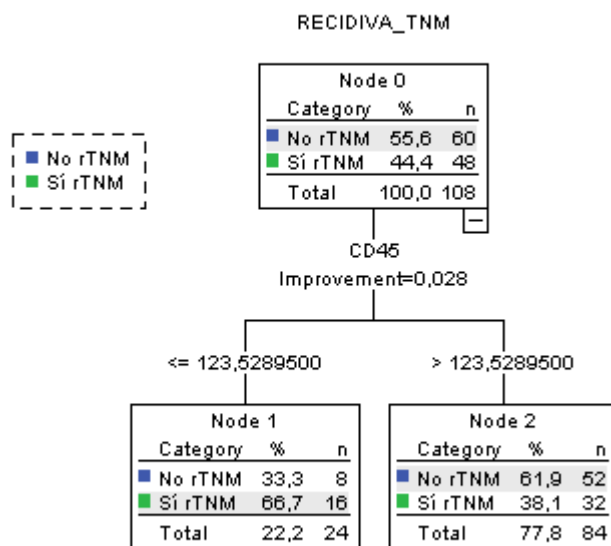
**Figura 63.** Niveles de expresión de CD45 en función del status HPV. Cohorte TCGA.

- Capacidad pronóstica de la expresión transcripcional de CD45 en los pacientes con CECC.

Para el análisis de la influencia de la expresión transcripcional de CD45 en el control de la enfermedad, se escogieron sólo aquellos pacientes para los que el TCGA proporcionaba información en relación a la existencia de recidiva local, regional o a distancia, y que contaron con un periodo mínimo de seguimiento de un año. Un total de 108 pacientes incluidos en el TCGA cumplieron con estos requisitos y son la base de la siguiente parte del análisis.

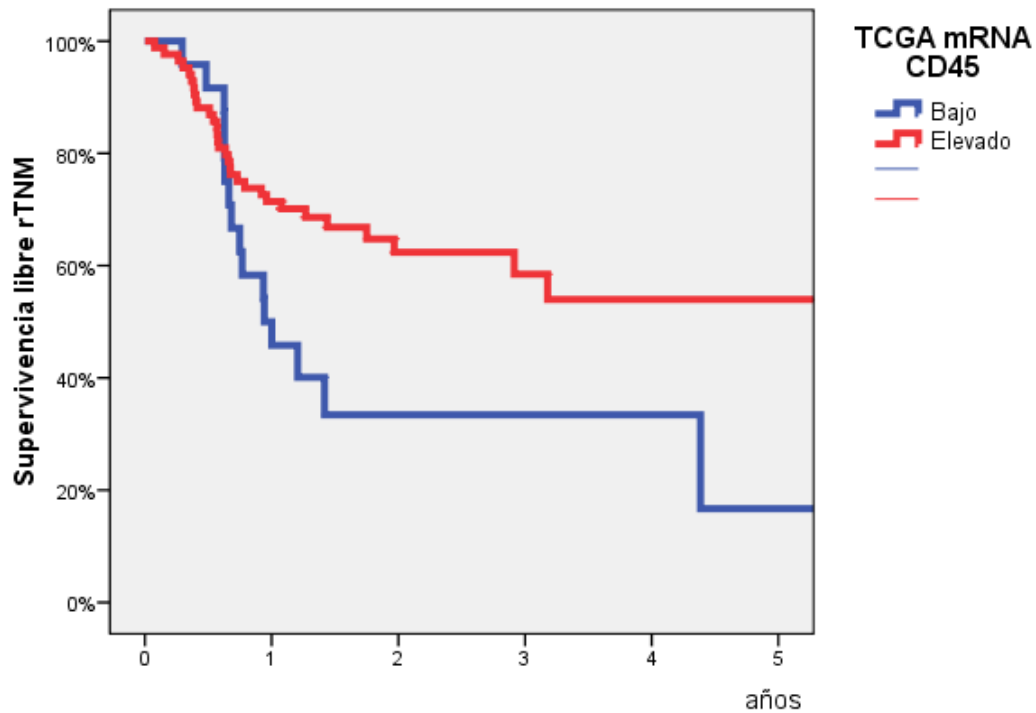
Durante el periodo de seguimiento un total de 48 de estos pacientes (44.4%) sufrieron una recidiva del tumor a nivel local, regional o a distancia de la enfermedad.

Se realizó un análisis de partición recursiva incluyendo como variable dependiente el control de la enfermedad, y como variable independiente el nivel de expresión de CD45. La siguiente figura muestra el árbol de decisión obtenido con este análisis.



Se clasificó a los pacientes con dos categorías: un grupo de pacientes con unos niveles bajos de expresión de CD45 (n=24, 22.2%), y un grupo de pacientes con unos niveles de expresión elevados (n=84, 77.8%).

La supervivencia libre de enfermedad para los pacientes con unos niveles de expresión elevados de CD45 fue significativamente superior que la correspondiente a los pacientes con unos niveles de expresión baja ( $P=0.024$ ), tal como aparece en las siguientes curvas de supervivencia.



**Figura 64.** Curva de supervivencia libre de enfermedad en función de los valores de expresión de CD45 en la cohorte TCGA.

- Correlación entre la expresión transcripcional de CD45 y la expresión de marcadores leucocitarios.

Se estudió a continuación en la totalidad de la muestra de tumores del TCGA (n=520) la correlación existente entre la expresión de CD45 y la expresión de una serie de receptores utilizados como marcadores de diferentes tipos leucocitarios. Se incluyó en el análisis un estudio de la expresión de CD3 (D,E,G), CD20, CD8, CD4, CD68, CD66a, CD66b y FoxP3 (ver tablas 12 y 13).

**Tabla 12.** *Correlación entre la expresión de CD45 y la expresión de marcadores leucocitarios.*

	<b>CD45</b>	<b>CD3D</b>	<b>CD3E</b>	<b>CD3G</b>	<b>CD20</b>	<b>CD8A</b>
<b>CD45</b>	1	,586**	,811**	,880**	,504**	,674**
		,000	,000	,000	,000	,000
<b>CD3D</b>	,586**	1	,887**	,666**	,523**	,776**
	,000		,000	,000	,000	,000
<b>CD3E</b>	,811**	,887**	1	,844**	,566**	,859**
	,000	,000		,000	,000	,000
<b>CD3G</b>	,880**	,666**	,844**	1	,411**	,787**
	,000	,000	,000		,000	,000
<b>CD20</b>	,504**	,523**	,566**	,411**	1	,252**
	,000	,000	,000	,000		,000
<b>CD8A</b>	,674**	,776**	,859**	,787**	,252**	1
	,000	,000	,000	,000	,000	

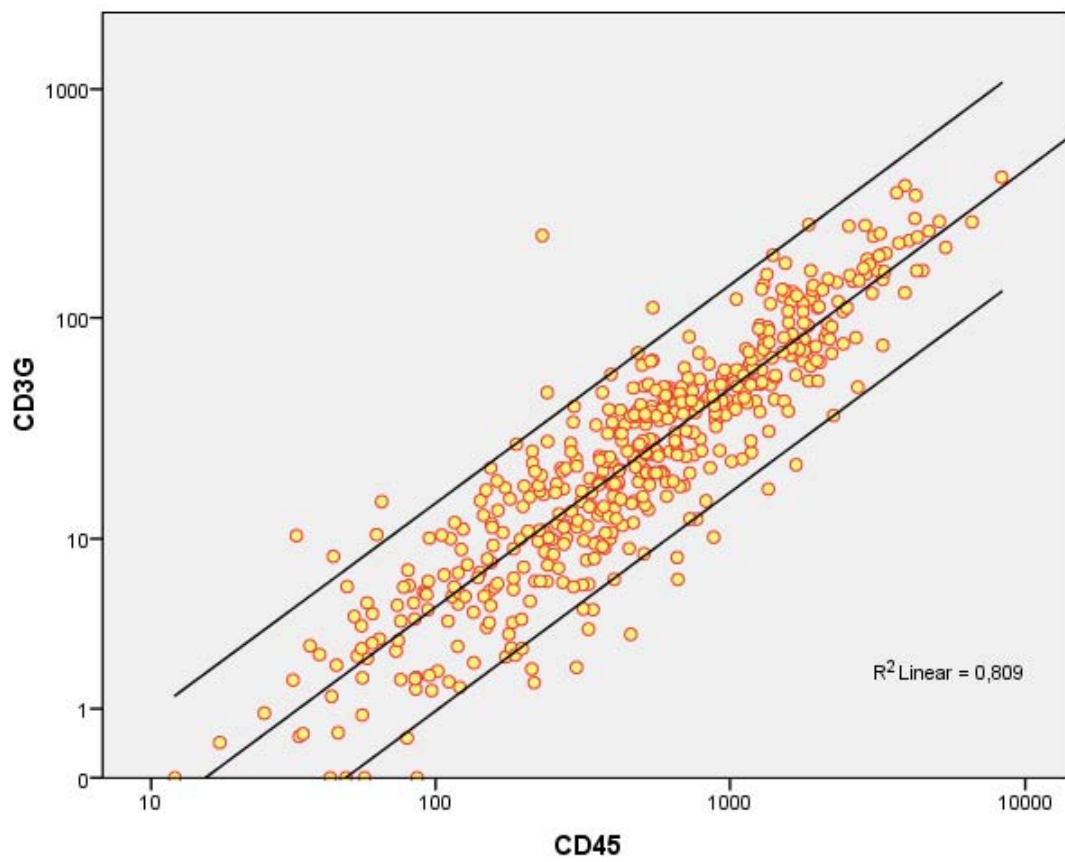
**Tabla 13.** Correlación entre la expresión de CD45 y la expresión de marcadores leucocitarios.

	CD45	CD4	CD68	CD66a	CD66b	FoxP3
<b>CD45</b>	1	,817**	,399**	,151**	,074	,773**
		,000	,000	,001	,093	,000
<b>CD4</b>	,817**	1	,586**	,090*	,021	,796**
	,000		,000	,041	,627	,000
<b>CD68</b>	,399**	,586**	1	-,011	-,012	,352**
	,000	,000		,804	,783	,000
<b>CD66a</b>	,151**	,090*	-,011	1	,101*	,106*
	,001	,041	,804		,021	,016
<b>CD66b</b>	,074	,021	-,012	,101*	1	,060
	,093	,627	,783	,021		,174
<b>FoxP3</b>	,773**	,796**	,352**	,106*	,060	1
	,000	,000	,000	,016	,174	

Aparecieron unos elevados niveles de correlación con la expresión de receptores utilizados como marcadores linfocitarios (CD3, CD20, CD8, CD4 y FoxP3), en tanto que la correlación con marcadores de macrófagos (CD68) o de granulocitos (CD66) fue notablemente inferior.

Resultados

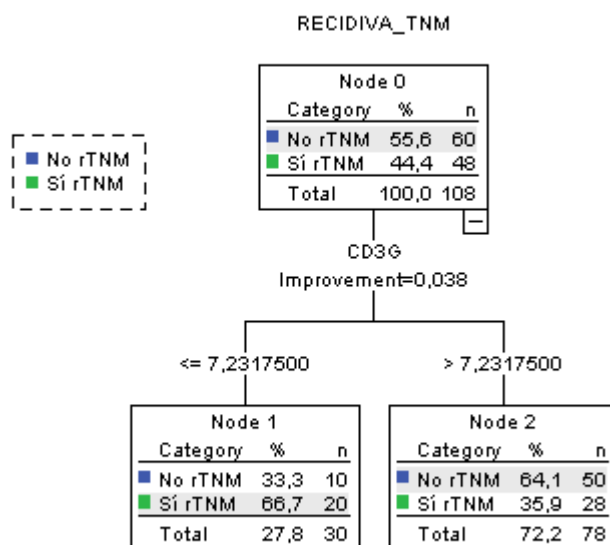
Como ejemplo, la siguiente figura muestra la correlación existente entre la expresión de CD45 y de CD3G.



**Figura 65.** Correlación entre expresión de CD45 y CD3G.

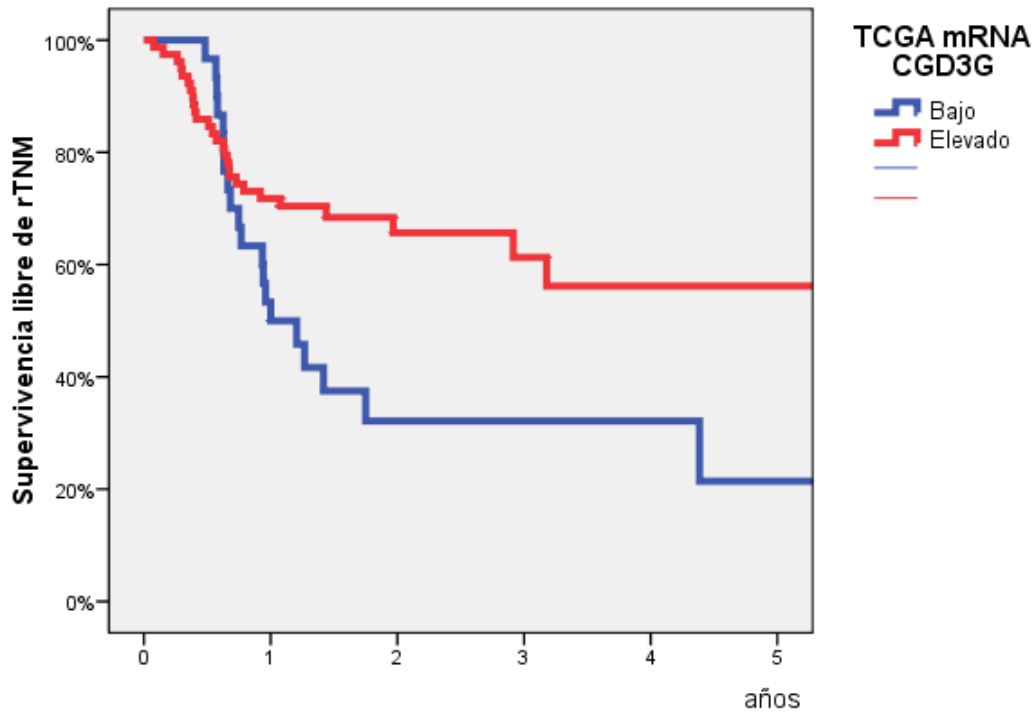
- Capacidad pronóstica de marcadores linfocitarios.

Se procedió finalmente a realizar un estudio de la capacidad pronóstica de marcadores específicos de linfocitos utilizando los pacientes del TCGA con seguimiento adecuado. Al realizar un análisis de partición recursiva considerando como variable dependiente el control de la enfermedad y como variable independiente la expresión de CD3G (marcador de linfocito T), se obtuvo un árbol de clasificación con dos grupos de pacientes con niveles de expresión baja ( $n=30$ , 27.8%) y elevada ( $n=78$ , 35.9%) de CD3G.



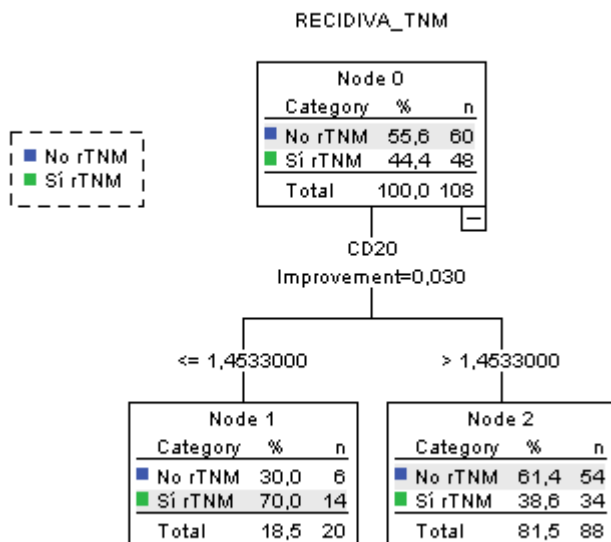
Los pacientes con una expresión baja de CD3G contaron con una supervivencia libre de enfermedad significativamente inferior a la de los pacientes con una expresión elevada ( $P=0.018$ ).



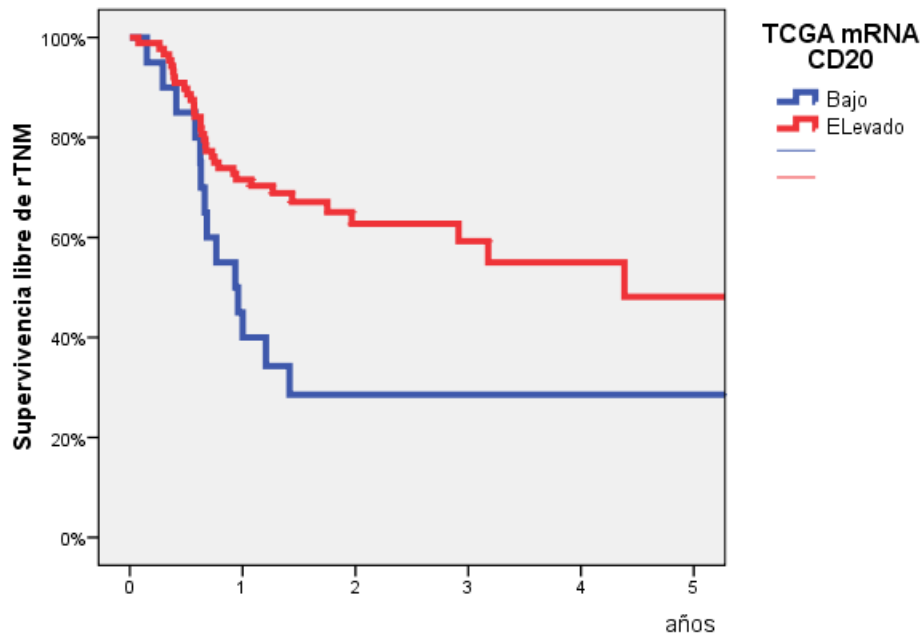


**Figura 66.** Curva de supervivencia libre de enfermedad en función de los valores de expresión de CD3G. Cohorte TCGA.

De igual manera, el análisis de partición recursiva clasificó a los pacientes en función de la recidiva de la enfermedad de acuerdo con los niveles de expresión de CD20 (marcador de linfocitos B).



La supervivencia libre de enfermedad para los pacientes con una expresión elevada de CD20 fue significativamente superior que la de los pacientes con una expresión baja.



**Figura 67.** Curva de supervivencia libre de enfermedad en función de los valores de expresión de CD20. Cohorte TCGA.

Cabe destacar la elevada correspondencia entre los pacientes incluidos en las categorías baja o elevada existente al analizar la expresión de CD45 y CD3, o de CD45 y CD20.

		CD3		Total
		Bajo	Elevado	
CD45	Bajo	20	4	24
	Elevado	10	74	84
Total		30	78	108

		CD20		Total
		Bajo	Elevado	
CD45	Bajo	11	13	24
	Elevado	9	75	84
Total		20	88	108

Por el contrario, al analizar la expresión de marcadores de granulocitos como CD66, o de macrófagos como CD68, el análisis de partición recursiva no encontró una relación significativa con el control de la enfermedad.



## **DISCUSIÓN**



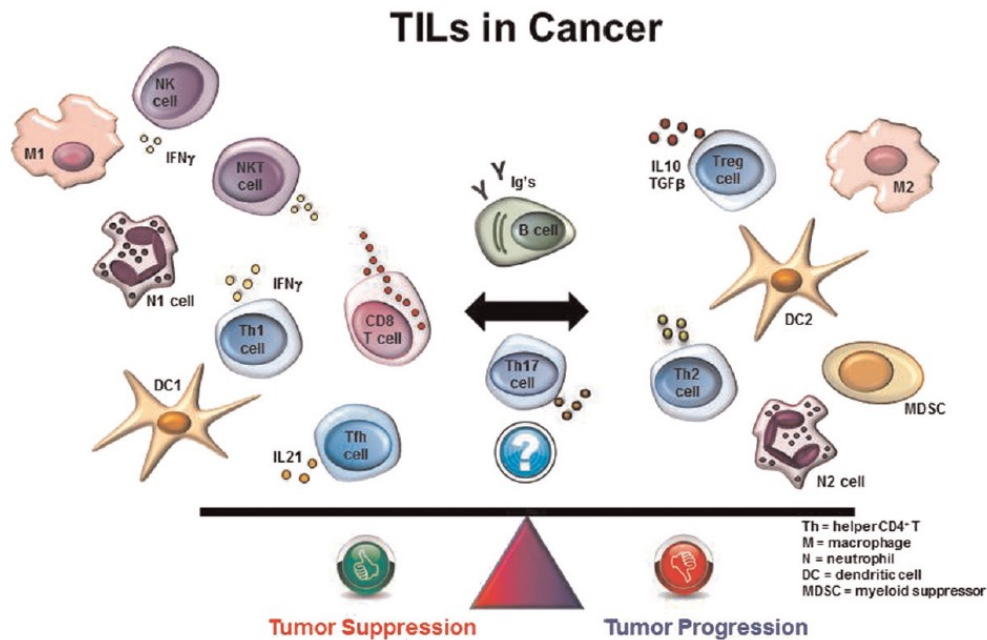
## **Discusión**

Una de las misiones fundamentales del sistema inmune es el mantenimiento de la homeostasis tisular, realizada a partir de la vigilancia continua y de la activación de los procesos de reacción inflamatoria que implican de forma coordinada la activación de las células de la inmunidad innata y la adaptativa<sup>(67)</sup>. La transformación neoplásica altera la estructura ordenada de los tejidos e induce respuestas inmunes que cuentan con la capacidad de eliminar tumores incipientes. En aquellas situaciones en las que la eliminación es incompleta, la transformación neoplásica de las células tumorales es capaz de escapar al control del sistema inmune. Este proceso se ha visto conceptualizado en base a la teoría de la inmunoedición del cáncer, que parece sustentada por un elevado número de datos experimentales y de evidencia clínica<sup>(68)</sup>. La inmunoedición define el proceso de progresión maligna en función de la interacción entre las células tumorales y del sistema inmune en tres fases: eliminación, equilibrio y escape. Los pacientes oncológicos se diagnostican habitualmente durante la fase de escape, si bien la relación entre el tumor y el sistema inmune continua evolucionando, y con ello la magnitud de la respuesta inmune antitumoral. Incluso en fases avanzadas de la enfermedad el sistema inmune cuenta con la capacidad de influir de forma directa o indirecta en la evolución del tumor, la respuesta a los tratamientos, y en consecuencia en la supervivencia de los pacientes.

Una indicación clara de la capacidad del sistema inmune en controlar la aparición de neoplasias a nivel de las mucosas de las vías aerodigestivas se encuentra en el incremento en el riesgo relativo de incidencia de este tipo de tumores en pacientes inmunodeficientes. King y cols<sup>(69)</sup> identificaron lesiones premalignas en cavidad oral en un 13% de los pacientes trasplantados renales en comparación con un 0.6% en controles pareados por edad y sexo. Otros estudios que han revisado bases de datos de pacientes trasplantados han encontrado igualmente un incremento en la incidencia de aparición de CECC, entre otros tipos de tumores<sup>(70-72)</sup>.

A nivel del microambiente tumoral es frecuente observar la presencia de células del sistema inmune, si bien la composición de este infiltrado varía de

forma notable en función del tipo de tumor y órgano afectado<sup>(73)</sup>. A partir de datos clínicos y experimentales han asociado diferentes subtipos leucocitarios con una actividad pro- o anti-tumoral.



**Figura 68.** Células del sistema inmune en el microambiente tumoral (tomada de Galon<sup>69</sup>)

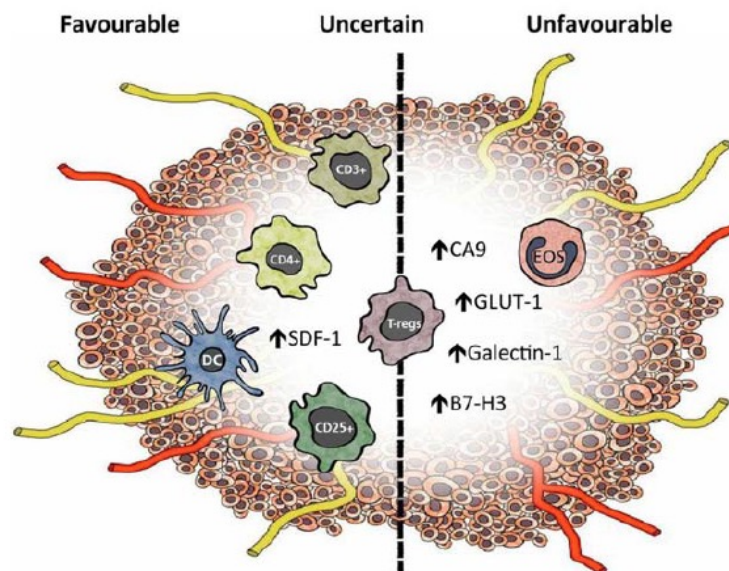
Existen evidencias que señalan que la inmunidad adaptativa mediada por linfocitos T y B proporciona las bases críticas sobre las que descansa una respuesta anti-tumoral efectiva. Los diferentes subtipos linfocitarios cuentan con roles distintos en relación a la respuesta al tumor. En una reciente revisión del papel de la infiltración inmune en los tumores sólidos, Senovilla y cols<sup>(74)</sup> describieron la existencia de una distribución heterogénea de los diferentes subtipos celulares a nivel del microambiente tumoral: los neutrófilos, mastocitos, macrófagos y células supresoras mieloides aparecían de forma preferente infiltrando las células tumorales, en tanto que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> se congregaban a nivel del margen de infiltración tumoral.

Considerando el conjunto de células que componen el infiltrado inmune, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos son considerados como el elemento efector más efectivo contra las células tumorales, contando con la capacidad de reconocer y destruir tanto in vivo como in vitro a las células del tumor<sup>(75)</sup>. Los linfocitos T

CD4+ pueden ser subdivididos en dos categorías: las células T-helper, que cuentan con la capacidad de incrementar la actividad de los linfocitos T CD8+ citotóxicos, y los linfocitos reguladores T-reg (CD4+/CD25+/FoxP3+), que favorecen un microambiente inmunosupresor a través de interacciones celulares y la secreción de un repertorio de citoquinas.

Otros elementos presentes en el microambiente tumoral son los linfocitos B, que cuentan con capacidad presentadora de antígeno y un papel de inmunoregulación a partir de la secreción de citoquinas y quimioquinas que inducen la respuesta de los linfocitos T<sup>(76)</sup>; las células dendríticas, que forman un nexo de unión entre los sistemas inmunes innato y adaptativo; las células natural killer, que son una clase de linfocitos del sistema inmune innato que reconocen y suprimen células infectadas por virus o células tumorales; los macrófagos, que en función de que se hayan activado a través de una vía “clásica” o “alternativa” cuentan con un papel antitumoral o protumoral<sup>(77)</sup>; o los eosinófilos, que contribuyen a la progresión tumoral<sup>(78)</sup>.

Recientemente, Wallis y cols<sup>(79)</sup> realizaron un estudio del papel del sistema inmune en el microambiente tumoral en los CECC, revisando la participación de los diferentes elementos en relación con la progresión de la enfermedad.



**Figura 69.** Diagrama con los parámetros inmunes relacionados con el resultado clínico en los CECC. Los parámetros individuales se colocan sobre una masa tumoral con los vasos sanguíneos asociados y canales linfáticos. La posición del parámetro depende de su pronóstico asociado (es decir, favorable, desfavorable o incierta) (tomada de Wallis <sup>61</sup>).



Son varios los mecanismos por los cuales los CECC consiguen evadir el control del sistema inmune (revisado en Young y cols<sup>(80)</sup>). Algunos de estos mecanismos incluyen la actividad inmunosupresora de las células mieloides supresoras, la disminución en los niveles de expresión de los HLA clase I por parte de las células tumorales, la apoptosis inducida por el tumor de los linfocitos T, la actividad de los linfocitos T-reg, y la expresión de galectina-1 por parte de las células tumorales.

### **Estado actual del análisis del TIL en los pacientes con CECC**

El hecho de que la mayoría de estudios en relación a la capacidad pronóstica del TIL se realicen a partir del conteo o la valoración del grado de infiltración en preparaciones histológicas con H&E o con diferentes inmunohistoquímicas añade una variabilidad determinada por el muestreo de las zonas del tumor en las que se realiza la valoración, y el componente subjetivo inherente a la interpretación de los resultados histológicos.

Uno de los modelos tumorales en los que la evaluación de TIL está ganando una mayor importancia clínica como biomarcador inmunológico es en el carcinoma de mama. Recientemente el TILs Working Group ha establecido una serie de recomendaciones para la valoración del TIL en pacientes con carcinomas de mama<sup>(81)</sup>.

1. El TIL debería cuantificarse a nivel del compartimento estromal (% TIL estromal). El denominador utilizado para la determinación es el área de tejido estromal (área ocupada por células inflamatorias mononucleares sobre el total del área estromal intratumoral), no el número de células estromales.
2. El TIL debería ser evaluado dentro de los bordes de tumor invasivo.
3. Excluir los TIL fuera de los márgenes del tumor.
4. Excluir el TIL en zonas de tumor con artefactos por compresión, necrosis o hialinización.

5. Todas las células mononucleadas (incluyendo los linfocitos y las células plasmáticas) deberían ser valoradas, excluyendo los leucocitos polimorfonucleares.
6. Es suficiente una sección por paciente (4-5µm, magnificación x200-400).
7. Es preferible estudiar secciones completas del tumor que piezas de biopsia.
8. Llevar a cabo una valoración del promedio de TIL en el área tumoral, evitando cuantificar únicamente las áreas de elevada positividad.
9. La cuantificación como un valor continuo ofrece información biológica más relevante que la valoración cualitativa o semicuantitativa.

Tal como se estableció en la introducción, los datos disponibles de la relación existente entre el grado de TIL y el control de la enfermedad no son definitivos. Una de las mayores limitaciones al analizar la literatura publicada es que las series evaluadas son con frecuencia limitadas, incluyendo diferentes perfiles de pacientes, y determinando el grado de TIL de maneras muy diversas, habitualmente haciendo uso de diferentes técnicas de inmunohistoquímica.

La siguiente tabla resume los resultados obtenidos hasta el momento en relación a la capacidad pronóstica del TIL en los pacientes con un CECC.

**Tabla 14.** Resultados de diferentes estudios que relaciona la capacidad pronóstica del TIL en pacientes con CECC.

<b>Autor</b>	<b>Localización</b>	<b>Nº</b>	<b>Conclusiones</b>
Le(82)	CECC	101	La expresión de CD3 se relaciona con una mayor supervivencia
Badoual(22)	CECC	84	Infiltración por CD4 mejora el pronóstico. CD8 carece de capacidad predictiva
Sun(83)	CECC	83	CD4 y FoxP3 se relaciona con peor supervivencia libre de recidiva
Ritta(84)	CECC	71	No relación entre CD3 y Treg con el pronóstico
Loose(21)	CECC	35	CD4 y CD25 se correlacionan con una mejor supervivencia
Rusell(23)	CECC	32	FoxP3 relacionado con mejor supervivencia

Balermipas(24)	CECC	101	CD3 y CD8 relacionados con mejor pronóstico. Ausencia de capacidad pronóstica para CD4 y FoxP3
Nguyen(26)	CECC	278	CD4, CD8 y FoxP3 se relacionan con mejor supervivencia
Berinstein(38)	CECC	25	CD3 se relaciona con mejor supervivencia
Branwein(85)	Cav oral	259	TIL bajo en la interfase tumor/estroma se asocia a recidiva local
Watanabe(34)	Cav oral	87	CD8 y relación CD8/CCR4 Treg se relacionaron con mejor supervivencia
Liang(86)	Cav oral	81	FoxP3 relacionado con una peor supervivencia
Tabachnyck(87)	Cav oral	58	CD8/FoxP3 ratio relacionado con mejor supervivencia. CD8 sin relación pronóstica
Cho(43)	Cav oral	45	No relación de CD8 o CD4 con el pronóstico
Zancope(33)	Cav oral	25	CD8 se relaciona con mejor supervivencia
Moreira(88)	Cav oral	18	CD4 asociado con mejor supervivencia y CD25 con peor supervivencia. No relación con FoxP3
Wolf(35)	Cav oral	39	CD8 relacionado con recidiva
Distel(36)	Orofaringe	115	CD8 y CD20 relacionados con mejor supervivencia
Näsman(29)	Orofaringe	83	CD8 y ratio CD8/FoxP3 relacionados con mejor pronóstico
Rajjoub(27)	Orofaringe	48	CD3 relacionado con mejor supervivencia
Wansom(28)	Orofaringe	46	CD4 y CD8 relacionados con mejor supervivencia
Pretscher(37)	Orofaringe	33	No relación del TIL con pronóstico
Nodfors(30)	Orofaringe	280	CD8 relacionado con mejor supervivencia. Ausencia de capacidad pronóstica de CD4
Ward(39)	Orofaringe	274	Relación de TIL (H&E) con una mejor supervivencia
Jung(40)	Orofaringe	144	CD8 relacionado con mejor supervivencia
Lee(32)	Orofaringe	53	No capacidad pronóstica de CD8 o CD4. La ratio CD8/CD4 se relaciona con una mejor supervivencia
Gabriel(89)	Laringe	43	CD45 relacionado con N0. No relación de TIL con supervivencia

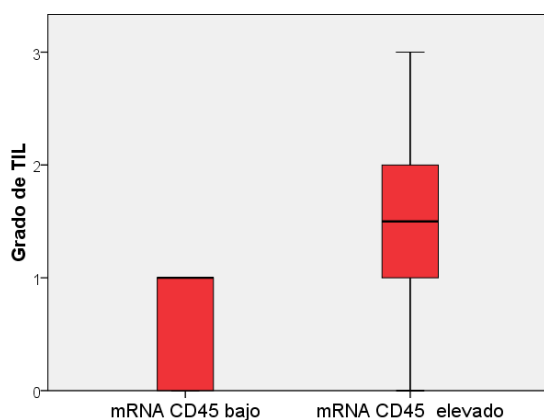
### **Correlación entre expresión transcripcional de CD45 y TIL**

Una alternativa al uso de técnicas histológicas sería la valoración del TIL de forma indirecta a partir del análisis de los niveles de expresión de genes expresados de forma selectiva por parte de los linfocitos.

En el presente estudio llevamos a cabo un análisis del nivel de expresión transcripcional de CD45, una proteína de membrana con actividad tirosin-fosfatasa que se encuentra presente en todos los leucocitos, si bien se expresa de forma preferente a nivel de los linfocitos, estimándose que llega a ocupar hasta un 10% del área de la superficie celular de los mismos<sup>(90)</sup>.

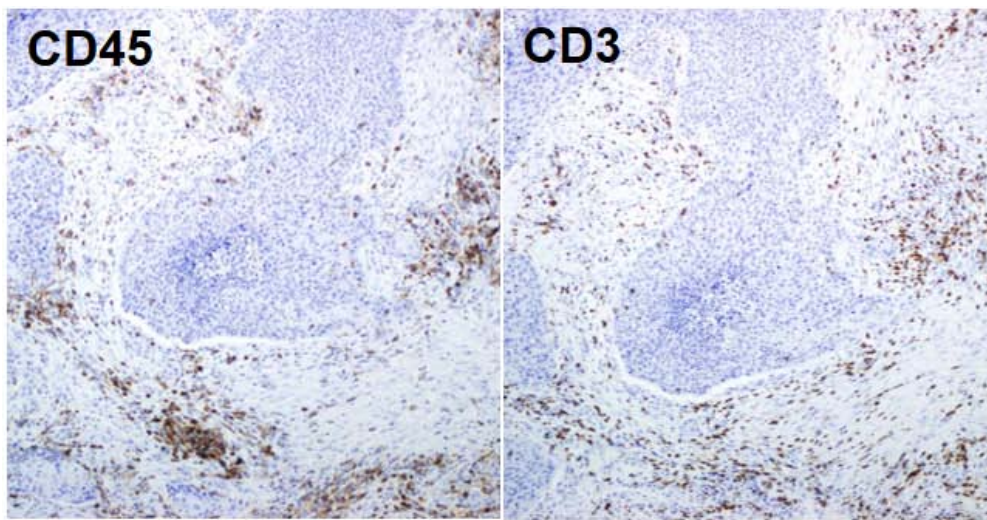
Una de las principales limitaciones del presente estudio es la falta de especificidad de CD45 como marcador linfocitario. En consecuencia, dedicamos una parte del estudio a demostrar la existencia de una relación significativa ente la expresión de CD45 a nivel transcripcional y el grado de infiltración por TILs.

En una primera aproximación, realizamos una correlación entre la expresión transcripcional de CD45 y un análisis “tradicional” del TIL a partir de la evaluación semicuantitativa del grado de infiltración linfocitaria de preparaciones histológicas teñidas con H&E. El resultado de este análisis nos permitió demostrar la existencia de una correlación significativa entre la expresión transcripcional de CD45 y el grado de infiltración linfocitario. Los tumores con una expresión elevada de CD45 contaron con un grado de TIL significativamente superior que los tumores con una expresión baja ( $P=0.023$ ).



**Figura 70.** Niveles de expresión transcripcional de CD45 y el grado de infiltración linfocitario ( $P=0.023$ ).

Además, se realizó un estudio inmunohistoquímico para caracterizar el subtipo celular correspondiente a las células CD45+. El resultado demostró como los elementos celulares CD45+ presentes en el estroma peritumoral eran de forma muy preferentes linfocitos T (CD3+), en tanto que los elementos celulares CD45+ infiltrando las células tumorales eran mayoritariamente macrófagos (CD68+).



**Figura 71.** Estudio inmunohistoquímico donde se observa predominancia de los elementos celulares CD45+ de los linfocitos T (CD3+) en el estroma peritumoral.

Estos hallazgos están plenamente de acuerdo con los de la literatura, que señala como la infiltración linfocitaria aparece de forma preferente a nivel del estroma asociado al tumor.

Además se analizó el perfil de expresión transcripcional de una serie de citoquinas con actividad quimiotáctica para los leucocitos. Se pudo observar como existió una correlación significativa entre la expresión de CD45 y RANTES (CCL5), que cuenta con capacidad de atraer a los linfocitos T. No existía correlación entre la expresión de CD45 y el resto de citoquinas analizadas, CXCL1, IL8, MPC-1 y GCP-2, con una actividad quimiotáctica preferente para los neutrófilos y los monocitos. Si bien éste es un dato muy indirecto, pensamos que el hecho de que la única citoquina con capacidad quimiotáctica que se correlacionó con la expresión de CD45 fuese la que cuenta con una actividad reclutadora de linfocitos T es un argumento más que refuerza la asociación entre la expresión transcripcional de CD45 y el TIL.

Otro argumento a favor de la correlación entre expresión de CD45 y TIL lo obtuvimos del análisis de la expresión de una serie de genes expresados de forma diferencial por los diferentes subtipos leucocitarios a partir de los resultados contenidos en TCGA. Pudimos observar unos elevados niveles de correlación entre la expresión transcripcional de CD45 y la de genes que codifican proteínas consideradas como marcadores específicos de linfocitos T (CD3) y B (CD20), así como con marcadores específicos de subtipos celulares incluyendo los linfocitos T citotóxicos (CD8), linfocitos T helper (CD4) o reguladores (FoxP3). Por el contrario, el nivel de correlación con marcadores de otras líneas celulares como los macrófagos (CD68) fue inferior, o inexistente en el caso de marcadores de neutrófilos (CD66). Pensamos que toda esta información viene a reforzar nuestra hipótesis de que un nivel de expresión transcripcional elevado de CD45 se corresponde con un grado de infiltración por TIL igualmente elevado.

No hemos encontrado en la literatura estudios que de una manera explícita analicen la existencia de una correlación entre la expresión transcripcional de CD45 y el grado de TIL. Sin embargo, a partir de los hallazgos directos e indirectos obtenidos en nuestra muestra de pacientes y en los datos incluidos en el TCGA, consideramos que existe una base suficiente para considerar que aquellos tumores que cuentan con una expresión transcripcional elevada de CD45 cuentan con un mayor infiltrado linfocitario, y viceversa.

En caso de que este concepto sea validado y reproducible, abre las puertas a la posibilidad de utilizar análisis de expresión transcripcional para la cuantificación de un parámetro morfológico como es el grado de TIL, permitiendo una valoración objetiva de este parámetro. Este modo de determinación del TIL permitiría obviar una de las fuentes de variabilidad asociada a la valoración clásica del TIL, como es el grado de subjetividad existente en una cuantificación observacional. Por el contrario, no mejora la otra gran causa de variabilidad como es la dependiente del muestreo del tumor. Dado que los tumores son estructuras histológicamente heterogéneas, no podemos asegurar uniformidad en relación con los niveles de TIL cuantificados a partir de una muestra de biopsia.

### **Variabilidad de los niveles de expresión de CD45 en función de variables clínicas.**

Se efectuó un análisis del grado de expresión de CD45 en función de variables clínicas como la localización de tumor, el grado de extensión local o regional de la enfermedad, o el grado de diferenciación histológica. Cabe destacar que en la cohorte HSP no se apreciaron diferencias significativas para ninguna de las variables analizadas. Sin embargo, en el caso de la cohorte TCGA sí que pudo apreciarse cómo los pacientes con tumores localizados en la orofaringe contaron con un incremento significativo en la expresión de CD45, en tanto que no se apreciaron diferencias en base a la extensión local o regional de la enfermedad.

Pensamos que la ausencia de diferencias en la expresión de CD45 en función de la extensión del tumor es un hallazgo especialmente trascendente. Sería un indicio de que, si consideramos la expresión de CD45 como un marcador subsidiario de la infiltración por linfocitos, la composición del microambiente tumoral a nivel linfocitario no se modifica con la expansión y el crecimiento del tumor, si no que vendría determinado por las características biológicas intrínsecas de cada uno de los tumores desde el momento inicial.

Se pudo determinar el estatus HPV para una muestra de tumores tanto de la cohorte HSP como de la cohorte TCGA, y en ambos casos se pudo constatar como los tumores HPV-positivos contaron con un nivel de expresión de CD45 superior a los HPV-negativos: En el caso de la cohorte HSP las diferencias no alcanzaron la significación estadística, posiblemente como consecuencia del escaso porcentaje de pacientes con tumores HPV-positivos existentes en nuestro entorno.

Una gran cantidad de estudios coinciden en señalar como los carcinomas de orofaringe HPV-positivos cuentan con una infiltración por TIL significativamente superior a la correspondiente a los HPV-negativos<sup>(23, 26-30, 40, 84)</sup>. Nuestros resultados en relación a la expresión del CD45 vendrían a corroborar de forma indirecta estas diferencias en relación a la infiltración linfocitaria en función del estatus HPV, y serían un argumento más en reforzar la hipótesis de que la expresión transcripcional de CD45 se correlaciona con el grado de infiltración linfocitaria.



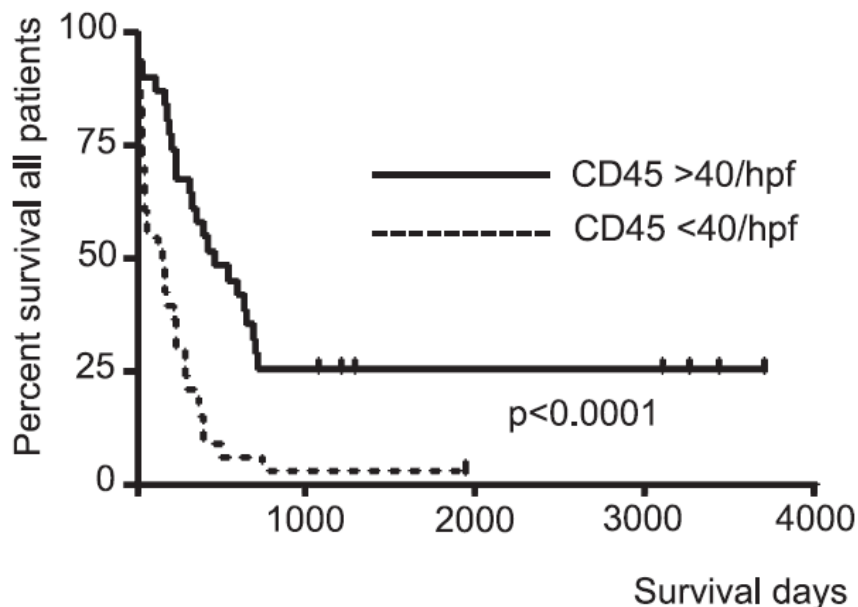
Pensamos que las diferencias existentes en la cohorte TCGA en los niveles de expresión de CD45 en función de la localización del tumor primario serían una consecuencia del incremento en el nivel de expresión en los tumores HPV-positivos. Hasta un 81% de los pacientes con carcinomas de orofaringe en la cohorte TCGA fueron HPV-positivos, lo que unido al incremento en el nivel de expresión en estos tumores del CD45 justificarían el incremento en el global de pacientes con carcinomas de orofaringe en la expresión de CD45. La principal diferencia con la cohorte HSP es que el porcentaje de tumores HPV-positivos en nuestro centro fue muy escaso, por lo que el incremento de expresión de los tumores HPV-positivos no incrementó de forma significativa el nivel de expresión del global de pacientes con carcinomas de orofaringe.



### **Capacidad pronóstica de la expresión transcripcional de CD45**

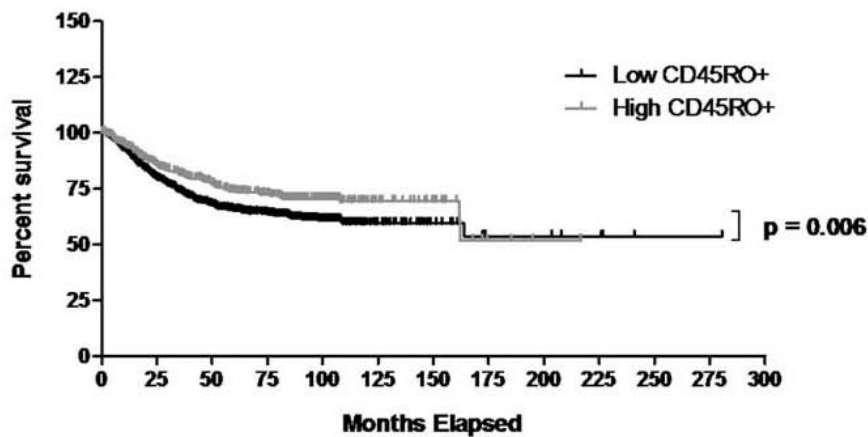
La principal conclusión de nuestro estudio es que la expresión transcripcional de CD45 a nivel del tumor primario cuenta con una capacidad pronóstica significativa para los pacientes con un CECC. En nuestro conocimiento, no existen en la literatura estudios que hayan analizado la relación entre la expresión de CD45 y el control de la enfermedad en los CECC.

A partir de estudios inmunohistoquímicos se ha descrito cómo los pacientes con una expresión elevada de CD45 contarían con un mejor pronóstico en otros modelos tumorales. En pacientes con carcinomas pulmonares de célula pequeña, Wang y cols<sup>(91)</sup> encontraron que el infiltrado por células CD45+ se relacionó con un incremento significativo en la supervivencia.



**Figura 72.** Supervivencia global en relación con el infiltrado de células CD45+ en pacientes con carcinomas pulmonares de células claras (tomada de Wang<sup>73</sup>).

Por su parte, en un estudio realizado en pacientes con carcinoma colo-rectal, Chew y cols<sup>(92)</sup> describieron un incremento significativo en la supervivencia para aquellos pacientes con unos niveles de expresión superiores de CD45.



**Figura 73.** Supervivencia global en relación con el infiltrado de células CD45+ en pacientes con carcinoma colo-rectal (tomada de Chew<sup>74</sup>).

Tal como quedó de manifiesto en la introducción, son numerosos los estudios que han encontrado una relación entre el grado de infiltración linfocitaria a nivel del tumor y el pronóstico de la enfermedad en pacientes con CECC. Varios autores han encontrado cómo el grado de infiltración por TIL se relacionaba con la supervivencia de la enfermedad<sup>(28, 38, 39)</sup>. Además, Ward y cols<sup>(39)</sup> demostraron que la evaluación del grado de infiltración por TIL analizado a partir de preparaciones teñidas con H&E contó con una capacidad pronóstica semejante a la obtenida al utilizar estudios inmunohistoquímicos.

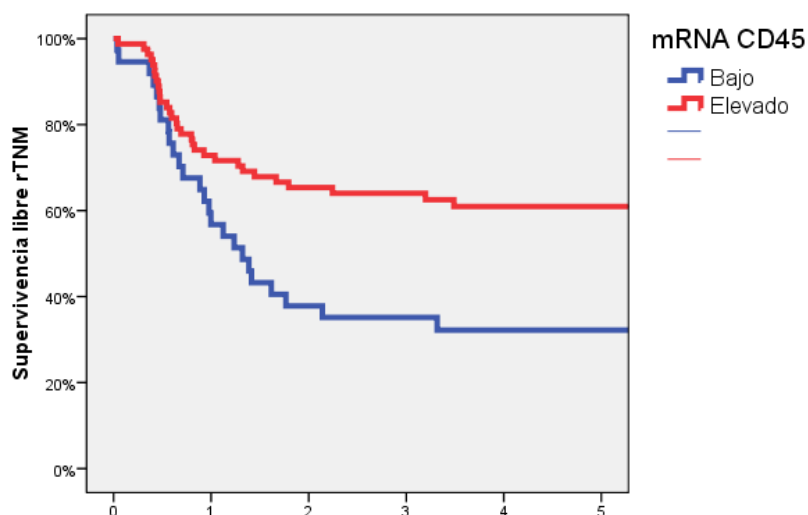
Esta mejoría en la capacidad pronóstica se ha asociado especialmente a la infiltración por parte de linfocitos T (CD3+)<sup>(24, 25, 27, 38)</sup>, si bien en algunos estudios realizados en pacientes tratados preferentemente de forma quirúrgica no apareció esta relación<sup>(23, 89)</sup>. Entre los diferentes subtipos celulares, la gran mayoría de estudios encontraron una relación entre la infiltración por linfocitos T citotóxicos (CD8+) y un mejor control de la enfermedad y un incremento en la supervivencia<sup>(23-26, 29, 30, 33-36)</sup>, en tanto que la infiltración por linfocitos T helper (CD4+) se ha asociado con una mejora<sup>(26, 35)</sup> o una ausencia en la capacidad pronóstica<sup>(24, 25, 30, 43)</sup>, en tanto que la infiltración por linfocitos T reguladores (FoxP3) se asoció con una mejora pronóstica<sup>(22, 23, 26, 28)</sup>, ausencia de beneficio clínico<sup>(24, 37)</sup>, en incluso con un deterioro en el control de la enfermedad<sup>(83, 87)</sup>. Para algunos autores el valor de la ratio CD8+/CD4+<sup>(32, 35)</sup> o CD8+/FoxP3+<sup>(29, 87)</sup> sería el parámetro que se relacionaría de forma significativa con la

## Discusión

supervivencia de los pacientes. La existencia de resultados variables en los diferentes estudios nos hace considerar la complejidad en la relación entre el grado de infiltración por parte de los diferentes componentes del sistema inmune a nivel tumoral y su capacidad pronóstica. Es muy posible que factores como la localización y extensión del tumor, los puntos de corte utilizados en la clasificación de los grados de infiltración, o el tratamiento realizado sean variables con capacidad de influir en los resultados obtenidos.

Una gran mayoría de los estudios que han analizado la relación entre TIL y control de la enfermedad se han llevado a cabo a partir de un análisis inmunohistoquímico de las muestras tumorales. Jung y cols<sup>(40)</sup> realizaron un estudio en pacientes con carcinomas de orofaringe en el que evaluaron la expresión de CD8 a nivel transcripcional, y pudieron demostrar la existencia de una correlación entre la expresión transcripcional de CD8 y el grado de infiltración linfocitaria valorada mediante inmunohistoquímica, así como la capacidad pronóstica de la expresión transcripcional de CD8, con unos resultados parecidos a los obtenidos en nuestro estudio.

De acuerdo con nuestros resultados, los pacientes con unos niveles de expresión transcripcional de CD45 elevada contaron con una supervivencia libre de enfermedad superior que la de los pacientes con una expresión baja.

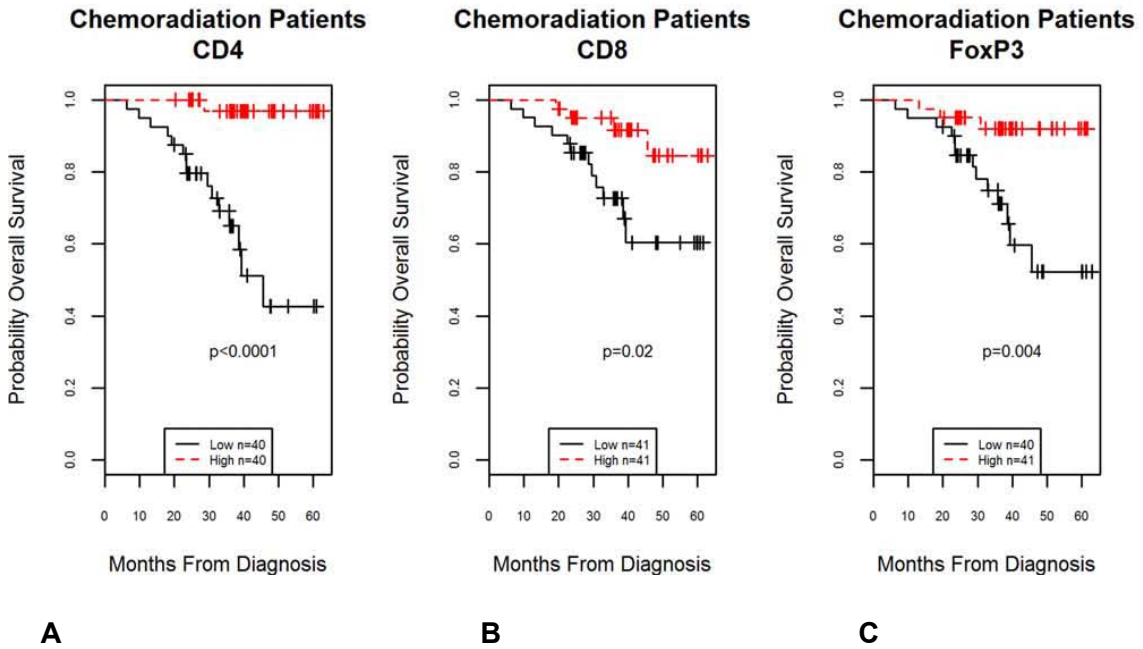


**Figura 74.** Curva de supervivencia libre de enfermedad en función de los niveles de expresión de CD45.

Este incremento en la supervivencia libre de enfermedad se tradujo en un incremento en la supervivencia específica, de manera que la supervivencia ajustada al tumor a los 5 años para los pacientes con una expresión elevada de CD45 fue del 75.2% (IC 95%:66.6-83.8%), en tanto que para los pacientes con una expresión baja disminuyó al 45.5% (IC 95%: 30.8-60.2%) (P=0.001).

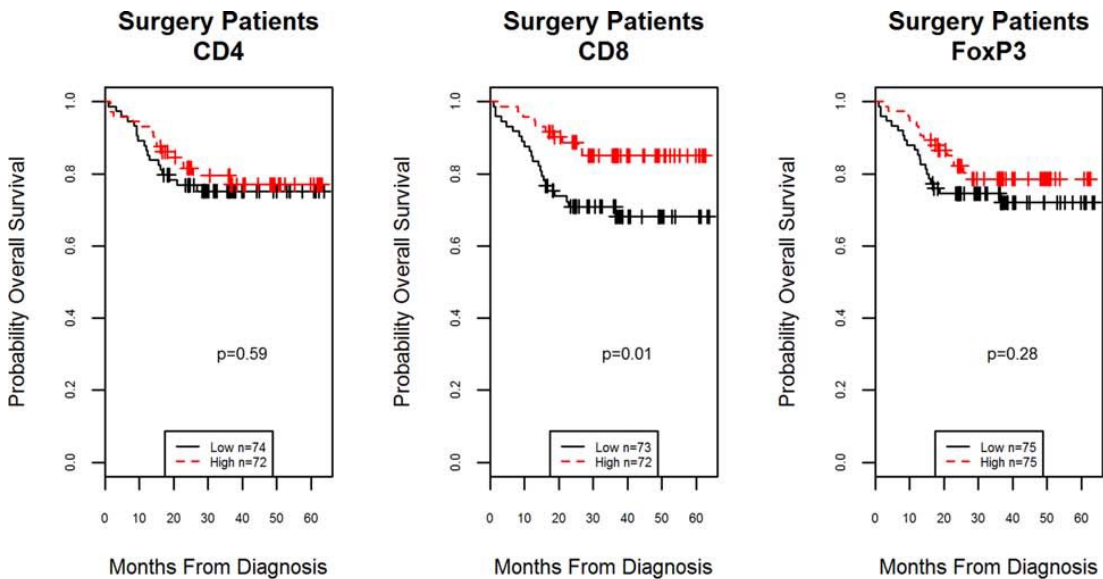
Además, pudimos comprobar como la expresión de CD45 aparecía como la única variable con capacidad pronóstica en un estudio multivariante. De acuerdo con los resultados de este estudio, los pacientes con un CD45 bajo contaron con el doble de riesgo de sufrir una recidiva de la enfermedad. Variables como la extensión local o regional del tumor, su localización o el tipo de tratamiento no contaron con una capacidad pronóstica independiente.

Esta diferencia en el control de la enfermedad se produjo a expensas básicamente de la capacidad del tratamiento en conseguir el control local de la enfermedad. Ni el control regional ni la aparición de metástasis a distancia se vieron modificados de forma significativa por el grado de expresión de CD45. El control local para los pacientes con una CD45 elevada fue significativamente mayor, independientemente de que el paciente hubiese recibido un tratamiento con cirugía o radioterapia. En un estudio llevado a cabo por Nguyen y cols<sup>(26)</sup> en pacientes con CECC en los que se analizaron varios subtipos linfocitarios mediante inmunohistoquímica, pudo apreciarse una capacidad pronóstica diferenciada para la expresión de CD4 y FoxP3 en función del tratamiento: la capacidad pronóstica del TIL aparecía a expensas básicamente de los pacientes tratados de manera no quirúrgica. Considerando de forma aislada los pacientes tratados con quimio-radioterapia (n=86), la categoría del TIL contó con una capacidad pronóstica notable.



**Figura 75.** Supervivencia analizada con varios subtipos linfocitarios en pacientes tratados de manera no quirúrgica. **A.** CD4; **B.** CD8; **C.** FoxP3 (tomada de Nguyen<sup>26</sup>).

Sin embargo, al considerar los pacientes tratados de forma quirúrgica, la capacidad pronóstica del TIL se vio reducida, especialmente en el caso de la infiltración por células CD4+ y FoxP3+.



**Figura 76.** Supervivencia analizada con varios subtipos linfocitarios en pacientes tratados de manera quirúrgica. **A.** CD4; **B.** CD8; **C.** FoxP3 (tomada de Nguyen<sup>26</sup>).

Una de las conclusiones extraídas por los autores del estudio es la posibilidad de utilizar el valor del TIL como un biomarcador con capacidad predictiva. De acuerdo con los resultados obtenidos, los pacientes con unos niveles de TIL bajos deberían ser considerados como unos malos candidatos a tratamiento con radioterapia o quimioradioterapia, debiendo considerar en los casos en los que fuera posible la realización de un tratamiento quirúrgico.

Una consideración en relación a nuestros resultados es que al ser CD45 un marcador preferente de los linfocitos T (CD3+) tal como aparecía en los resultados de nuestro estudio inmunohistoquímico, siendo los linfocitos T citotóxicos (CD8+) los más abundantes de los linfocitos T, podemos asumir que un nivel de expresión elevado de CD45 sería equivalente a una infiltración elevada por linfocitos T citotóxicos (CD8+). En consecuencia, el hallazgo en nuestros pacientes que los niveles transcripcionales de CD45 cuentan con capacidad pronóstica tanto para los pacientes tratados con cirugía como para los tratados con radioterapia es congruente con los hallazgos de Nguyen y cols<sup>(26)</sup>, que encontraron igualmente como la infiltración por linfocitos CD8 se relacionaba con una mejor supervivencia independientemente del tipo de tratamiento realizado.

La mayoría de estudios que han analizado la capacidad pronóstica del TIL no hacen referencia al control alcanzado a nivel local, regional o a distancia de la enfermedad, por lo que no podemos contrastar nuestros resultados con los alcanzados por otros autores. Si consideramos la expresión de CD45 como un marcador indirecto de la infiltración por TIL, una interpretación de nuestros resultados sería que la presencia de linfocitos ayuda a los tratamientos empleados, ya sean quirúrgicos o radioterápicos, a controlar la enfermedad a nivel local, en tanto que no tendrían un efecto en el control regional de la enfermedad o en la capacidad de diseminación a distancia. Hemos de considerar que el microambiente del tumor a nivel ganglionar es notablemente diferente al existente a nivel local. La presencia de linfocitos forma parte constitutiva del ganglio, por lo que su presencia y función pueden diferir de la existente a nivel del tumor primario. Por otra parte, y esto es igualmente aplicable al tumor que ocasiona las metástasis a distancia, las células tumorales que consiguen migrar a través del torrente linfático o vascular

cuentan con unas características fenotípicas que son las que permiten esta capacidad de migración y de proliferación a distancia del tumor primario. No existen estudios que hayan evaluado si estas características que permiten el mecanismo de diseminación linfática o vascular afectan también a la posibilidad de que el sistema inmune ayude al control de la enfermedad.

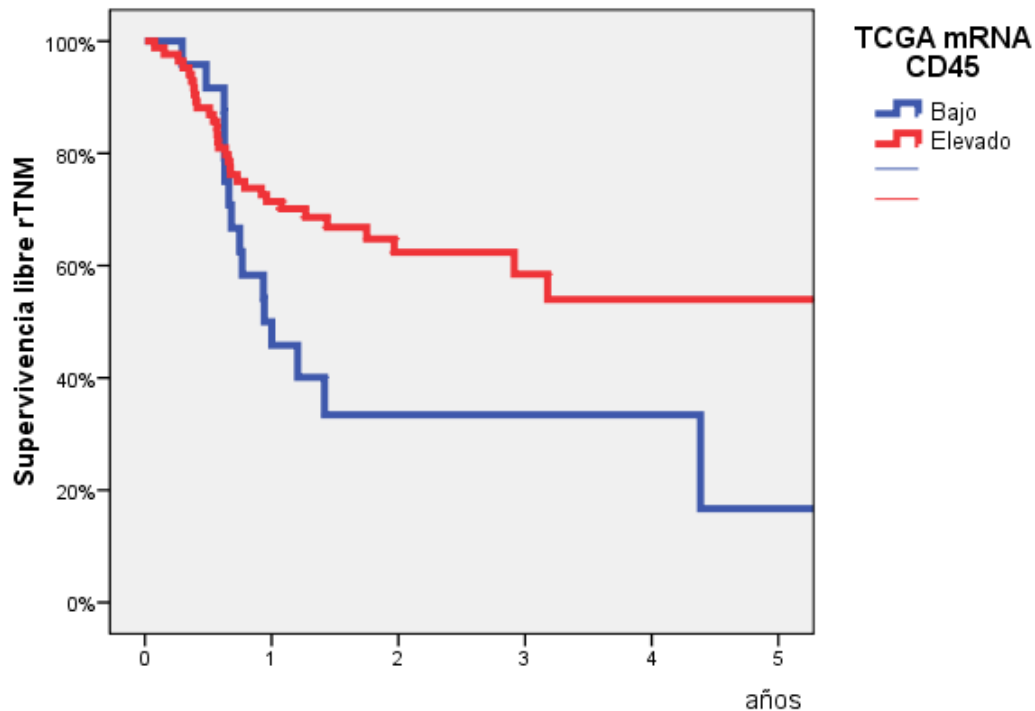
No existen estudios que hayan analizado la relación entre la expresión transcripcional de CD45 y el control de la enfermedad en los pacientes con CECC. Sin embargo, a partir del análisis de los resultados contenidos en el TCGA pudimos llevar a cabo un estudio de validación externa de nuestros resultados.

La base TCGA presenta datos de expresión transcripcional normalizada correspondientes a 520 muestras de CECC de diversas localizaciones, permitiendo un análisis de la totalidad del genoma. Para este estudio hemos utilizado, además de CD45, los niveles de expresión de genes que codifican proteínas utilizadas como marcadores de diferentes poblaciones leucocitarias.

El principal inconveniente de los datos incluidos en TCGA en el momento actual es que la información referente al tipo de tratamiento realizado no es explícita, y que sólo se incluye información de seguimiento oncológico en un número muy limitado de los pacientes incluidos en la muestra. Para el presente estudio optamos por incluir sólo los datos correspondientes a pacientes que contasen con información relativa al seguimiento oncológico con una duración superior a un año. Esperamos que futuras actualizaciones nos permitan mejorar la potencia de los datos de supervivencia obtenidos a partir del TCGA.

Contando con estas limitaciones, cabe destacar que los resultados obtenidos al analizar la expresión transcripcional de CD45 en TCGA son muy similares a los obtenidos al analizar la serie de nuestro centro. El análisis de partición recursiva llevó a cabo una clasificación de los pacientes en función del control de la enfermedad en dos categorías, una con un nivel de expresión bajo de CD45 que agrupa a un tercio de los pacientes, y otra con un nivel de expresión elevado que agrupa los dos tercios restantes. Es interesante destacar que la proporción de pacientes incluidos en las categorías elevada y baja es muy similar en las dos cohortes de tumores estudiados. Los pacientes con una

expresión elevada de CD45 tuvieron una supervivencia libre de recidiva significativamente superior.



**Figura 77.** Curva de supervivencia libre de enfermedad en función de los valores de expresión de CD45 en la cohorte TCGA.

Además, al disponer de los valores de expresión de la totalidad del genoma, se pudo llevar a cabo un análisis utilizando los valores de expresión de genes más específicos de la presencia de determinados subtipos linfocitarios. En este sentido, cabe destacar que los resultados obtenidos al analizar la capacidad pronóstica de CD3, marcador de linfocitos T, fue superponible a la obtenida con el análisis realizado con CD45. Este hallazgo vuelve a ser un dato que, de forma indirecta, señala la correspondencia de la expresión transcripcional de CD45 como un marcador de infiltración por TIL, y confirma su capacidad pronóstica.



### **Limitaciones de nuestro estudio**

Las principales limitaciones de nuestro estudio son por una parte el que se trata de un análisis retrospectivo, y sobre todo el hecho de que CD45 no es un marcador específico de linfocitos, por lo que no podemos evaluar la influencia en los resultados como consecuencia de la infiltración por parte de elementos celulares de otras líneas leucocitaria como puedan ser los polimorfonucleares o los macrófagos.

De todas formas, tal como se ha puesto de manifiesto a lo largo de la Discusión, pensamos que a partir de evidencia directas e indirectas hemos podido demostrar que los elementos celulares CD45 positivos eran mayoritariamente linfocitos, y en consecuencia existe una correlación significativa entre el nivel de expresión transcripcional de CD45 y el grado de infiltración por TIL.

El siguiente paso sería el llevar a cabo un estudio de la expresión transcripcional de genes relacionados de forma más específica con los diferentes subtipos que componen la infiltración linfocitaria, analizar la existencia de una relación entre el nivel de expresión transcripcional y el grado de infiltración para cada uno de los subtipos específicos, y evaluar cuál de estos subtipos se relaciona de forma significativa con el control de la enfermedad.

## **CONCLUSIONES**



## **Conclusiones**

1. No encontramos diferencias significativas en los niveles de expresión transcripcional de TIL en función de la extensión local o regional del tumor, ni del grado histológico.
2. Existieron diferencias significativas en el control de la enfermedad en función del nivel de expresión transcripcional de CD45. Los pacientes con unos niveles de expresión transcripcional elevados de CD45 contaron con una supervivencia libre de enfermedad significativamente superior a la de los pacientes con unos niveles de expresión bajos. La mejoría en la supervivencia libre de enfermedad para los pacientes con una expresión elevada de CD45 se produjo a expensas básicamente de un incremento significativo en el control local de la enfermedad.
3. A partir de un conteo del TIL se pudo demostrar una correlación significativa entre el grado de expresión transcripcional de CD45 y el TIL. El infiltrado CD45 positivo intratumoral se correspondió de forma preferente con un infiltrado por linfocitos T.
4. Los tumores de orofaringe HPV-positivos contaron con un nivel de expresión de CD45 significativamente superior al correspondiente a los tumores HPV-negativos.



## **BIBLIOGRAFÍA**



**Bibliografia**

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
3. Zhang QW, Liu L, Gong CY, Shi HS, Zeng YH, Wang XZ, et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. *PloS one*. 2012;7(12):e50946.
4. Kumar V, Patel S, Tcyganov E, Gabrilovich DI. The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Trends in immunology*. 2016;37(3):208-20.
5. Gooden MJ, de Bock GH, Leffers N, Daemen T, Nijman HW. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *British journal of cancer*. 2011;105(1):93-103.
6. Girardi M, Oppenheim DE, Steele CR, Lewis JM, Glusac E, Filler R, et al. Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science (New York, NY)*. 2001;294(5542):605-9.
7. Baxevasis CN, Gritzapis AD, Papamichail M. In vivo antitumor activity of NKT cells activated by the combination of IL-12 and IL-18. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2003;171(6):2953-9.
8. Shapiro RS. Malignancies in the setting of primary immunodeficiency: Implications for hematologists/oncologists. *American journal of hematology*. 2011;86(1):48-55.
9. Grulich AE, van Leeuwen MT, Falster MO, Vajdic CM. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet (London, England)*. 2007;370(9581):59-67.
10. Zamai L, Ponti C, Mirandola P, Gobbi G, Papa S, Galeotti L, et al. NK cells and cancer. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2007;178(7):4011-6.
11. Weigelin B, Krause M, Friedl P. Cytotoxic T lymphocyte migration and effector function in the tumor microenvironment. *Immunology letters*. 2011;138(1):19-21.
12. Qin Z, Schwartzkopff J, Pradera F, Kammertoens T, Seliger B, Pircher H, et al. A critical requirement of interferon gamma-mediated angiostasis for tumor rejection by CD8+ T cells. *Cancer research*. 2003;63(14):4095-100.
13. Tong CC, Kao J, Sikora AG. Recognizing and reversing the immunosuppressive tumor microenvironment of head and neck cancer. *Immunologic research*. 2012;54(1-3):266-74.



14. Zandberg DP, Strome SE. The role of the PD-L1:PD-1 pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral oncology*. 2014;50(7):627-32.
15. Nosho K, Baba Y, Tanaka N, Shima K, Hayashi M, Meyerhardt JA, et al. Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: cohort study and literature review. *The Journal of pathology*. 2010;222(4):350-66.
16. Menegaz RA, Michelin MA, Etchebehere RM, Fernandes PC, Murta EF. Peri- and intratumoral T and B lymphocytic infiltration in breast cancer. *European journal of gynaecological oncology*. 2008;29(4):321-6.
17. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *The New England journal of medicine*. 2003;348(3):203-13.
18. Dieu-Nosjean MC, Antoine M, Danel C, Heudes D, Wislez M, Poulot V, et al. Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(27):4410-7.
19. Thomas NE, Busam KJ, From L, Krickler A, Armstrong BK, Anton-Culver H, et al. Tumor-infiltrating lymphocyte grade in primary melanomas is independently associated with melanoma-specific survival in the population-based genes, environment and melanoma study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(33):4252-9.
20. Chew V, Chen J, Lee D, Loh E, Lee J, Lim KH, et al. Chemokine-driven lymphocyte infiltration: an early intratumoural event determining long-term survival in resectable hepatocellular carcinoma. *Gut*. 2012;61(3):427-38.
21. Loose D, Signore A, Bonanno E, Vermeersch H, Dierckx R, Deron P, et al. Prognostic value of CD25 expression on lymphocytes and tumor cells in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*. 2008;23(1):25-33.
22. Badoual C, Hans S, Rodriguez J, Peyrard S, Klein C, Agueznay Nel H, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(2):465-72.
23. Russell S, Angell T, Lechner M, Liebertz D, Correa A, Sinha U, et al. Immune cell infiltration patterns and survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Head & neck oncology*. 2013;5(3):24.
24. Balermipas P, Michel Y, Wagenblast J, Seitz O, Weiss C, Rodel F, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes predict response to definitive chemoradiotherapy in head and neck cancer. *British journal of cancer*. 2014;110(2):501-9.

25. Balermipas P, Rodel F, Weiss C, Rodel C, Fokas E. Tumor-infiltrating lymphocytes favor the response to chemoradiotherapy of head and neck cancer. *Oncoimmunology*. 2014;3(1):e27403.
26. Nguyen N, Bellile E, Thomas D, McHugh J, Rozek L, Virani S, et al. Tumor infiltrating lymphocytes and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Head & neck*. 2016.
27. Rajjoub S, Basha SR, Einhorn E, Cohen MC, Marvel DM, Sewell DA. Prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes in oropharyngeal cancer. *Ear, nose, & throat journal*. 2007;86(8):506-11.
28. Wansom D, Light E, Thomas D, Worden F, Prince M, Urba S, et al. Infiltrating lymphocytes and human papillomavirus-16--associated oropharyngeal cancer. *The Laryngoscope*. 2012;122(1):121-7.
29. Nasman A, Romanitan M, Nordfors C, Grun N, Johansson H, Hammarstedt L, et al. Tumor infiltrating CD8+ and Foxp3+ lymphocytes correlate to clinical outcome and human papillomavirus (HPV) status in tonsillar cancer. *PloS one*. 2012;7(6):e38711.
30. Nordfors C, Grun N, Tertipis N, Ahrlund-Richter A, Haegglblom L, Sivars L, et al. CD8+ and CD4+ tumour infiltrating lymphocytes in relation to human papillomavirus status and clinical outcome in tonsillar and base of tongue squamous cell carcinoma. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2013;49(11):2522-30.
31. Tertipis N, Hammar U, Nasman A, Vlastos A, Nordfors C, Grun N, et al. A model for predicting clinical outcome in patients with human papillomavirus-positive tonsillar and base of tongue cancer. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2015;51(12):1580-7.
32. Lee YS, Park JY, Cho KJ, Kim SB, Lee SW, Choi SH, et al. Composition of inflammatory cells regulating the response to concurrent chemoradiation therapy for HPV (+) tonsil cancer. *Oral oncology*. 2015;51(12):1113-9.
33. Zancope E, Costa NL, Junqueira-Kipnis AP, Valadares MC, Silva TA, Leles CR, et al. Differential infiltration of CD8+ and NK cells in lip and oral cavity squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2010;39(2):162-7.
34. Watanabe Y, Katou F, Ohtani H, Nakayama T, Yoshie O, Hashimoto K. Tumor-infiltrating lymphocytes, particularly the balance between CD8(+) T cells and CCR4(+) regulatory T cells, affect the survival of patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2010;109(5):744-52.
35. Wolf GT, Chepeha DB, Bellile E, Nguyen A, Thomas D, McHugh J. Tumor infiltrating lymphocytes (TIL) and prognosis in oral cavity squamous carcinoma: a preliminary study. *Oral oncology*. 2015;51(1):90-5.

36. Distel LV, Fickenscher R, Dietel K, Hung A, Iro H, Zenk J, et al. Tumour infiltrating lymphocytes in squamous cell carcinoma of the oro- and hypopharynx: prognostic impact may depend on type of treatment and stage of disease. *Oral oncology*. 2009;45(10):e167-74.
37. Pretscher D, Distel LV, Grabenbauer GG, Wittlinger M, Buettner M, Niedobitek G. Distribution of immune cells in head and neck cancer: CD8+ T-cells and CD20+ B-cells in metastatic lymph nodes are associated with favourable outcome in patients with oro- and hypopharyngeal carcinoma. *BMC cancer*. 2009;9:292.
38. Berinstein NL, Wolf GT, Naylor PH, Baltzer L, Egan JE, Brandwein HJ, et al. Increased lymphocyte infiltration in patients with head and neck cancer treated with the IRX-2 immunotherapy regimen. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2012;61(6):771-82.
39. Ward MJ, Thirdborough SM, Mellows T, Riley C, Harris S, Suchak K, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes predict for outcome in HPV-positive oropharyngeal cancer. *British journal of cancer*. 2014;110(2):489-500.
40. Jung AC, Guihard S, Krugell S, Ledrappier S, Brochot A, Dalstein V, et al. CD8-alpha T-cell infiltration in human papillomavirus-related oropharyngeal carcinoma correlates with improved patient prognosis. *International journal of cancer*. 2013;132(2):E26-36.
41. Ghebeh H, Mohammed S, Al-Omair A, Qattan A, Lehe C, Al-Qudaihi G, et al. The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. *Neoplasia (New York, NY)*. 2006;8(3):190-8.
42. Thompson RH, Gillett MD, Cheville JC, Lohse CM, Dong H, Webster WS, et al. Costimulatory molecule B7-H1 in primary and metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Cancer*. 2005;104(10):2084-91.
43. Cho YA, Yoon HJ, Lee JI, Hong SP, Hong SD. Relationship between the expressions of PD-L1 and tumor-infiltrating lymphocytes in oral squamous cell carcinoma. *Oral oncology*. 2011;47(12):1148-53.
44. Badoual C, Hans S, Merillon N, Van Ryswick C, Ravel P, Benhamouda N, et al. PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer. *Cancer research*. 2013;73(1):128-38.
45. Kim S. Animal models of cancer in the head and neck region. *Clinical and experimental otorhinolaryngology*. 2009;2(2):55-60.
46. Sano D, Myers JN. Xenograft models of head and neck cancers. *Head & neck oncology*. 2009;1:32.

47. Judd NP, Allen CT, Winkler AE, Uppaluri R. Comparative analysis of tumor-infiltrating lymphocytes in a syngeneic mouse model of oral cancer. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 2012;147(3):493-500.
48. Thomas ML. The leukocyte common antigen family. *Annual review of immunology*. 1989;7:339-69.
49. Trowbridge IS, Thomas ML. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annual review of immunology*. 1994;12:85-116.
50. Hermiston ML, Xu Z, Weiss A. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annual review of immunology*. 2003;21:107-37.
51. Yamada T, Zhu D, Saxon A, Zhang K. CD45 controls interleukin-4-mediated IgE class switch recombination in human B cells through its function as a Janus kinase phosphatase. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(32):28830-5.
52. Okumura M, Matthews RJ, Robb B, Litman GW, Bork P, Thomas ML. Comparison of CD45 extracellular domain sequences from divergent vertebrate species suggests the conservation of three fibronectin type III domains. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1996;157(4):1569-75.
53. Kung C, Pingel JT, Heikinheimo M, Klemola T, Varkila K, Yoo LI, et al. Mutations in the tyrosine phosphatase CD45 gene in a child with severe combined immunodeficiency disease. *Nature medicine*. 2000;6(3):343-5.
54. Hermiston ML, Zikherman J, Zhu JW. CD45, CD148, and Lyp/Pep: critical phosphatases regulating Src family kinase signaling networks in immune cells. *Immunological reviews*. 2009;228(1):288-311.
55. Saunders AE, Johnson P. Modulation of immune cell signalling by the leukocyte common tyrosine phosphatase, CD45. *Cellular signalling*. 2010;22(3):339-48.
56. Huntington ND, Tarlinton DM. CD45: direct and indirect government of immune regulation. *Immunology letters*. 2004;94(3):167-74.
57. Alexander DR. The CD45 tyrosine phosphatase: a positive and negative regulator of immune cell function. *Seminars in immunology*. 2000;12(4):349-59.
58. Roach T, Slater S, Koval M, White L, Cahir McFarland ED, Okumura M, et al. CD45 regulates Src family member kinase activity associated with macrophage integrin-mediated adhesion. *Current biology : CB*. 1997;7(6):408-17.
59. Berger SA, Mak TW, Paige CJ. Leukocyte common antigen (CD45) is required for immunoglobulin E-mediated degranulation of mast cells. *The Journal of experimental medicine*. 1994;180(2):471-6.

60. Huntington ND, Xu Y, Nutt SL, Tarlinton DM. A requirement for CD45 distinguishes Ly49D-mediated cytokine and chemokine production from killing in primary natural killer cells. *The Journal of experimental medicine*. 2005;201(9):1421-33.
61. Perillo NL, Pace KE, Seilhamer JJ, Baum LG. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature*. 1995;378(6558):736-9.
62. Mitchell GB, Khandaker MH, Rahimpour R, Xu L, Lazarovits AI, Pickering JG, et al. CD45 modulation of CXCR1 and CXCR2 in human polymorphonuclear leukocytes. *European journal of immunology*. 1999;29(5):1467-76.
63. Holmes N. CD45: all is not yet crystal clear. *Immunology*. 2006;117(2):145-55.
64. Tchilian EZ, Wallace DL, Wells RS, Flower DR, Morgan G, Beverley PC. A deletion in the gene encoding the CD45 antigen in a patient with SCID. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2001;166(2):1308-13.
65. Tchilian EZ, Beverley PC. Altered CD45 expression and disease. *Trends in immunology*. 2006;27(3):146-53.
66. Leon X, Orus C, Quer M. [Design, maintenance, and exploitation of an oncologic database for patients with malignant tumors of the head and neck]. *Acta otorrinolaringologica espanola*. 2002;53(3):185-90.
67. Demaria S, Pikarsky E, Karin M, Coussens LM, Chen YC, El-Omar EM, et al. Cancer and inflammation: promise for biologic therapy. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md : 1997)*. 2010;33(4):335-51.
68. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Current opinion in immunology*. 2014;27:16-25.
69. King GN, Healy CM, Glover MT, Kwan JT, Williams DM, Leigh IM, et al. Increased prevalence of dysplastic and malignant lip lesions in renal-transplant recipients. *The New England journal of medicine*. 1995;332(16):1052-7.
70. Baker KS, DeFor TE, Burns LJ, Ramsay NK, Neglia JP, Robison LL. New malignancies after blood or marrow stem-cell transplantation in children and adults: incidence and risk factors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2003;21(7):1352-8.
71. Pollard JD, Hanasono MM, Mikulec AA, Le QT, Terris DJ. Head and neck cancer in cardiothoracic transplant recipients. *The Laryngoscope*. 2000;110(8):1257-61.
72. Makitie AA, Lundberg M, Salmela K, Kyllonen L, Pukkala E. Head and neck cancer in renal transplant patients in Finland. *Acta oto-laryngologica*. 2008;128(11):1255-8.

73. Galon J, Angell HK, Bedognetti D, Marincola FM. The continuum of cancer immunosurveillance: prognostic, predictive, and mechanistic signatures. *Immunity*. 2013;39(1):11-26.
74. Senovilla L, Vacchelli E, Galon J, Adjemian S, Eggermont A, Fridman WH, et al. Trial watch: Prognostic and predictive value of the immune infiltrate in cancer. *Oncoimmunology*. 2012;1(8):1323-43.
75. Boissonnas A, Fetler L, Zeelenberg IS, Hugues S, Amigorena S. In vivo imaging of cytotoxic T cell infiltration and elimination of a solid tumor. *The Journal of experimental medicine*. 2007;204(2):345-56.
76. Nelson BH. CD20+ B cells: the other tumor-infiltrating lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2010;185(9):4977-82.
77. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annual review of immunology*. 2009;27:451-83.
78. Martinelli-Klay CP, Mendis BR, Lombardi T. Eosinophils and oral squamous cell carcinoma: a short review. *Journal of oncology*. 2009;2009:310132.
79. Wallis SP, Stafford ND, Greenman J. Clinical relevance of immune parameters in the tumor microenvironment of head and neck cancers. *Head & neck*. 2015;37(3):449-59.
80. Young MR. Protective mechanisms of head and neck squamous cell carcinomas from immune assault. *Head & neck*. 2006;28(5):462-70.
81. 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. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2015;26(2):259-71.
82. Le QT, Shi G, Cao H, Nelson DW, Wang Y, Chen EY, et al. Galectin-1: a link between tumor hypoxia and tumor immune privilege. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(35):8932-41.
83. Sun DS, Zhao MQ, Xia M, Li L, Jiang YH. The correlation between tumor-infiltrating Foxp3+ regulatory T cells and cyclooxygenase-2 expression and their association with recurrence in resected head and neck cancers. *Medical oncology (Northwood, London, England)*. 2012;29(2):707-13.
84. Ritta M, Landolfo V, Mazibrada J, De Andrea M, Dell'Oste V, Caneparo V, et al. Human papillomavirus tumor-infiltrating T-regulatory lymphocytes and P53 codon 72 polymorphisms correlate with clinical staging and prognosis of oropharyngeal cancer. *The new microbiologica*. 2013;36(2):133-44.



85. Brandwein-Gensler M, Teixeira MS, Lewis CM, Lee B, Rolnitzky L, Hille JJ, et al. Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. *The American journal of surgical pathology*. 2005;29(2):167-78.
86. Liang YJ, Liu HC, Su YX, Zhang TH, Chu M, Liang LZ, et al. Foxp3 expressed by tongue squamous cell carcinoma cells correlates with clinicopathologic features and overall survival in tongue squamous cell carcinoma patients. *Oral oncology*. 2011;47(7):566-70.
87. Tabachnyk M, Distel LV, Buttner M, Grabenbauer GG, Nkenke E, Fietkau R, et al. Radiochemotherapy induces a favourable tumour infiltrating inflammatory cell profile in head and neck cancer. *Oral oncology*. 2012;48(7):594-601.
88. Moreira G, Fulgencio LB, EF DEM, Leles CR, Batista AC, TA DAS. T regulatory cell markers in oral squamous cell carcinoma: Relationship with survival and tumor aggressiveness. *Oncology letters*. 2010;1(1):127-32.
89. Gabriel A, Namyslowski G, Ziolkowski A, Morawski K, Steplewska-Mazur K, Urbaniec P. Immunohistochemical analysis of lymphocytic infiltration in the tumor microenvironment in patients operated on for laryngeal cancer. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*. 1999;256(8):384-7.
90. Sulabha Pathak UPIEaFESP, India (2005), 2.<sup>a</sup>. Ed. Pp. 125.
91. Wang W, Hodkinson P, McLaren F, Mackean MJ, Williams L, Howie SE, et al. Histologic assessment of tumor-associated CD45(+) cell numbers is an independent predictor of prognosis in small cell lung cancer. *Chest*. 2013;143(1):146-51.
92. Chew A, Salama P, Robbshaw A, Klopacic B, Zeps N, Platell C, et al. SPARC, FOXP3, CD8 and CD45 correlation with disease recurrence and long-term disease-free survival in colorectal cancer. *PloS one*. 2011;6(7):e22047.