



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

“EVALUACIÓN DEL ROL DE P16 Y EL  
INFILTRADO LINFOCITARIO EN LA  
SOBREVIDA DE PACIENTES CON  
CÁNCER CÉLULAS EPIDERMÓIDE DE  
CABEZA Y CUELLO”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
DOCTOR EN MEDICINA

CARLOS ARTURO CASTAÑEDA  
ALTAMIRANO

LIMA – PERÚ

2023



**ASESOR**

Dr. Henry Leonidas Gómez Moreno

**JURADO DE TESIS**

DR. JUAN DE LA CRUZ ANTONIO POSTIGO DIAZ

PRESIDENTE

DR. ALVARO LINO DIAZ CARDENAS

VOCAL

DRA. ROSANNA ELVIRA MORALES GUZMAN BARRON

SECRETARIA

## **DEDICATORIA.**

A mi equipo de investigación, por todo su apoyo logístico y científico, que logró desarrollar metodologías innovadoras para el análisis del sistema inmune en patología oncológica, incluidas en esta tesis.

A mis profesores por haberme enseñado el concepto de innovar en cada acto médico contra el cáncer y encontrar la solución para cada problema.

A los pacientes oncológicos por el coraje en enfrentarse a su enfermedad.

A mi familia por motivarme a esforzarme en cada actividad que realizo.

## **AGRADECIMIENTOS.**

Miluska Castillo, Joselyn Sánchez, Luis Bernabé,  
Katherine Tello, Sandro Casavilca y Henry Gómez.

## **FUENTES DE FINANCIAMIENTO.**

Este estudio fue financiado por CONCYTEC, por el proyecto “Biomarkers of HPV driven head and neck cancer in Latin America And Europe” (contrato FONDECYT 096-2017).

# "EVALUACIÓN DEL ROL DE P16 Y EL INFILTRADO LINFOCITARIO EN LA SOBREVIDA DE PACIENTES CON CÁNCER CÉLULAS EPIDERMOIDE DE CABEZA Y CUELLO"

## INFORME DE ORIGINALIDAD

**18%** EN  
INDICE DE SIMILITUD

**16%**  
FUENTES DE INTERNET

**15%**  
PUBLICACIONES

**9%**  
TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

<b>1</b>	<b>www.frontiersin.org</b> Fuente de Internet	<b>2%</b>
<b>2</b>	<b>www.austinpublishinggroup.com</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>3</b>	<b>www.nature.com</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>4</b>	<b>Hugo Gonzalez, Catharina Hagerling, Zena Werb. "Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression", Genes &amp; Development, 2018</b> Publicación	<b>1%</b>
<b>5</b>	<b>eprints.soton.ac.uk</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>6</b>	<b>link.springer.com</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>7</b>	<b>biblio.ugent.be</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>

## TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCION	1
	Antecedentes de la investigación	3
	Planteamiento del problema	8
	Marco conceptual	9
	Pregunta de investigación	20
II.	OBJETIVOS	21
	Hipótesis	21
III.	METODOLOGIA	22
	Población de estudio	22
	Diseño muestral y selección de la muestra	22
	Criterios de elegibilidad	22
	Variables y operacionalización	23
	Procedimientos y técnicas	24
	Análisis de datos	26
	Consideraciones éticas	28
IV.	RESULTADOS	30
V.	DISCUSIÓN	33
VI.	CONCLUSIONES	38
VII.	RECOMENDACIONES	39
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
XI.	TABLAS	45
X.	FIGURAS	58

## RESUMEN

**Introducción:** La sobreexpresión de p16 (p16+) es un marcador sustituto de infección por virus-de-papiloma-humano y de pronóstico en cáncer de orofaringe, y su rol en cáncer de células epidermoide de cabeza y cuello (CECC) está en estudio. Los linfocitos-tumorales-infiltrantes (TIL) predicen pronóstico en distintas neoplasias.

**Objetivo:** Evaluar la asociación entre p16+, TIL, densidad de células inmunes (linfocitos CD3+ y CD8+) y macrófagos CD163+) y sobrevida-global en pacientes con CECC.

**Material y métodos:** Se revisó las historias clínicas de los pacientes con CECC atendidos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas entre los años 2005-2013. Se seleccionó aquellos casos con muestra anatomopatológica almacenada y se cuantificó los niveles de TIL. Se evaluó el estado de p16 y de las mencionadas poblaciones de células inmunes a través de métodos de inmunohistoquímica. El análisis estadístico incluyó pruebas de asociación y curvas de sobrevida de Kaplan Meier. Se utilizó el programa SPSS y se aceptó como significativo una  $p < 0.05$ .

**Resultados:** Se incluyeron 432 casos, la mediana de edad fue 61 años y el 51.4% fueron mujeres. Las localizaciones más frecuentes fueron cavidad-oral (63%) y orofaringe (25.7%). La mayoría de los casos fueron grado 2 (61.8%), la mediana de ki67 fue 30%, y 23.8% debutó en estadio-III y 38.1% IV. Se encontró p16+ en 65 pacientes (18%) y la mediana de TIL fue 70%.

El estado p16+ se asoció con localización de orofaringe (40.9%) ( $p < 0,001$ ), varones ( $p = 0.024$ ), grado-3 ( $p < 0.001$ ), ki67-alto ( $p < 0.001$ ) y estadio-IV ( $p = 0.009$ ). El



estado p16+ se asoció con TIL<sup>alto</sup> en orofaringe (p=0.02) pero no en cavidad-oral (p=0.43). Se encontró p16+/TIL<sup>alto</sup> en 17 (8.67%) casos de CECC y estos casos tuvieron una tendencia de mayor sobrevida a 5 años (70.6% vs 44.7%, p=0.095). Los casos p16+/TIL<sup>alto</sup> en el subgrupo de primarios de orofaringe tuvieron una mayor SG (p=0.013). Al reemplazar TIL por CD3 o CD8 se encontró que p16+/CD3<sup>alto</sup> (p=0.002) y p16+/CD8<sup>alto</sup> (p=0.002) tuvieron una menor sobrevida en la población general de CECC.

Conclusión: El estado p16+ y altos niveles de TIL tienen una tendencia a presentar una mayor sobrevida en CECC.

#### **PALABRAS CLAVE**

NEOPLASIAS DE CABEZA Y CUELLO, OROFARINGE, VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO, LINFOCITOS T, MACRÓFAGOS, SOBREVIDA (DeCS/BIREME).

## **ABSTRACT**

**Introduction:** Overexpression of p16 (p16+) is a surrogate marker of human-papillomavirus infection and prognosis in oropharyngeal cancer, and its role in head and neck squamous cell cancer (HNSCC) is under study. Tumor-infiltrating-lymphocytes (TIL) predict prognosis in different neoplasms.

**Objective:** To evaluate the association between p16+, TIL, density of immune cells (CD3+ and CD8+ lymphocytes and macrophages CD163+) and overall survival in patients with HNSCC.

**Material and methods:** The medical records of patients with HNSCC treated at the National Institute of Neoplastic Diseases between the years 2005-2013 were reviewed. Those cases with an anatomopathological sample stored were selected and TILs were calculated. The status of p16 and the previously mentioned populations of immune cells was evaluated through immunohistochemical methods. Statistical analysis included association tests and Kaplan Meier survival curves. The SPSS program was used and  $p < 0.05$  was accepted as significant.

**Results:** 432 cases were included, the median age was 61 years and 51.4% were women. The most frequent locations were the oral cavity (63%) and oropharynx (25.7%). Most cases (61.8%) were grade-2, ki67 median was 30%, and 23.8% debuted in stage-III and 38.1% IV. p16+ was found in 65 patients (18%) and the median TIL was 70%.

The p16+ status was associated with oropharynx location (40.9%) ( $p < 0.001$ ), males ( $p = 0.024$ ), grade-3 ( $p < 0.001$ ), Ki67-high ( $p < 0.001$ ) and stage-IV ( $p = 0.009$ ). The p16+ status was associated with high TIL in the oropharynx ( $p = 0.02$ ) but not in oral cavity ( $p = 0.43$ ). p16+/high TIL was found in 17 (8.67%) HNSCC cases and these

cases had a trend for higher survival rates at 5 years (70.6% vs 44.7%,  $p=0.095$ ). Cases with p16+/high TIL in the oropharyngeal primaries subgroup had better OS ( $p=0.013$ ). When TIL was replaced by CD3 or CD8, it was found that p16+/high CD3 ( $p=0.002$ ) and p16+/ high CD8 ( $p=0.002$ ) had a lower survival in the general HNSCC population.

Conclusion: The p16+ status and high levels of TIL have a tendency to present a higher survival in HNSCC.

**KEYWORDS:**

HEAD AND NECK NEOPLASMS, OROPHARYNX, HUMAN PAPILLOMAVIRUS VIRUSES, T-LYMPHOCYTES, MACROPHAGES, SURVIVAL (MeSH/NLM)

## I. INTRODUCCIÓN

Según las cifras del Registro de Cáncer de Lima Metropolitana 2013- 2015 se registraron 1037 casos nuevos de Cáncer Epidermoide de Cabeza y Cuello (CECC), y encuentran una tasa cruda de incidencia de 5.06 por 100000 habitantes (1).

A pesar de la localización del CECC en una región corporal en la que los mismos pacientes detectan lesiones en sus actividades diarias, los avances en detección y manejo del cáncer, el pronóstico del CECC es malo y las tasas de sobrevida global (SG) a los 5 años van desde aproximadamente el 60% en el carcinoma de laringe hasta solo el 25% en el carcinoma de hipofaringe aun con el tratamiento combinado que incluye cirugía, radioterapia y quimioterapia (2). Adicionalmente, la sobrevida de los pacientes con CECC no se ha incrementado significativamente en las últimas 3 décadas. Más del 50% se diagnostican en estadios localmente avanzados con un pronóstico peor que los que tienen enfermedad temprana (3). Los factores pronósticos clásicos en CECC son el subsitio del tumor primario, características patológicas de agresividad del tumor como grado histológico, infiltración vascular o perineural, tamaño, profundidad de la infiltración, afectación ganglionar y metástasis a distancia (4,5).

Se ha asociado la presencia de CECC con la ingesta de alcohol, consumo de tabaco, higiene bucal e infección por virus de papiloma humano (VPH) (4). Los tumores con presencia de infección por VPH tienen un comportamiento distinto (6). La proteína p16 es parte de la vía oncológica del Retinoblastoma, y su sobreexpresión (estado p16+) es un marcador sustituto de infección por VPH-16 en CECC con primario de orofaringe, un factor predictivo de respuesta favorable a quimioterapia-radioterapia, de menor riesgo de recurrencia y de SG más larga. Sin embargo, no

existe información relevante sobre los mecanismos subyacentes al pronóstico favorable de esta asociación (7). El estudio de p16 mediante inmunohistoquímica es estándar en el diagnóstico, estadiaje y manejo del CECC con primario en orofaringe, y se realiza de rutina en las muestras tumorales procesadas en formalina/parafina (2). La Colaboración Internacional en la Red para Estadiaje del Cáncer de Orofaringe (ICON-S) realizó un ensayo que incluyó 1907 pacientes con carcinoma orofaríngeo VPH+ no metastásico de siete centros en los Estados Unidos de Norteamérica (EE.UU.), Canadá, Holanda y Dinamarca. La SG a los 5 años fue similar entre los estadios N0 (80%), N1–N2a y N2b (83%), mientras que fue menor para el estadio N3 (59%;  $p < 0.0001$ ) cuando se clasificó a los pacientes con cáncer de orofaringe VPH+ según el TNM-7. La presencia de infección por VPH se asoció a un mejor pronóstico, las únicas categorías de pronóstico en los tumores de orofaringe VPH+ fueron la presencia de cinco o más ganglios del cuello con metástasis, estadio T 3 o 4, y márgenes tumorales positivos, mientras que el compromiso extracapsular no fue predictivo para recurrencia local (8). Esta información fue utilizada para la modificación de la nueva clasificación TNM de la 8ª edición (TNM-8) de CECC VPH+ (9).

Por otro lado, se estima que el 25% de los CECC se asocia a infección por VPH, en especial los tumores con primarios en las amígdalas palatinas y en la base de la lengua, en los que la asociación puede alcanzar el 60% de los casos. La neoplasia asociada a VPH se caracteriza por ausencia o poca relación con el antecedente de consumo de tabaco y alcohol, debutar en estadio clínico avanzado, presentar pobre diferenciación, presentar alta sensibilidad al tratamiento con quimio/ radioterapia y tener una mejor sobrevida que su contraparte (10).

En consecuencia, el objetivo de estudio de la presente investigación es evaluar la asociación entre la sobrevida de los pacientes con CECC y el estado positivo de p16 y los niveles de TILs.

### **I.1. Antecedentes de la investigación**

El metaanálisis publicado por Ndiaye y colaboradores reunió información de 12163 pacientes con CECC con procedencia de 44 países y reportaron tasas de infección por VPH en el 45.8% de los tumores de orofaringe (que es aún más alta en las amígdalas), 24.2% de los tumores de cavidad oral y 22.1% de la laringe. La correlación entre expresión de p16 y RNA mensajero (RNAm) de VPH E6/E7 fue alta en cáncer de orofaringe (11).

La revisión sistemática realizada por Kreimer y colaboradores incluyó 60 estudios con pacientes de 26 países y encontraron también que la prevalencia de ADN de VPH fue más alta en los casos de cáncer orofaríngeo (35.6%), cavidad oral (23.5%) o laringe (24.0%). El genotipo VPH-16 fue el más frecuente en el cáncer orofaríngeo (86.7%), laringe (69.2%) y en tumores de cavidad oral (68.2%) (12).

La prevalencia de infección por VPH en CECC ha sido evaluada en algunas series (la mayoría de tamaño muestral pequeño) de población Latino-Americana. Quintero y colaboradores evaluaron la presencia de ADN de VPH en 175 muestras de CECC procedentes de Medellín, Colombia, y encontraron una prevalencia del 18.9%. La prevalencia en la localización cavidad oral fue del 23.9%, en laringe fue 17.5% y en orofaringe fue 13.3%. Encontraron VPH-16 en 27 muestras y VPH-18 en 6 (13).

Petito y colaboradores evaluaron la presencia de VPH en 82 tumores de cavidad oral y orofaríngeo de pacientes procedentes de una región central de Brasil y

encontraron 21 casos (25.6%) VPH positivos, de los cuales 33.3% fue VPH16 y 14.3% fue VPH18 (14).

Pennacchiotti y colaboradores evaluaron la presencia de VPH en 22 pacientes con CECC localizados en cavidad oral, atendidos en el Instituto Nacional de Cáncer de Chile, y encontraron 2 casos positivos (9.09%), los dos del genotipo VPH-56 (15).

Una comparación de información obtenida de Registros de Cáncer (1978) en países Latinoamericanos encontró que la mortalidad por cáncer de cavidad oral, faringe y laringe en Perú fue una de las más bajas de la región (16).

Un análisis de los 5745 casos de cáncer de CECC atendidos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas en Lima, Perú, de 1987 a 2008 encontró que la distribución de neoplasias más frecuentes fueron cáncer de cavidad oral (33.8%), laringe (17.4%), cavidad nasal y senos paranasales (18.4%), nasofaringe (4.7%), hipofaringe (5%), glándulas salivares (8.8%), labios (3.7%), orofaringe (5.4%) y amígdalas (2.7%). Describieron también un aumento significativo en la incidencia de cáncer de cabeza y cuello en los últimos años, aunque la tasa combinada de cánceres de cavidad oral, labio, laringe y faringe fue menor que la reportada en los otros países de Sudamérica. Las tasas de tabaquismo y consumo de alcohol en Perú no habían cambiado significativamente de 1955 a 1989 y consideraron que la tasa actual de consumo de tabaco fue más baja en relación con otros países en desarrollo. También encontraron aumentos anuales en la incidencia de localizaciones asociadas a infección por VPH como amígdalas y orofaringe entre el año 1987 y 2008 en forma similar en magnitud a los aumentos observados en América del Norte y Europa a predominio del grupo de varones entre 45 y 59 años (17).

Un estudio reciente en muestras CECC también procedentes del Instituto en Lima, Perú, encontró infección por VPH en 5 de 107 (4.5%) muestras de cáncer de cavidad oral, y en 3 de 24 (12.5%) muestras de cáncer de laringe, pero no en las 5 muestras de cáncer de orofaringe. Los genotipos fueron 3 de VPH-16 y 1 de VPH-45 en cavidad oral, mientras que 1 caso VPH-39 y otro VPH-58 en laringe (18).

#### Sistema Inmune en Cáncer Epidermoide de Cabeza y Cuello

Experimentos in vivo encontraron que los tumores que expresan VPH E6-E7 crecieron más lento que los tumores VPH negativos en ratones inmunocompetentes, pero esta diferencia en la velocidad de crecimiento no se encontró en ratones modificados inmunodeficientes (19).

Albers y colaboradores identificaron células T dirigidas contra las proteínas derivadas del VPH (E2, E6 y E7) en la sangre y en el tumor de pacientes con cáncer de cabeza y cuello (20).

El infiltrado inmune en el microambiente tumoral de CECC parece correlacionarse con la agresividad del cáncer y el pronóstico. Sin embargo, en los tumores CECC se encuentra una heterogeneidad significativa en los niveles de Linfocitos Infiltrantes TumORAles (TIL) que es mayor aun cuando se compara los distintos subsitios del tumor primario. Los linfocitos T son el componente principal de los TIL en los tumores sólidos, de los cuales las células T citotóxicas CD8 + juegan un papel fundamental (21,22). Las células de los CECC podrían evadir la respuesta inmune a través de alteraciones en expresión de moléculas de histocompatibilidad (HLA de sus siglas en ingles) y de moléculas co-estimuladoras como B7, Antígeno-4 del Linfocito T Citotóxico (CTLA-4 de sus siglas en ingles) y Ligando 1 de



Muerte Programada (PDL1 de sus siglas en ingles) que finalmente produce apoptosis de linfocitos T citotóxicos CD8+ (23).

Un metaanálisis recientemente publicado de 28 estudios evaluó el efecto de los niveles de TIL CD4+ y CD8+ en CECC, y encontró que los niveles altos de TILs CD4+ (HR: 0.77; 95% CI: 0.65–0.93) y de CD8+ (HR: 0.64; 95% CI: 0.47–0.88) se asociaron a menor riesgo de muerte en la población general. Sin embargo, encontró hallazgos de una heterogeneidad considerable en el efecto de TIL CD4+ y CD8+ sobre la SG entre diferentes subsitios anatómicos del primario en CECC que podría relacionarse al agente etiológico o vía carcinogénica principal de cada subsitio. Los niveles altos de TILs CD4+ (evaluado en 8 estudios) se asociaron con una SG mayor en primario de orofaringe (HR: 0.52; 95% CI: 0.31–0.89). Los niveles altos de TIL CD8+ evaluados en 25 estudios se asociaron con una mejora de la SG entre los pacientes con cánceres de orofaringe (HR: 0.39; 95% CI: 0.16–0.93 para VPH - y HR: 0.40; 95% CI 0.21–0.76 para VPH +) y de hipofaringe (HR = 0.43 CI: 0.30–0.63) (24).

Spector y colaboradores evaluaron 464 pacientes con CECC que incluyeron tumores primarios de la cavidad oral (n=228), orofaringe (n=147), laringe (n=74) e hipofaringe (n=15). Encontraron que el 33% tenían estado p16+ (que alcanzó el 80% en orofaringe), los recuentos más altos de CD8 se asociaron con una mejor SG (HR, 0.97; 95% CI, 0.95-0.99). El subanálisis de los casos con primario orofaringe encontró que el estado VPH+ se asoció a mayores recuentos de CD8, y este último predijo también una mayor SG (p=0.001) que se mantuvo aún en el análisis multivariado (HR, 0.98; 95% CI, 0.96-1.00) (25).

Wuerdemann y colaboradores cuantificaron la expresión de TIL CD8 + por inmunohistoquímica en 171 cánceres de orofaringe (32 VPH-, 138 VPH+ evaluado por RT-PCR y/o inmunohistoquímica y 1 caso sin determinación de VPH). Los niveles de TIL CD8+ fueron mayores en Cáncer de orofaringe VPH+ por RT-PCR (61% vs 19%,  $p < 0.001$ ). Los niveles altos de TIL CD8 + se asociaron a una mayor SG en toda la cohorte ( $p < 0.001$ ) y en la cohorte de orofaringe VPH + ( $p = 0.047$ ) (26).

Ward y colaboradores evaluaron el grado de infiltración de linfocitos (Hematoxilina- Eosina) en 274 muestras de tumores epidermoides de orofaringe que incluyeron 140 (54.4%) VPH+ y encontraron una asociación entre infección por VPH y SG; así como asociación entre el alto grado de infiltración linfocítico e infección por VPH, así como con la sobrevida en la cohorte total y en los casos VPH+. Encontraron que los 72 casos (26.9%) que tenían ambos biomarcadores VPH+ y niveles altos de TIL, tenían una mayor SG que las otras combinaciones (SG a los 3 años: VPH+/TIL alto fue de 96%, VPH+/TIL moderado fue de 76%, VPH+/TIL bajo y VPH- fue de 59%,  $p < 0.001$ ). Así mismo, realizaron un análisis de bases públicas y encontraron que la expresión de una firma de genes relacionados a actividad de linfocitos T CD8 se relacionó a una mejor sobrevida (27). Otros estudios han encontrado que diferencias en los niveles de infiltración de poblaciones distintas de linfocitos puede también identificar poblaciones con distintos pronósticos. Chau y colaboradores evaluaron diferentes marcadores de inmunohistoquímica de poblaciones de linfocitos incluyendo linfocitos CD3 y CD8 en una serie de 36 casos de CECC, y encontraron que los tumores con expresión mayor de PD1, TIM3 y GITR tuvieron una menor sobrevida (28).

Wansom y colaboradores evaluaron la densidad de linfocitos CD8 en 38 casos de cáncer avanzado de Orofaringe (25 casos positivos y 13 negativos para infección por VPH-16 evaluado por RT-PCR) que recibieron inducción con Platino- 5 Fluorouracilo seguido de radioterapia concurrente con Platino y finalmente consolidación con 2 ciclos de Paclitaxel. Encontraron una tendencia a mayor infiltrado de linfocitos T (CD4+ & CD8+) en aquellos casos VPH+ (413 +/-66 vs 345 +/-62), así como una tendencia a mayor SG ( $p= 0.0154$ ) que persiste aun cuando se combina con el estado del VPH ( $p=0.02$ ). No encontraron asociación entre los niveles del infiltrado de linfocitos T y estadio clínico o respuesta tumoral al tratamiento (29).

Solomon y colaboradores evaluaron la cantidad y localización de TIL CD8+ en 190 tumores de orofaringe VPH+ (determinado por inmunohistoquímica). Encontraron que la abundancia de TIL CD8+ (>30% en área estromal o intratumoral) estuvo presente en 61.3% de los casos y se asoció con una mayor SG ( $p= 0.003$ ) (30).

Ruangritchankul y colaboradores evaluaron 232 tumores de orofaringe VPH+ (inmunohistoquímica para p16 e hibridación in -situ) y encontraron que aquellos tumores con niveles altos de TIL (infiltrado difuso o en parches con densidad del >20% del tumor y estroma) se asociaron a una mayor SG (54.1 versus 37.4 meses,  $p<0.001$ ) y SLP (56.4 versus 44.4 meses,  $p<0.001$ ) (31).

## **I.2. Planteamiento del problema**

El cáncer de células epidermoide en cabeza y cuello (CECC) es una neoplasia que incluye varias localizaciones y distintas etiologías; sin embargo, la mayoría de ellas tienen características anatómo-patológica similares y tienen un manejo similar con

pequeñas modificaciones que se determinan por la extensión (tamaño y estadio clínico) de las lesiones.

La identificación de biomarcadores predictores de sobrevida en cáncer tiene un progreso exponencial en los últimos años; sin embargo, pocos estudios han evaluado estos factores en CECC y aún menos en población Sudamericana. Esta información permite validar o negar información que se genera en poblaciones donde se realiza el estudio hacia otras razas.

La expresión de proteína p16 es un marcador sustituto de infección por virus papiloma humano (VPH) y de mayor tiempo de vida en pacientes con CECC con primario en orofaringe. Sin embargo, la asociación de p16 con la sobrevida no se puede extrapolar a nuestra población debido a que depende de la prevalencia de infección por virus VPH que se desconoce para nuestro país. La presencia de linfocitos infiltrantes es un marcador de tiempo de vida en distintas neoplasias. Sin embargo, esta asociación debe probarse por cada realidad pues podría estar influenciada por variables como la raza.

La presente tesis evalúa la asociación entre la sobrevida y la expresión de p16, los niveles de linfocitos infiltrantes tumorales (TIL), la densidad de macrófagos activados M2 CD163+, linfocitos CD3+ y CD8+ en muestras tumorales de pacientes peruanos con CECC.

### **I.3. Marco conceptual**

#### **I.3.1. Lugares primarios del cáncer epidermoide de cabeza y cuello**

El CECC es una neoplasia que se desarrolla en epitelio estratificado plano. La ubicación del primario de CECC puede dividirse en 6 regiones: (1) Cavidad nasal

y senos paranasales, (2) cavidad oral, (3) laringe, (4) nasofaringe, (5) orofaringe e (6) hipofaringe.

Cada una de estas regiones tiene una división geográfica propia. La cavidad oral se divide en labio, mucosa bucal, suelo de la boca, lengua y paladar duro. La laringe se divide en supraglotis, glotis y subglotis.

La orofaringe incluye el paladar blando, la pared anterior, lateral y posterior de la faringe, las amígdalas palatinas, amígdala lingual, úvula y el tercio posterior de la lengua. El límite superior se conforma por el velo del paladar, el límite posterior por la columna, los músculos prevertebrales y la confluencia de los constrictores, los límites laterales por las fosas amigdalinas, y el límite inferior es un plano imaginario que pasa por el borde superior de la epiglotis. Hacia el límite anterior se delimita la continuidad con la cavidad oral a través del istmo de las fauces (línea imaginaria que pasa por ambos arcos palatoglosos, la base de la lengua y el velo del paladar) (Figura 1) (4).

### **I.3.2. Biomarcadores en cáncer**

#### **A. Virus papiloma humano**

La familia VPH pertenece a la familia de los Papillomaviridae, consta de virus de ADN circulares de doble cadena, no poseen envoltura y tienen un diámetro aproximado de 52-55 nm. Está conformado por 8000 pares de bases que codifican proteínas involucradas en la replicación viral (E1 y E2/E4) y ensamblaje (L1 y L2), así como proteínas accesorias (E5, E6 y E7). Se conocen más de 100 tipos víricos, que se clasifican según su patogenicia oncológica en tipos de alto y de bajo riesgo oncológico. Los tipos de VPH de alto riesgo, incluidos VPH16, VPH18, VPH31, VPH33, VPH35, VPH39, VPH45, VPH51, VPH52, VPH56, VPH58, VPH59 y

VPH68, pueden inducir la transformación cancerígena de los epitelios infectados de la mucosa al escapar de los puntos de control del ciclo celular a través de la degradación de p53 y Rb mediado por las proteínas E6 y E7 proteínas, respectivamente. La expresión de E6/E7 (mayor en los virus de alto riesgo) permite integrar el genoma viral en las regiones de inestabilidad genómica, seguidas por la interrupción de la región de codificación E2 y desregulación de E6/E7 (6).

El epitelio escamoso estratificado de las criptas amigdalares de una sola capa es altamente invaginado y contiene niveles altos de bacterias y materiales extraños que generan la expresión del ligando de muerte celular programada-1 (PD-L1) y con ello un efecto de inmunosupresión. Contienen también una biopelícula compuesta por microcolonias bacterianas encerradas en una matriz de glucocáliz que también produce un efecto local de inmunosupresión que evita la eliminación de las células de la mucosa que han sido infectadas por VPH (32).

### **B. Proteína p16 en células malignas**

p16 es un gen supresor de tumores que se ubica en 9p21 y recibe al menos tres denominaciones: MTS-1 (supresor mayor de tumores 1), INK4a (inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 4a) o p16INK4 y CDKN2A (quinasas dependientes de inhibidor de ciclina 2A) (Figura 2). La proteína p16 es de 16kD, contiene 156 aminoácidos y comprende cuatro repeticiones de anquirina (RA). Las RAs están conformadas por regiones repetidas de alrededor de 31–34 residuos y consisten en conformación hélice-giro-hélice (Figura 3) (33). p16 inhibe el complejo CDK4/6-ciclina D1 y produce un efecto final fosforilación de pRb. En su ausencia, el pRb está hipofosforilado en G0 y en el inicio de G1, y se agrega a factores de transcripción E2F, evitando la interacción de factores de transcripción E2F con los

promotores de los genes involucrados en la proliferación (ciclina B1, dihidrofolato reductasa, JUNB y otros) y el cambio en la etapa del ciclo celular de G1 a S (33) (Figura 4).

La cavidad de p16 se une a la hendidura catalítica de CDK6 e induce una interacción electrostática entre D84 de p16 (en el segundo y tercer AR y en el bucle que conecta estos dos ARs) y R31 de CDK6, que produce una disminución en la actividad de la quinasa. La proteína p16 también inhibe CDK4/6 al comprometer la interacción con ciclina D1. p16 también reduce la formación de complejos entre CDK4/6 e Inhibidores de proteínas no-p16, lo que produce un aumento de la disponibilidad de inhibidores no-p16, inhibición de la actividad de CDK2 e hipofosforilación de pRb. p16 impide la fosforilación de TFIID, un factor de transcripción esencial, y suprime la actividad quinasa de JNK1 y JNK3 que finalmente detienen la proliferación celular en el límite G1/S. Finalmente, la vía paralela e interconectada de p14ARF en el eje de MDM2/p53 también es detenida al estimular E2F (Fig. 4) (33).

El VPH genera oncoproteínas codificadas por sus oncogenes E6 y E7. La oncoproteína producto del gen E7 se une a la proteína Rb desfosforilada y la inactiva. Estos cambios producen liberación de E2F y así el progreso del ciclo celular. La proteína p16 se incrementa como un mecanismo reactivo a nivel transcripcional que busca detener el progreso del ciclo celular generado por la presencia de Rb inactivada (producido por la oncoproteína del oncogén E7 del VPH). De esta manera, la sobreexpresión de p16 se comporta como un marcador sustituto para la detección de VPH (32).

### **C. Índice ki67**

Ki67 es una proteína que puede detectarse en células en proliferación a lo largo del ciclo celular (fases G1, S, G2 y M) pero está ausente en células en reposo (fase G0) (34). El punto de corte estudiado en distintos estudios en CECC ha sido variado incluyendo 10%, 30% y 50% (35).

### **D. Sistema inmune**

El sistema inmunitario se puede dividir en forma teórica y comprensiva en dos partes: (1) sistema inmunitario innato (general) y (2) sistema inmunitario adaptativo (especializado). El sistema inmunitario adaptativo se hace cargo de eliminar noxas, en casos que el sistema inmunitario innato no puede destruirlos. Identifica la noxa y se dirige específicamente a antígenos de esta. Este proceso es más lento (días) en desarrollarse que el del sistema inmunitario innato, pero más preciso y con memoria para "recordar" los antígenos y responder más rápido ante la reexposición. El sistema inmunitario adaptativo está formado por: Linfocitos T y linfocitos B entre las células de los tejidos del cuerpo; y anticuerpos en la sangre y fluidos (4).

Se han descrito 8 “pilares” en cáncer, siendo el último la evasión de la destrucción inmune. Las lesiones tumorales deben evitar la detección de las diferentes herramientas que tiene el sistema inmune para erradicarlas. Las personas inmunodeprimidas tienen incidencias mayores de ciertas neoplasias y la mayoría de estas son inducidas por virus. Los tumores implantados en ratones con deficiencia inmune (a través de alteraciones producidas por ingeniería genética) tienen una tasa de crecimiento más rápida que los implantados en ratones inmunocompetentes en estudios de laboratorio. También encuentran que las células tumorales provenientes de ratones inmunosuprimidos solo se implantan en huéspedes inmunosuprimidos



mas no en huéspedes inmunocompetentes. Observaciones clínicas encuentran que los recipientes de órganos trasplantados en tratamiento inmunosupresor pueden desarrollar crecimiento de células tumorales provenientes del donante del órgano (4,36).

### **E. Estroma tumoral**

El estroma es el compartimento que rodea y sostiene las células neoplásicas dentro de la masa tumoral y por lo tanto tiene como límite externo al margen tumoral. Está compuesto de matriz extracelular y células del estroma incluyendo las células inmunes, y alberga los vasos sanguíneos y linfáticos.

A medida que se desarrolla el tumor, el estroma asociado al tumor evoluciona y es manipulado para apoyar la progresión neoplásica. Las células tumorales reclutan diferentes células como linfocitos, macrófagos y fibroblastos asociados con el cáncer, para estimular el crecimiento celular; la invasión, inflamación y vasculogénesis, al tiempo que induce cambios arquitectónicos que facilitan la progresión del tumor a través del estroma tumoral (4).

### **G. Linfocitos infiltrantes tumorales**

Los TILs son un grupo heterogéneo de células que consiste en células B, células T (CD3 positivo), células T citotóxicas (CD8), células TNK (asesinas naturales), macrófagos (incluyendo los protumorales CD163+) y células plasmáticas. Se caracterizan como TIL cuando migran del torrente sanguíneo hacia el tumor, donde se encuentran en el estroma tumoral (4).

El grupo de trabajo internacional de biomarcadores de inmunooncología describe recomendaciones puntuales para cuantificar TIL en tumores sólidos.

Indica que los niveles de TIL deben ser evaluados en tres compartimentos: el intratumoral (en contacto con las células malignas), el estromal (área cercana a células malignas o islas rodeadas de células malignas pero sin contactarlas) y el borde invasor (área alrededor del tumor y en contacto con tejido normal del huésped). El nivel de TIL a nivel estromal es el recomendado como variable a analizar debido a tener un valor mayor al intratumoral y estar disponible en la mayoría de biopsias o piezas quirúrgicas. No existe consenso sobre un punto de corte estándar definido como nivel alto para TIL estromal el CECC (37,38).

#### **H. Densidad de linfocitos T CD3<sup>+</sup>**

Los linfocitos T (también llamados células T) son componentes del sistema inmunitario adaptativo. Estas células son producidas en la médula ósea y luego se trasladan a través del torrente sanguíneo al timo para madurar. Las funciones de las células T se pueden caracterizar en: (1) Activar otras células del sistema inmunitario a través de mensajeros químicos para iniciar el sistema inmunitario adaptativo (células T "Helper" o auxiliares). (2) Detectar células tumorales y destruirlas (células T citotóxicas). (3) Algunas células T auxiliares se convierten en células T de memoria, después de que la célula tumoral ha sido derrotada. Pueden "recordar" qué antígenos fueron eliminados y luego están listos para activar rápidamente el sistema inmunológico adaptativo al ser nuevamente expuestos a estos antígenos. Las células T tienen receptores de detección en sus superficies que pueden adherirse a estos antígenos en forma similar al formato candado- llave. El sistema inmunitario puede producir un tipo de célula T compatible para cada antígeno y multiplicarse rápidamente al activarse (4,39).

El antígeno CD3 es una glicoproteína receptora presente en los linfocitos T maduros que se comporta como correceptor del receptor de células T (TCR de las siglas en inglés). CD3 (del inglés cluster of differentiation) tiene un peso molecular de 20-28 kDa y pertenece a la familia de las inmunoglobulinas. Interviene en la transducción de señales y expresión del TCR en la superficie de la célula. Se expresa específicamente en timocitos y células T (4,39).

Por otro lado, la respuesta antitumoral mediada por CD4<sup>+</sup> T “Helper“ 1 (Th-1) a través de la secreción de grandes cantidades de citocinas proinflamatorias como IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ —promueve no solo atracción y activación de los linfocitos citotóxicos sino también la actividad antitumoral de los macrófagos y células TNK y un aumento general en la presentación de antígenos tumorales. Las células T reguladoras (Tregs) son responsables de suprimir la atracción, activación y citotoxicidad de otras células inmune efectoras, tales como células T CD4 Th1, linfocitos citotóxicos, macrófagos, células TNK y neutrófilos (4,39).

Rajjoub y colaboradores encontraron que la densidad alta de células CD3<sup>+</sup> se correlacionó con un resultado favorable en el cáncer de orofaringe (40) y Sinicrope y colaboradores encontraron resultados similares en cáncer de colon (41).

### **I. Densidad de linfocitos T CD8<sup>+</sup>**

CD8 (Cúmulo de diferenciación 8 o "cluster of differentiation" en inglés) es una glicoproteína dimerica de 65-70kDa que cruza la membrana y participa como correceptor en la estabilización de la adhesión del TCR a moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo I (MHC I) (4,39).

El CD8 complementa la función del TCR y es expresado de modo alternativo y excluyente a CD4, de modo que no existen células con ambos receptores, con

excepción de los linfocitos T durante parte de su maduración, en que se denominan doble positivos aquellos linfocitos que poseen CD4 y CD8 conjuntamente, y están en proceso de reordenamiento de TCR $\alpha$  (4,39).

El CD8 se expresa predominantemente en la superficie de las células T citotóxicas donde se comporta como marcador de linaje, pero también se puede encontrar en células TNK, células corticales del timo y células dendríticas. Es una proteína compuesta por dos cadenas  $\alpha/\beta$ . El dominio extracelular similar al dominio variable de la inmunoglobulina de CD8- $\alpha$  interactúa con la porción  $\alpha 3$  de la molécula MHC de Clase I. Esta afinidad mantiene al TCR de la célula T citotóxica y a la célula diana estrechamente unidos durante la activación específica del antígeno que conduce a la activación de factores de transcripción como NFAT, NF- $\kappa$ B, y AP-1 que afectan la expresión de ciertos genes (Figura 5). Durante las etapas de iniciación del tumor, las células T CD8 vírgenes son expuestas a antígenos inmunogénicos por parte de las células presentadoras de antígenos en el drenaje de los ganglios linfáticos. Se produce su diferenciación en linfocitos T citotóxicos con el desarrollo de la habilidad de realizar exocitosis de gránulos que contienen perforina y granzima contra las células diana (4,39).

Estudios de modelos preclínicos y cánceres humanos han demostrado que los linfocitos que expresan CD8 (CD8+) limitan el crecimiento de las células neoplásicas, suprimen la infiltración tumoral y median en la eliminación total de tumores (4).

Las células T citotóxicas CD8+ son parte de los TIL y es uno de los mecanismos de la inmunidad antitumoral a través de la respuesta inmune tipo 1. Los TIL CD8+ pueden identificar péptidos antigénicos endógenos presentados por moléculas del

complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) I y produce Interferón Gamma. La densidad de TIL CD8<sup>+</sup> en el tejido tumoral está estrechamente relacionada con un mejor pronóstico en el cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, carcinoma oral de células epidermoides y carcinoma hepatocelular (42).

#### **J. Densidad de macrófagos activados M2 CD163<sup>+</sup>**

CD163 es un antígeno específico de monocitos y macrófagos asociado con el proceso antiinflamatorio. Se ha identificado como el "receptor barrendero de hemoglobina (Hb)" por la captación de Hb liberada en el plasma y que forma un complejo con haptoglobina durante la hemólisis intravascular. El receptor también se une a la proteína inductora débil de la apoptosis similar al factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (39,43).

CD163 es una proteína de membrana de 130 kDa con una cola citoplásmica corta, un solo segmento transmembrana y un ectodominio grande que consta de nueve dominios de clase B de receptor rico en cisteína. El gen CD163 se encuentra en el cromosoma 12. La expresión de CD163 humano está restringida al linaje de los monocitos-macrófagos como macrófagos de la pulpa roja, macrófagos de la médula ósea, macrófagos del hígado (células de Kupffer), macrófagos del pulmón y macrófagos de varios otros tejidos. Los estimuladores más potentes de la expresión de CD163 que se conocen son glucocorticoides, interleucina (IL)-6, IL-10 y hemo/Hb, mientras que los inhibidores de su expresión son IL-4, lipopolisacárido, FNT- $\alpha$  e interferón C, CXC-ligando de quimiocina 4 y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (39,43).

Los macrófagos asociados a tumores (TAM) provienen de los monocitos clásicos circulantes que se diferencian después de la extravasación en los tejidos. Son

impulsores importantes de la inflamación crónica asociada con el cáncer. Los TAM pueden ser proinflamatorios contra las células malignas ("tipo M1", impulsado por  $IFN\gamma$ ) o macrófagos inmunosupresores ("tipo M2", impulsado por IL-4 o IL-13, Quimocina- Ligando-2, VEGF, Quimocina- Ligando- 5 y Factor- Estimulante de Colonias Macrófagos- 1). Los TAM tipo M2 estimulan la angiogénesis y la linfangiogénesis, la proliferación celular y transición epitelio-mesénquima, promueve la metástasis e induce inmunosupresión de células inmunitarias efectoras antitumorales. Los TAM tipo M2 secretan citoquinas como IL6, IL-10 y TGF- $\beta$  que alteran la actividad de las células T efectoras e inhiben la maduración de células dendríticas. Los TAM tipo M2 también estimulan directamente la proliferación de las células cancerosas a través de la secreción del factor de crecimiento epidérmico (EGF), promueven la angiogénesis tumoral mediante la secreción vascular de EGF (VEGF) y remodelan la matriz extracelular secretando metaloproteinasas (39).

La presencia de macrófagos en el estroma tumoral está correlacionada con estadios tumorales avanzados y progresión en cáncer de cabeza y cuello (44).

### **K. Sobrevida global**

La tasa de SG es el porcentaje de pacientes que están vivos a un determinado tiempo después de que se les diagnostica una enfermedad. Su uso es habitual en casos de enfermedades que tienen un mal pronóstico como el CECC que se caracteriza por una elevada mortalidad. Las tasas de SG a cinco años se utilizan comúnmente como criterio convencional para comparar pronóstico de distintas neoplasias o tratamientos (27)

#### **I.4. Pregunta de investigación**

¿La coexistencia de sobreexpresión de la proteína p16 (marcador sustituto de infección por VPH) y niveles altos de linfocitos infiltrantes tumorales, T CD3-positivos, T citotóxicos CD8-positivos o macrófagos activados CD163+ puede identificar una población con tiempo de vida prolongada?

## **II. OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Evaluar la asociación entre el estado de p16, el nivel de linfocitos infiltrantes tumorales y la sobrevida de pacientes con CECC.

### **Objetivos específicos**

1. Evaluar la asociación entre la sobrevida global y el estado de p16 en pacientes con CECC.
2. Evaluar la asociación entre la sobrevida global y los niveles de TIL en pacientes con CECC.
3. Evaluar la sobrevida global según la densidad de linfocitos en pacientes con CECC.
4. Evaluar la asociación entre las variables clinicopatológicas y el estado de p16, niveles de TIL, CD3, CD8 y CD163 en pacientes con CECC.
5. Evaluar la asociación entre las variables clinicopatológicas y el estado de p16, niveles de TIL, CD3, CD8 y CD163 en pacientes con tumor primario en orofaringe.

### **Hipótesis**

Los pacientes con tumores epidermoides con estado positivo para tinción p16 y niveles altos de TIL, densidad células CD3+, CD8+ o CD163+ tienen mayor sobrevida global que los pacientes con tumores sin estas características.



### **III. METODOLOGÍA**

#### **III.1. Población de estudio.**

La población de estudio fueron las muestras de tejido tumoral de los pacientes diagnosticados con CECC en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas entre los años 2005 y 2013.

#### **III.2. Diseño muestral y selección de la muestra**

Estudio de Casos y Controles de base poblacional: El objetivo principal de la presente tesis es evaluar la asociación entre SG y el estado de p16 y los niveles de TIL en pacientes con CECC. Se consideró a los pacientes con CECC vivos a los 5 años como los casos y los pacientes con CECC fallecidos a los 5 años como los controles para esta tesis.

El Factor de Riesgo fue la combinación de p16 positivo y los niveles altos de TIL. Se ha revisado los casos según el listado obtenido del departamento de Estadística. Se realizó la búsqueda del material tumoral disponible en el archivo de Patología. Se revisó la historia clínica de estos pacientes en el archivo de historias clínicas y el sistema electrónico.

#### **III. 3. Criterios de elegibilidad**

##### **III.3.1. Criterio de inclusión:**

- Pacientes con diagnóstico de CECC atendidos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas entre el año 2005 al 2013.

- Localizaciones incluidas fueron cavidad Oral, orofaringe, hipofaringe y laringe.
- Información de estado de vida en la historia clínica o en su defecto en la página de RENIEC.
- Material tumoral de diagnóstico residual disponible en el archivo de patología.
- Disponibilidad de información clínica, resultados de estudios de imágenes, de laboratorio y patología.

### **III.3.2. Criterio de exclusión:**

- Pacientes con diagnóstico previo de otra neoplasia.
- Pacientes con histología distinta a epidermoide o escamoso.

### **III.4. Variables**

Las variables consideradas en este estudio son las siguientes (tabla 1):

- Estado de la tinción p16 (sobrexpresión) evaluado por patología: Positivo vs Negativo.
- Resultado ki67 en relación a la mediana: Alto vs Bajo\*.
- Porcentaje de TIL estromal en relación a la mediana: Alto vs Bajo\*.
- Densidad Linfocitos T CD3-positivo infiltrantes tumorales en relación a la mediana: Alto vs Bajo\*.
- Densidad Linfocitos T citotóxicos CD8-positivo infiltrantes tumorales en relación a la mediana: Alto vs Bajo\*.
- Densidad Macrófagos M2 CD163-positivo en relación a la mediana: Alto vs Bajo\*.

Se conformaron 4 Grupos= (1) p16-Positivo & TIL alto, (2) p16-Positivo & TIL bajo (3) p16-Negativo & TIL alto, (4) p16-Negativo & TIL bajo.

Los 4 grupos se comparan con relación a:

Sobrevida Global: El estado de vida del paciente se obtuvo a través de las historias clínicas según fecha de último seguimiento y según la información públicamente disponible en la página web de RENIEC.

\* Se clasifica la variable en relación a la mediana (incluyéndola en el grupo alto) debido a que no existe un corte estándar en la literatura (valores que se describen en las tablas de resultados).

### **III.5. Procedimientos y técnicas**

**III.5.1. Selección de pacientes:** Se seleccionó los casos según los criterios de elegibilidad, a partir de una base de datos recibida del Departamento de Epidemiología y Estadística de INEN. Se revisó la información clínica y patológica de la historia clínica de cada paciente luego de solicitarla a archivo de historias clínicas. Se transfirió la información a una base de datos y las variables estándares faltantes en la historia clínica se intentaron obtener con la revisión prospectiva de la muestra tumoral por un patólogo en los casos en los que las muestras lo permitían.

**III.5.1. Evaluación de TIL:** Se evaluó las láminas con tinción H&E almacenadas en el archivo de Patología de los casos incluidos en la serie. Todas las muestras incluidas fueron de lesiones sin exposición a terapia sistémica o radioterapia. Un patólogo especialista en cáncer cuantificó el porcentaje de linfocitos según los criterios descritos por el grupo de trabajo internacional de biomarcadores de inmunooncología.

Los TIL se han cuantificado en el compartimento estromal (= % de TIL estromales) y se evaluaron en el área tumoral central que no está en contacto directo con las células malignas.

No se cuantificó los TIL en zonas tumorales con artefactos de aplastamiento, necrosis e hialinización regresiva, ni en el lugar de biopsia previa. Se excluyó los leucocitos polimorfonucleares o neutrófilos. No se incluyó áreas de alta concentración de linfocitos, como formaciones linfoides terciarias.

Se contó todas las células mononucleares (incluidos los linfocitos y las células plasmáticas). Los TIL se cuantificaron como una variable continua con intervalos de 10 o 5% tomando en cuenta el patrón de crecimiento disociado de los linfocitos (37,38).

Finalmente, se dividió los resultados en alto (igual o por encima de la mediana) y bajo (tabla 1).

**III.5.3. Evaluación de Inmunohistoquímica:** Un patólogo especialista en cáncer seleccionó las áreas tumorales que tenían densidad mayor de TIL (distinto a formaciones linfoides terciarias) dentro de la lesión y se extrajo muestras de 5 mm de diámetro para la preparación de “tissue microarrays” (TMA) de parafina fijado con formalina. Los TMA se construyeron con un equipo manual (Quick-Ray Manual Tissue Microarrayer; Unitma Co. Ltd, Seoul, Korea). No se seleccionó el área del margen invasivo en ningún caso. Cada bloque de parafina contenía un total de 8 cilindros tumorales (1 por cada caso). Las secciones se rehidrataron en solución salina tamponada con fosfato (PBS, del inglés Phosphate-Buffered Saline) y la recuperación del antígeno se realizó por inmersión en solución de tripsina al 0,1% en PBS a 37°C durante 5-10 minutos o mediante calentamiento por microondas durante 5 minutos  $\times$  4 (total, 20 min) en una solución tampón de citrato 10 mM (pH 6,0). Las secciones se trataron durante 45 minutos con suero de cabra normal al 10% o suero de caballo normal en PBS.

Se usaron los anticuerpos mencionados en la tabla 2 sobre las secciones histológicas de 4 $\mu$ m de espesor provenientes de TMAs.

Las secciones se incubaron adicionalmente en fosfatasa alcalina-estreptavidina durante 30 minutos a temperatura ambiente, se hicieron reaccionar con “Fast Red Substrate System” (Dakopatts) o con Dako®

Fuchsin + Substrate-Chromogen, y luego se tiñeron con hematoxilina Mayer. En las secciones de control negativo, la especificidad del antisuero se probó reemplazando los anticuerpos primarios con suero normal, y se usaron secciones de ganglios linfáticos humanos como controles positivos para el antígeno CD3 y CD8.

Se realizó en forma prospectiva la lectura de la tinción p16 por un patólogo del INEN en todos los casos (con tinción previa o con tinción dentro de la presente tesis). Se consideró estado positivo para p16 o sobreexpresión de la proteína cuando existía tinción de los núcleos celulares, independientemente de que también existiese tinción citoplasmática, en forma fuerte y difusa en al menos 70% de las células malignas.

Las láminas de IHQ se escanearon en el equipo BX63 Olympus (Tokio, Japón) utilizando el lente objetivo x40. Las imágenes digitalizadas se analizaron utilizando el software de análisis de imágenes “Visiopharm Tissuemorph Digital Pathology” (Visiopharm, Hoersholm, Dinamarca). Un algoritmo para selección de señales específicas fue diseñado manualmente para cada caso. Se realizó la selección de 5 campos de alto poder por patólogo y cuantificación de linfocitos por científico mediante conteo automatizado del número total de células y número de células inmunes que captan la tinción de inmunohistoquímica utilizada en 5 campos de alto poder. Se categorizó como alto (igual o por encima de la mediana) y bajo.

#### **III.5.4. Análisis de datos**

Se realizó el cálculo de tamaño de muestra según el modelo de regresión proporcional de riesgo (programa para cálculo disponible en la página [Sample size – Survival analysis | Sample Size Calculators \(sample-size.net\)](http://sample-size.net)) (45) en base a la serie de Quintero y al estudio Ward y colaboradores (27). Se aceptó un riesgo alfa de 0.05 y un riesgo beta de 0.2 en un contraste bilateral. Se espera que el 18% de nuestros casos sean p16 positivos de acuerdo a serie Latinoamericana de Quintero y col (13) y de estos se estima que el 50% tengan altos niveles de TIL según estudio de Ward (correspondiendo al 9% del grupo total) (27). Se consideró una Hazard Ratio

de 0.41 para sobrevivida a favor del grupo p16+ y TIL alto de acuerdo al estudio de Ward. El cálculo indica que se alcanzaría una asociación significativa con la sobrevivida con el desarrollo de 6 versus 104 eventos con una población total de 296 casos incluidos de acuerdo a la fórmula de modelo de regresión proporcional al riesgo (45). Se confeccionó una base de datos utilizando el programa Microsoft Excel 2000 (Microsoft Corporation, EE UU) según la tabla de operacionalización de variables (tabla 1). Esta base de datos no incluye información relacionada con la identificación y domicilio de los pacientes. La identificación de los pacientes se relacionó con un orden numérico en otra base de datos custodiada por el investigador principal y que se destruyó una vez consolidada la información para obtener así un proceso de anonimización completa.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa informático SPSS 12.0.0. (LEAD Technologies, Chicago, IL, EE UU).

El análisis de los datos incluyó:

- Descripción de la distribución y frecuencia de cada una de las variables.
- Estudio de la asociación de variables cualitativas dicotómicas mediante el test Chi-Cuadrado o exacta de Fisher.
- La comparación de las medias se realizó mediante el test t-student.
- La asociación entre dos variables cuantitativas se realizó mediante el coeficiente de correlación intraclass (CCI). Se concluyó en pobre correlación con CCI menor de 0,50, moderada correlación con CCI entre 0.5 y 0.75, buena correlación con CCI entre 0,75 y 0,9; y excelente correlación con CCI mayor que 0,9.
- El análisis de duración de SG luego del diagnóstico comparativo entre los 4 grupos se realizó mediante Curvas Kaplan Meier.
- Toda evaluación estadística se realizó a un nivel de significación de 5% o nivel de confiabilidad de 95%.

### **III.6. Consideraciones éticas**

**III.6.1. Participación de seres humanos:** El estudio involucra la realización de evaluaciones estándares en muestras diagnósticas residuales de pacientes que asintieron a la realización de biopsia y estudio estándar en estas: Evaluación de proteína p16 mediante metodología estándar, y evaluación de Linfocitos Infiltrantes Tumorales a través de una metodología objetiva y reproducible.

**III.6.2. Proceso del consentimiento informado:** El presente estudio no requiere consentimiento informado de los participantes debido a que el biomarcador p16 es estándar en muestras diagnósticas, y la cuantificación de los linfocitos infiltrantes tumorales y sus subpoblaciones son parte del biomarcador estándar denominado infiltración linfovascular. El resultado de las mencionadas pruebas no modifica la terapia que deben recibir los pacientes. La información del estado de vida de los pacientes se obtuvo de la historia clínica y del servicio brindado por RENIEC. Finalmente, la información vertida a la base de datos fue anonimizada.

#### **III.6.3. Consecuencias de la participación en el Estudio**

Beneficios de la participación en el estudio:

Los participantes no recibieron ningún beneficio médico o económico por la participación en este proyecto. Sin embargo, esta investigación podrá ser beneficiosa para futuras generaciones.

Daños potenciales por la participación en el estudio: Ninguno

#### **III.6.4. Confidencialidad de la información obtenida**

Todas las muestras fueron codificadas para su uso y los resultados individuales fueron anónimos.

Las variables del estudio fueron relacionadas a un orden numérico y se almacenaron en una segunda base de datos para mantener la confidencialidad.

### **III.6.5. Informe de resultados de las pruebas a los participantes**

No se informó los resultados, debido a que los resultados obtenidos no influenciarán directamente en el tratamiento futuro del paciente. Los resultados obtenidos son para fines exclusivos de investigación.



## **IV. RESULTADOS**

### **IV.1. Información Epidemiológica**

Se incluyeron 432 casos de CECC y se obtuvo la información completa para las variables edad, sexo, localización y estado de vida. Sin embargo, para el resto de variables no se logró obtener la información en el total de los casos.

La mediana de edad fue 65 años y el 51.4% fueron mujeres. El lugar primario fue la cavidad oral en 272 casos (63%), la orofaringe en 111 (25.7%), la laringe en 34 (7.9%) y la hipofaringe en 15 (3.5%). Se realizó disección de cuello en 228 casos (52.8%).

El grado histológico fue bajo en 137 (32.3%), moderado en 262 (61.8) y alto en 25 (5.9%). Se encontró queratinización en 339 casos (86.3%), invasión perineural en 134 (52.9%) e invasión linfovascular en 88 (34.5%).

Del total, 51 casos (11.9%) correspondieron a estadio clínico I; 112 (26.2%) a estadio II; 102 (23.8%) a estadio III y 163 (38.1%) a estadio IV. Se encontró el estado p16+ en 64 (18%) de los 359 casos evaluados (Figura 6), la mediana de ki67 fue de 30% y la mediana de TIL fue de 70% (Figura 7). La mediana de densidad celular de CD3+, CD8+ (Figura 8) y CD163+ (Figura 9) fue 57.4 /HPF, 21/HPF y 21.6/HPF. Los resultados pueden verse en la tabla 3 y en las figuras 6 a 9.

Para el grupo de tumores primarios de orofaringe (n=111) la mayoría fueron mujeres (63.9%) y el grado histológico fue 2 en 67.8%. Se encontró queratinización en 65.9%, invasión perineural en 50% e invasión linfovascular en 29.4%.

La mayoría se diagnosticó en estadio IV (55.8%). Se encontró el estado p16+ en 36 (40.9%), el 55.2% tuvieron  $ki67 \geq 30\%$  y 31 60.7% tuvieron  $TIL \geq 70\%$  (tabla 4).

### **IV.2. Análisis de asociación**

El estado p16+ se asoció con primario de orofaringe (40.9%) ( $p < 0,001$ ), sexo masculino ( $p = 0.024$ ), grado histológico 3 ( $p < 0.001$ ), tumores no queratinizantes ( $p < 0.001$ ), EC IV ( $p = 0.009$ ) y un Ki67 alto (18,7% versus 2.6%,  $p < 0.001$ ).

Un nivel de TIL mayor a la mediana se asoció con ki67 alto ( $p=0.018$ ), densidad por encima de la mediana de CD3 ( $p<0.001$ ), CD8 ( $p<0.001$ ) y CD8 / CD3 ( $p=0.038$ ) (tabla 5).

El estudio de correlación intraclase muestra pobre a moderada correlación entre TIL estromal y densidad CD3 ( $ICC=0.338$ ,  $p=0.052$ ) o entre TIL estromal y densidad CD8 ( $ICC=0.422$ ,  $p=0.019$ ). La correlación entre CD3 y CD8 fue buena ( $ICC=0.777$ ,  $p<0.001$ ).

El estudio de correlación intraclase muestra pobre a moderada correlación entre densidad CD163 y TIL ( $ICC=0.113$ ,  $p=0.644$ ), y entre densidad de CD163 y CD3 ( $ICC=0.218$ ,  $p=0.117$ ) y entre densidad de CD163 y CD8 ( $ICC=0.128$ ,  $p=0.255$ ).

El estado p16+ se asoció con nivel alto de TIL estromal en los tumores de orofaringe ( $p=0.02$ ) pero no en los de cavidad oral ( $p=0.43$ ) ni en la población total (Tabla 6). Adicionalmente, se encontró que en el grupo de tumores primarios de orofaringe p16+ se asoció a tumores pobremente diferenciados ( $p=0.005$ ), no queratinizantes ( $p=0.007$ ) y con alto ki67 ( $p=0.004$ ).

### **IV.3. Análisis de Sobrevida**

La mediana de seguimiento fue de 1.15 años, media de 3.15 años (0.01- 16.3 años) y fallecieron un total de 288 casos, siendo de 257 al corte de 5 años. La localización de tumor primario en laringe e hipofaringe ( $p=0.009$ ), los estadios clínicos tempranos ( $p<0.001$ ), ausencia de ulceración ( $p=0.022$ ), ausencia de infiltración perineural ( $p=0.025$ ) y ausencia de infiltración linfovascular ( $p=0.001$ ) se asociaron

a una mayor SG. La densidad baja de CD3 ( $p=0.069$ ) tuvo una tendencia asociarse a una mayor SG.

Cuando se clasifica la población según el estado de p16 y niveles de TIL estromal se obtuvieron 4 grupos: (1) p16+ y TIL alto ( $n=17$ ), (2) p16- y TIL alto ( $n=105$ ), (3) p16+ y TIL bajo ( $n=7$ ), y (4) p16- y TIL bajo ( $n=67$ ). El análisis de sobrevida de estos grupos mostró una tendencia de mayor SG para el primero (64.7% vs 44.8% vivos a los 5 años,  $p=0.083$ ) (Figura 10). La descripción de los casos incluidos en este análisis encontró que aquellos con información de niveles de TIL y densidad CD3 y CD8 ( $n=7$  casos) no coinciden en la dirección en relación con la mediana. Así, tres casos tuvieron niveles de TIL estromal  $>70\%$  y solo uno de ellos tuvo densidad de CD3 por encima de la mediana, mientras que 4 casos tuvieron TIL  $<70\%$  y opuestamente todos ellos tuvieron densidad de CD3 por encima de la mediana (Tabla 7).

También encontramos que ninguno de los casos con presencia simultánea de ambos p16+ y densidad alta de CD3 ( $p=0.002$ ) o CD8 ( $p=0.002$ ) estuvo vivo a los 5 años (Figura 11 y Figura 12).

Cuando se evaluó el cáncer de orofaringe, la SG no se asoció con p16 ( $p=0.251$ ), ki67 ( $p=0.351$ ), TIL Estromales ( $p=0.728$ ), densidad de CD3 ( $p=0.098$ ), CD8 ( $p=0.106$ ) ni CD163 ( $p=0.439$ ). Sin embargo, la co-presencia de p16+ y TIL alto se asoció en forma significativa a una mayor sobrevida (80% vs 34.8% vivos a los 5 años,  $p=0.013$ ) (tabla 4) (Figura 13).

## V. DISCUSIÓN

La presencia de sobreexpresión p16, un marcador sustituto de infección por PVH, es infrecuente entre los pacientes con CECC que se atienden en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas, sin embargo, su frecuencia es mayor en tumores de primario orofaríngeo, en pacientes de sexo masculino, estadio avanzado e índice de replicación de células tumorales (ki67) alto. La asociación entre la sobreexpresión de p16 y marcadores de agresividad como grado histológico y alto índice de replicación ha sido descrita por otros autores y se explica claramente por el efecto que tiene la proteína p16 sobre el engranaje del ciclo celular (46,47). Los niveles altos de TIL estromal se asociaron con índices altos de ki67, así como densidad alta de células CD3+ y de CD8+. Se observó que existe una asociación entre TIL estromal y sobreexpresión p16 en el subgrupo con tumor primario de orofaringe (mas no en los otros primarios de CECC). Rice y colaboradores utilizaron una plataforma in vivo de administración de genes virales E6 y E7 del VPH16 en tumores en ratones y encontraron que los genes virales indujeron la infiltración de linfocitos CD8+ (48).

Encontramos al igual que otras series, que los tumores con las características de tener el primario en laringe e hipofaringe, estadio clínico temprano, ulceración, IPN-, ILV-, y ausencia de recurrencia se asociaron a una SG prolongada en comparación con los tumores sin las características mencionadas (2-4,17).

Nuestro análisis no encuentra que los casos p16+ tengan una mayor sobrevida en la población general, sin embargo, encontramos una ligera tendencia a predecir pronóstico en la subpoblación con primario de orofaringe (44.4% vs 36.5% vivos a los 5 años, p=0.251). Esta ausencia de significancia podría deberse al tamaño

muestral pequeño de nuestra serie o a que nuestra población podría tener tasas de infección por VPH menores a las que se mencionan en publicaciones en población caucásica debido a diferencias entre razas (17).

Los casos que presentaron ambas características: p16+ y niveles altos de TIL tuvieron una tendencia a una mayor sobrevida. La acumulación de linfocitos podría representar el reconocimiento de niveles celulares altos de la proteína p16 o de diferentes antígenos generados por la infección por PVH por un sistema inmune activo. Estos linfocitos forman parte del sistema inmunitario adaptativo y serían efectivos en la eliminación de las células malignas con la mejoría final en la sobrevida. Los linfocitos tienen diferentes mecanismos para eliminar sus células objetivo. Su presencia en el sitio tumoral definitivamente implica el uso de mecanismos dependientes del contacto, que incluyen perforina/granzima y Fas-FasL, e incluso mecanismos independientes del contacto, como la producción de TNF $\alpha$  o IFN $\gamma$  (39). La combinación de estado p16+ y altos niveles de TIL en el subgrupo de tumores con primario de orofaringe si logro predecir una mayor sobrevida en niveles estadísticamente significativos. Lo cual podría significar que los linfocitos en esta localización reciben una estimulación y activación altamente efectiva para lograr eliminar las células tumorales infectadas por PVH (49).

Estos hallazgos indicarían por primera vez que este biomarcador podría predecir una mayor sobrevida para nuestra población Sudamericana en forma similar a lo descrito por otros investigadores en población Caucásica como se describe en la tabla 8.

Cuando evaluamos el valor pronóstico de la densidad de células inmunes, se encontró que opuesto a lo esperado, ninguno de los casos con co- presencia de

densidad alta de linfocitos CD3 o CD8 y estado p16 había logrado sobrevivir a los 5 años. En la evaluación de estos casos se encuentra que discrepan de los casos con niveles altos de TIL lo que se explica por el hecho que esta densidad no representaría los niveles de estas subpoblaciones celulares en todo el tumor puesto que se seleccionó el área de análisis de la densidad de los linfocitos (identificados por inmunohistoquímica) en el área con niveles altos de TIL. Estas regiones podrían estar concentrando poblaciones de linfocitos anérgicos y con actividad protumoral (39). Por lo mencionado, se requiere que estudios futuros adicionen el estudio de densidad de células del sistema inmune también en una región con niveles bajos de TIL para poder evaluar la razón de la discrepancia de sus densidades con el porcentaje tumoral de TIL.

El siguiente paso en esta línea de investigación sería evaluar el valor predictivo del biomarcador TIL alto/ p16+ para respuesta terapéutica a los agentes inmunes de punto de corte en ensayos clínicos en CECC. Esta información podría permitir una mejor selección de tratamiento para cada paciente con la reducción de toxicidad y costos innecesarios.

Análisis por subgrupos de ensayos clínicos recientemente publicados sugieren que los tumores de CECC VPH -positivo tienen una mayor tasa de respuesta a los inhibidores de PD-1/PD-L1 que los que no lo son, sin embargo, esta no supera el 30% (50,51). Estudios in vivo encuentran que agregando vacunas dirigidas contra E6/E7 a la terapia anti PD-L1 se produce un incremento del control del crecimiento tumoral y se mejora la supervivencia de los ratones con CECC (41). Un ensayo clínico de fase II con 24 pacientes con cáncer VPH positivo tratados con vacunas

terapéuticas contra el VPH y Nivolumab (antagonista de PD-1) encontraron una tasa de respuestas del 33 % con mediana de SG de 17,5 meses (52).

Una de las limitaciones de este estudio fue el corto tiempo de seguimiento en un porcentaje importante de la población analizada, debido al abandono del tratamiento por razones de comorbilidades severas, razones geográficas, sociales o económicas. Por esta razón se realizó la búsqueda del estado de vida y fecha de muerte a través de la agencia del gobierno RENIEC y se escogió la sobrevivencia global como el objetivo a correlacionar con el biomarcador, sin embargo, esto implica que algunas muertes no hayan sido ocasionadas por la neoplasia sino por otras causas como comorbilidades.

La información obtenida en forma retrospectiva de las historias clínicas no permitió completar los datos de todas las variables clínicas (como el estadio clínico) o patológicas que se han analizado, por lo cual los subgrupos no alcanzaban el total de los 432 casos incluidos, sin embargo, la variable estado de vida, que fue necesaria para evaluar el objetivo principal, sí fue obtenida en la totalidad de los casos.

Por otro lado, no se realizó una evaluación directa del VPH, sino se determinó el estado de la proteína p16 por inmunohistoquímica como marcador sustituto de detección de infección de VPH. Aunque el análisis de inmunohistoquímica de p16 no es tan específico como la detección génica del virus, no se afecta por la antigüedad de las muestras parafinadas que se analizan a diferencia de las técnicas génicas que sí tienen una reducción significativa en la sensibilidad de detección del virus.

Finalmente, el análisis de la densidad de las células inmunes infiltrantes tumorales que se ha realizado por inmunohistoquímica evalúa solo un área del tumor que podría no representar a la totalidad del tumor.



## VI. CONCLUSIONES.

1. No hubo asociación entre la expresión de p16 y la SG de pacientes con cáncer epidermoide de cabeza y cuello.
2. No hubo asociación entre el nivel de TIL y la SG de pacientes con cáncer epidermoide de cabeza y cuello. Sin embargo, el grupo de pacientes con sobreexpresión de p16 y niveles altos de TIL estromales tuvo una tendencia a una mayor SG.
3. En el subgrupo de tumores con primario de orofaringe, el grupo de pacientes con sobreexpresión de p16 y niveles altos de TIL estromales se asoció a una mayor SG.
4. La densidad baja de linfocitos CD8 se asoció con una SG prolongada en cáncer epidermoide de cabeza y cuello.
5. La sobreexpresión de p16 se asoció con primario de orofaringe, sexo masculino, grado histológico 3, no queratinizante, EC IV y un Ki67 alto, mientras que TIL alto se asoció con alto ki67.

## **VII. RECOMENDACIONES**

Se recomienda implementar y realizar, a nivel nacional, la tinción de inmunohistoquímica para p16 en los tumores con primario de orofaringe.

Se sugiere que, con la finalidad de orientar a los pacientes, en relación a su pronóstico, se realice en forma individualizada la tinción de inmunohistoquímica para p16 y lectura de Linfocitos Infiltrantes Tumoraes en tumores de histología epidermoide de cabeza y cuello. Esta recomendación es más fuerte para los tumores con primario de orofaringe.

Se recomienda que los estudios de biomarcadores predictivos de respuesta a terapia a realizarse en el futuro, consideren realizar la evaluación de densidad de células inmunes en diferentes áreas del tumor, así como el análisis de los linfocitos infiltrantes tumorales.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Payet-Meza E, Peerez-Mejia P, Poquioma-Rojas E, Díaz Nava E, Rojas Vilca J. Registro de cáncer de lima metropolitana. incidencia y mortalidad 2013–2015 [Internet]. Lima: Instituto Nacional de Enfermedades Neoplasicas; [cited 2022 Jul 6]. Available from: <https://portal.inen.sld.pe/wp-content/uploads/2022/01/REGISTRO-DE-CANCER-DE-LIMA-METROPOLITANA-2013-2015.pdf>
2. Johnson DE, Burtness B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primer*. 2020;6(1):92.
3. Gormley M, Creaney G, Schache A, Ingarfield K, Conway DI. Reviewing the epidemiology of head and neck cancer: definitions, trends and risk factors. *Br Dent J*. 2022;233(9):780–6.
4. De Vita Junior V, Lawrence T, Rosenberg S. *Cancer: principles & practice of oncology: annual advances in oncology*. Lippincott Williams & Wilkins. 2018;169–76.
5. Gatta G, Botta L, Sánchez MJ, Anderson LA, Pierannunzio D, Licitra L, et al. Prognoses and improvement for head and neck cancers diagnosed in Europe in early 2000s: The EUROCORE-5 population-based study. *Eur J Cancer*. 2015;51(15):2130–43.
6. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Meeting, International Agency for Research on Cancer. *Human papillomaviruses*. Vol. 90. World Health Organization; 2007.
7. Sabatini ME, Chiocca S. Human papillomavirus as a driver of head and neck cancers. *Br J Cancer*. 2020;122(3):306–14.
8. O’Sullivan B, Huang SH, Su J, Garden AS, Sturgis EM, Dahlstrom K, et al. Development and validation of a staging system for HPV-related oropharyngeal cancer by the International Collaboration on Oropharyngeal cancer Network for Staging (ICON-S): a multicentre cohort study. *Lancet Oncol*. 2016;17(4):440–51.
9. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TNM classification of malignant tumours*. John Wiley & Sons; 2017.
10. Gillison ML, Alemany L, Snijders PJ, Chaturvedi A, Steinberg BM, Schwartz S, et al. Human papillomavirus and diseases of the upper airway: head and neck cancer and respiratory papillomatosis. *Vaccine*. 2012;30:F34–54.
11. Ndiaye C, Mena M, Alemany L, Arbyn M, Castellsagué X, Laporte L, et al. HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol*. 2014;15(12):1319–31.

12. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(2):467–75.
13. Quintero K, Giraldo GA, Uribe ML, Baena A, Lopez C, Alvarez E, et al. Human papillomavirus types in cases of squamous cell carcinoma of head and neck in Colombia. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2013;79:375–81.
14. Petitto G, Carneiro MA dos S, Santos SH de R, Silva AMTC, Alencar R de C, Gontijo AP, et al. Human papillomavirus in oral cavity and oropharynx carcinomas in the central region of Brazil☆. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2017;83:38–44.
15. Pennacchiotti G, Sáez R, Martínez MJ, Cárcamo M, Montes R. Prevalencia del Virus Papiloma Humano en pacientes con diagnóstico de Carcinoma Escamoso de la Cavidad Oral. *Rev Chil Cir.* 2016;68(2):137–42.
16. Boffetta P, Lavecchia C, Levi F, Lucchini F. Mortality patterns and trends for lung cancer and other tobacco-related cancers in the Americas, 1955–1989. *Int J Epidemiol.* 1993;22(3):377–84.
17. Walter L, Vidaurre T, Gilman RH, Poquioma E, Olaechea C, Gravitt PE, et al. Trends in head and neck cancers in Peru between 1987 and 2008: Experience from a large public cancer hospital in Lima. *Head Neck.* 2014;36(5):729–34.
18. Sichero L, Tagliabue M, Mota G, Ferreira S, Nunes RAL, Castañeda CA, et al. Biomarkers of human papillomavirus (HPV)-driven head and neck cancer in Latin America and Europe study: Study design and HPV DNA/p16 INK4a status. *Head Neck.* 2022;44(1):122–33.
19. Williams R, Lee DW, Elzey BD, Anderson ME, Hostager BS, Lee JH. Preclinical models of HPV+ and HPV– HNSCC in mice: an immune clearance of HPV+ HNSCC. *Head Neck J Sci Spec Head Neck.* 2009;31(7):911–8.
20. Albers A, Abe K, Hunt J, Wang J, Lopez-Albaitero A, Schaefer C, et al. Antitumor activity of human papillomavirus type 16 E7–specific T cells against virally infected squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res.* 2005;65(23):11146–55.
21. 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 Res.* 2013 Jan 1;73(1):128–38.
22. Hadler-Olsen E, Wirsing AM. Tissue-infiltrating immune cells as prognostic markers in oral squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer.* 2019;120(7):714–27.

23. Russell SM, Angell TE, Lechner MG, Liebertz DJ, Correa AJ, Sinha UK, et al. Immune cell infiltration patterns and survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck Oncol.* 2013;5(3):24.
24. Borsetto D, Tomasoni M, Payne K, Polesel J, Deganello A, Bossi P, et al. Prognostic significance of CD4+ and CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Cancers.* 2021;13(4):781.
25. Spector ME, Bellile E, Amlani L, Zarins K, Smith J, Brenner JC, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in head and neck squamous cell carcinoma. *JAMA Otolaryngol Neck Surg.* 2019;145(11):1012–9.
26. Wuerdemann N, Gültekin SE, Pütz K, Wittekindt C, Huebbers CU, Sharma SJ, et al. PD-L1 expression and a high tumor infiltrate of CD8+ lymphocytes predict outcome in patients with oropharyngeal squamous cells carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2020;21(15):5228.
27. 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. *Br J Cancer.* 2014;110(2):489–500.
28. Chau NG, Li YY, Hung YP, Hammerman PS, Rodig SJ, Schoenfeld JD, et al. Analysis of immune infiltrates in a genomically characterized clinical cohort of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) patients. *J Clin Oncol.* 2016;34(15):6052.
29. 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.
30. Solomon B, Young RJ, Bressel M, Urban D, Hendry S, Thai A, et al. Prognostic Significance of PD-L1+ and CD8+ Immune Cells in HPV+ Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma Prognostic Significance of PD-L1+ and CD8+ Immune Cells in HNC. *Cancer Immunol Res.* 2018;6(3):295–304.
31. Ruangritchankul K, Sandison A, Warburton F, Guerrero-Urbano T, Reis Ferreira M, Lei M, et al. Clinical evaluation of tumour-infiltrating lymphocytes as a prognostic factor in patients with human papillomavirus-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Histopathology.* 2019;75(1):146–50.
32. Sabatini ME, Chiocca S. Human papillomavirus as a driver of head and neck cancers. *Br J Cancer.* 2020;122(3):306–14.
33. Liggett Jr WH, Sidransky D. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *J Clin Oncol.* 1998;16(3):1197–206.
34. Jing Y, Zhou Q, Zhu H, Zhang Y, Song Y, Zhang X, et al. Ki-67 is an independent prognostic marker for the recurrence and relapse of oral squamous cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2019;17(1):974–80.

35. Xie S, Liu Y, Qiao X, Hua RX, Wang K, Shan XF, et al. What is the prognostic significance of Ki-67 positivity in oral squamous cell carcinoma? *J Cancer*. 2016;7(7):758.
36. Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discov*. 2022;12(1):31–46.
37. Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell PA, John T, Thapa B, et al. Assessing tumor infiltrating lymphocytes in solid tumors: a practical review for pathologists and proposal for a standardized method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group: Part 2: TILs in melanoma, gastrointestinal tract carcinom. *Adv Anat Pathol*. 2017;24(6):311.
38. Almangush A, De Keukeleire S, Rottey S, Ferdinande L, Vermassen T, Leivo I, et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Head and Neck Cancer: Ready for Prime Time? *Cancers*. 2022;14(6):1558.
39. Gonzalez H, Hagerling C, Werb Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes Dev*. 2018;32(19–20):1267–84.
40. Rajjoub S, Basha SR, Einhorn E, Cohen MC, Marvel DM, Sewell DA. Prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes in oropharyngeal cancer. *Ear Nose Throat J*. 2007;86(8):506–11.
41. Sinicrope FA, Rego RL, Ansell SM, Knutson KL, Foster NR, Sargent DJ. Intraepithelial effector (CD3+)/regulatory (FoxP3+) T-cell ratio predicts a clinical outcome of human colon carcinoma. *Gastroenterology*. 2009;137(4):1270–9.
42. Steele KE, Tan TH, Korn R, Dacosta K, Brown C, Kuziora M, et al. Measuring multiple parameters of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in human cancers by image analysis. *J Immunother Cancer*. 2018;6(1):1–14.
43. Liu J, Geng X, Hou J, Wu G. New insights into M1/M2 macrophages: key modulators in cancer progression. *Cancer Cell Int*. 2021;21(1):1–7.
44. He KF, Zhang L, Huang CF, Ma SR, Wang YF, Wang WM, et al. CD163+ tumor-associated macrophages correlated with poor prognosis and cancer stem cells in oral squamous cell carcinoma. *BioMed Res Int*. 2014;2014.
45. Schoenfeld DA. Sample-size formula for the proportional-hazards regression model. *Biometrics*. 1983;499–503.
46. Pan W, Zhang C, Chen M, Min S, Xu L, Chi Z. Expression of Ki-67 and P16 are related with HPV in squamous cell carcinoma of the external auditory canal. *J Otolaryngol-Head Neck Surg*. 2022;51(1):1–7.

47. Weinberger PM, Yu Z, Haffty B, Kowalski D, Harigopal M, Sasaki C, et al. Prognostic significance of p16 protein levels in oropharyngeal squamous cell cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10(17):5684–91.
48. Rice AE, Latchman YE, Balint JP, Lee JH, Gabitzsch ES, Jones FR. An HPV-E6/E7 immunotherapy plus PD-1 checkpoint inhibition results in tumor regression and reduction in PD-L1 expression. *Cancer Gene Ther.* 2015;22(9):454–62.
49. Bhat P, Bergot AS, Waterhouse N, Frazer IH. Human papillomavirus E7 oncoprotein expression by keratinocytes alters the cytotoxic mechanisms used by CD8 T cells. *Oncotarget.* 2018;9(5):6015.
50. Saba NF, Pamulapati S, Patel B, Mody M, Strojan P, Takes R, et al. Novel Immunotherapeutic Approaches to Treating HPV-Related Head and Neck Cancer. *Cancers.* 2023;15(7):1959.
51. Yilmaz E, Ismaila N, Bauman JE, Dabney R, Gan G, Jordan R, et al. Immunotherapy and biomarker testing in recurrent and metastatic head and neck cancers: ASCO Guideline. *J Clin Oncol.* 2023;41(5):1132–46.
52. Qiao X wei, Jiang J, Pang X, Huang M chang, Tang Y jie, Liang X hua, et al. The evolving landscape of PD-1/PD-L1 pathway in head and neck cancer. *Front Immunol.* 2020;11:1721.
53. Haave H, Ljokjel B, Lybak H, Moe SE, Berge JE, Vintermyr OK, et al. Tumor HPV Status, Level of Regulatory T Cells and Macrophage Infiltration Predict up to 20-Year Non-Disease-Specific Survival in Oropharynx Squamous Cell Carcinoma Patients. *Biomedicines.* 2022;10(10):2484.

## XI. TABLAS

**Tabla 1.** Variables evaluadas, definición y su clasificación.

Variable	Indicadores	Categorías	Criterios de Medición	Escala de Medición
<b>Edad</b>	Fecha de Nacimiento- Ultima Fecha de Visita	> a mediana < a mediana	Mayor edad.....1 Menor edad.....2	Ordinal
<b>Sexo</b>	Registro	Hombre Mujer	Hombre.....1 Mujer.....2	Nominal
<b>Estatus</b>	Estatus de Registro/ Fecha de Fallecimiento/ Fecha de Ultima Visita	Vivo Muerto	Vivo.....1 Muerto.....2	Nominal
<b>Ubicación Tumoral</b>	Registro	Cáncer epidermoide de cabeza y cuello	Cavidad Oral..1 Orofaringe..2 Hipofaringe 3 Laringe.....4	Nominal
<b>Grado histológico</b>	Registro	Bajo Medio Alto	Bajo.....1 Medio.....2 Alto.....3	Ordinal
<b>Tamaño tumoral</b>	Registro	Sin categorías	Cifra en centímetros	Ordinal
<b>Invasión vascular</b>	Registro	Presente Ausente	Presente.....1 Ausente.....2	Nominal
<b>Estadio ganglionar</b>	Registro	N0 N1 N2 N3	N1.....1 N2.....2 N3.....3 N4.....4	Ordinal
<b>Estadio clínico</b>	Registro	I II III IV	I.....1 II.....2 III.....3 IV.....4	Ordinal
<b>Recurrencia</b>	Registro	Presente Ausente	1 0	Nominal



<b>Estado de vida</b>	Registro/RENIEC	Vivo Fallecido	1 0	Nominal
<b>Fecha de primera recurrencia</b>	Registro	Sin categorías		
<b>Fecha de última consulta</b>	Registro	Sin categorías		
<b>Fecha de muerte</b>	Registro/ RENIEC	Sin categorías		
<b>Estado p16 (sobrexpresión)</b>	Registro/ Evaluación prospectiva	Estado Positivo o Negativo	Positivo..... 1 Negativo ..... 2	Nominal
<b>TIL estromal</b>	Evaluación prospectiva/ Porcentaje	> a mediana < a mediana	Alto..... 1 Bajo..... 2	Ordinal
<b>CD3+</b>	Evaluación prospectiva/ número de células por campo de alto poder	> a mediana < a mediana	Alto..... 1 Bajo..... 2	Ordinal
<b>CD8+</b>	Evaluación prospectiva/ número de células por campo de alto poder	> a mediana < a mediana	Alto..... 1 Bajo..... 2	Ordinal
<b>CD163+</b>	Evaluación prospectiva/ número de células por campo de alto poder	> a mediana < a mediana	Alto..... 1 Bajo..... 2	Ordinal

**Tabla 2.** Anticuerpos utilizados en las tinciones de inmunohistoquímica.

Antígeno	Clona	Tipo	Laboratorio	Código	Ciudad, País
P16	16p04	prediluido	Santa Barbara	BSB 5828	California, EE.UU.
CD3	Policlonal	prediluido	Dako	IS503	Granada, España
CD8	C8/144B	prediluido	Dako	IS623	Granada, España
CD163	EP324	prediluido	Master Diagnostica	758QD	Granada, España

**Tabla 3.** Características clínicas y asociación de sobrevida en cáncer de cabeza y cuello en la población general.

Características	Total n	Eventos n	Porcentaje vivos a 5 años	P
Edad (n=432)				0.260
<65 años	215	120	44,2%	
≥65 años	217	137	36,9%	
Sexo (n=432)				0.825
Femenino	222	137	38,3%	
Masculino	210	120	42,9%	
Localización (n= 432)				<b>0.009</b>
Cavidad Oral	272	159	41,5%	
Orofaringe	111	70	36,9%	
Hipofaringe	15	13	13,3%	
Laringe	34	15	55,9%	
Estadio Clínico (n=428)				<b>&lt;0.001</b>
I	51	21	58,8%	
II	112	48	57,1%	
III	102	66	35,3%	
IV	163	119	27,0%	
Diseccción (n=432)				<b>&lt;0.001</b>
No	228	157	31,1%	
Si	204	100	51,0%	
Grado Histológico (n=424)				0.074
1	137	70	48,9%	
2	262	164	37,4%	
3	25	17	32,0%	
Queratinización (n=393)				0.236
No	54	35	35,2%	
Si	339	198	41,6%	
Ulceración (n=210)				<b>0.022</b>
No	17	5	70,6%	
Si	193	109	43,5%	
Infiltración Perineural (n=253)				<b>0.025</b>
No	119	54	54,6%	
Si	134	70	47,8%	
Infiltración Linfovascular (n=255)				<b>0.001</b>
No	167	75	55,1%	
Si	88	48	45,5%	
Recurrencia (n= 417)				<b>&lt;0.001</b>
No	317	165	47,9%	
Si	100	84	16,0%	
TIL Estromal (n= 269)				0.591
<70%	115	69	40,0%	
≥70%	154	90	41,6%	
P16 (n= 359)				0.670

Negativo	295	173	41,4%	
Positivo	64	37	42,4%	
Ki67 (n=239)				0.574
<30%	115	57	50,4%	
≥30%	124	68	45,2%	
Densidad CD3 (n=178)				0.069
<57.4	88	39	55,7%	
≥57.4	90	54	40,0%	
Densidad CD8 (n=173)				0.723
<21	85	44	48,2%	
≥21	88	48	45,5%	
Densidad CD8/CD3 (n=172)				0.468
Ratio				
<0.5	85	48	43,5%	
≥0.5	87	44	49,4%	
Densidad CD163 (n=95)				0.137
<21.6	46	25	45,7%	
≥21.6	49	34	30,6%	
p16+ & TIL alto (n=196)				0.083
No	179	106	40,8%	
Si	17	6	64,7%	
p16+ & TIL alto (n=196)				0.276
TILalto/P16+	17	6	64,7%	
TILalto/P16-	105	65	38,1%	
TILbajo/P16+	7	4	42,9%	
TILbajo/P16-	67	37	44,8%	
p16+ & densidad CD3 alto (n=177)				<b>0.002</b>
No	166	82	50,6%	
Si	11	11	0,0%	
p16+ & densidad CD8 alto (n=172)				<b>0.002</b>
No	164	84	48,8%	
Si	8	8	0,0%	
p16+ & densidad CD163 alto (n=94)				0.231
No	87	53	39,1%	
Si	7	6	14,3%	
p16 & CD3 (n=177)				<b>0.010</b>
CD3alto/P16+	11	11	0,0	
CD3alto/P16-	79	43	45,6	
CD3bajo/P16+	7	4	42,9	
CD3bajo/P16-	80	35	56,3	
p16 & CD8 (n=135)				<b>0.019</b>
CD8alto/P16+	8	8	0,0	
CD8alto/P16-	80	40	50,0	
CD8bajo/P16+	10	7	30,0	
CD8bajo/P16-	37	37	50,0	

**Tabla 4.** Características clínicas y asociación de sobrevida en el subgrupo de tumores de orofaringe.

Características	Total n	Eventos n	Porcentaje vivos a 5 años	P
Edad (n=111)				
<65 años	67	39	41,8%	0.059
≥65 años	44	31	29,5%	
Sexo (n=111)				0.646
Femenino	40	26	35,0%	
Masculino	71	44	38,0%	
Estadio Clínico (n=111)				0.184
I	7	3	57,1%	
II	17	9	47,1%	
III	25	16	36,0%	
IV	62	42	32,3%	
Disección (n=111)				0.187
No	24	13	45,8%	
Si	87	57	34,5%	
Grado Histológico (n=109)				0.921
1	19	10	47,4%	
2	74	48	35,1%	
3	16	10	37,5%	
Queratinización (n=94)				0.613
No	32	21	34,4%	
Si	62	38	38,7%	
Ulceración (n=39)				0.140
No	5	1	80,0%	
Si	34	21	38,2%	
Infiltración Perineural (n=32)				0.152
No	16	10	37,5%	
Si	16	6	62,5%	
Infiltración Linfovascular (n=34)				0.211
No	24	12	50,0%	
Si	10	4	60,0%	
Recurrencia (n= 111)				0.263
No	83	47	43,94%	
Si	28	23	17,9%	
TIL Estromal (n= 56)				0.728
<70%	22	14	36,4%	
≥70%	34	20	41,2%	
P16 (n= 88)				0.251
Negativo	52	33	36,5%	
Positivo	36	20	44,4%	
ki67 (n= 38)				0.351
<30%	17	7	58,8%	
≥30%	21	14	33,3%	
Densidad CD3 (n= 25)				0.098
<57.4	15	6	60,0%	
≥57.4	10	8	20,0%	
Densidad CD8 (n= 24)				0.106
<21	13	5	61,5%	
≥21	11	8	27,3%	
Densidad CD8/CD3 Ratio (n= 24)				0.310
<0.5	10	4	60,0%	
≥0.5	14	9	35,7%	
Densidad CD163 (n= 11)				0.439
<21.6	6	3	50,0%	
≥21.6	5	3	40,0%	

p16+ & TIL alto (n= 33)				0.013
No	23	15	34.8%	
Si	10	2	80.0%	
p16+ & TIL alto				0.028
TILalto/P16+	10	2	80.0%	
TILalto/P16-	14	11	21.4%	
TILbajo/P16-	9	4	55.6%	
p16+ & CD3 alto (n= 25)				0.074
No	22	11	50.0%	
Si	3	3	0.0%	
p16+ & CD8 alto (n= 24)				0.052
No	21	10	52.4%	
Si	3	3	0.0%	
p16+ & CD163 alto (n= 11)				0.358
No	10	6	40.0%	
Si	1	0	100.0%	
p16 & CD3 (n= 25)				0.234
CD3alto/P16+	3	3	0.0	
CD3alto/P16-	7	5	28.6	
CD3bajo/P16+	2	1	50.0	
CD3bajo/P16-	13	5	61.5	
p16 & CD8 (n= 24)				0.192
CD8alto/P16+	3	3	0.0	
CD8alto/P16-	8	5	37.5	
CD8bajo/P16+	2	1	50.0	
CD8bajo/P16-	11	4	63.6	

**Tabla 5.** Asociación entre la expresión de p16, niveles de TIL y características clínicas en la población general.

Variable	Total		P16 (n= 359)				p	TIL (n= 269)				p
	n	%	No	%	Si	%		Low	%	High	%	
Localización							<b>&lt;0.001</b>					0.383
Cavidad oral	272	63.0	200	89.7	23	10.3		93	44.1	118	55.9	
Orofaringe	111	25.7	52	59.1	36	40.9		22	39.3	34	60.7	
Hipofaringe	15	3.5	14	93.3	1	6.7		-	-	-	-	
Laringe	34	7.9	29	87.9	4	12.1		0	0	2	100	
Sexo							<b>0.024</b>					0.642
Femenino	222	51.4	161	86.6	25	13.4		66	44.0	84	56.0	
Hombre	210	48.6	134	77.5	39	22.5		49	41.2	70	58.8	
Edad							0.308					0.439
<61 años	215	49.8	136	80.0	34	20.0		58	40.6	85	59.4	
≥61 años	217	50.2	159	84.1	30	15.9		57	45.2	69	54.8	
Diseción del cuello							<b>&lt;0.001</b>					0.805
No	204	47.2	167	91.8	15	8.2		55	42.0	76.0	58.0	
Si	228	52.8	128	72.3	49	27.7		60	43.5	78.0	56.5	
Diferenciación							<b>&lt;0.001</b>					0.356
Bien	137	31.7	106	93.0	8	7.0		35	37.2	59	62.8	
Moderado	262	60.6	174	80.2	43	19.8		73	44.8	90	55.2	
Pobre-Indiferenciado	25	5.8	10	50.0	10	50.0		6	54.5	5	45.5	
Queratinizante							<b>&lt;0.001</b>					0.051
No	54	12.5	23	53.5	20	46.5		15	60.0	10	40.0	
Si	339	78.5	252	89.0	31	11.0		93	39.7	141	60.3	
Ulcerado							0.347					0.570
No	17	3.9	12	80.0	3	20.0		5	50	5	50	
Si	193	44.7	144	88.3	19	11.7		65	40.9	94	59.1	
IPN							0.885					0.052
No	119	27.5	92	91.1	9	8.9		29	36.7	50	63.3	
Si	134	31.0	105	90.5	11	9.5		45	51.7	42	48.3	
ILV							0.764					0.368
No	167	38.7	128	89.5	15	10.5		46	41.8	64	58.2	
Si	88	20.4	69	90.8	7	9.2		28	49.1	29	50.9	
EC							<b>0.009</b>					0.963
I	51	11.8	40	90.9	4	9.1		15	42.9	20	57.1	
II	112	25.9	86	88.7	11	11.3		30	40	45	60	
III	102	23.6	71	83.5	14	16.5		28	43.8	36	56.3	
IV	163	37.7	95	73.6	34	26.4		41	43.6	53	56.4	
Ki67%							<b>&lt;0.001</b>					<b>0.018</b>
< 30%	115	26.6	111	97.4	3	2.6		29	53.7	25	46.3	
> 30%	124	28.7	100	81.3	23	18.7		22	32.4	46	67.6	
TIL estromal							0.354					
< 70%	115	26.6	67	90.5	7	9.5		-	-	-	-	
> 70%	154	35.6	105	86.1	17	13.9		-	-	-	-	
Densidad CD3							0.358					<b>&lt;0.001</b>
< 57.4	88	49.4	80	92	7	8		28	65.1	15	34.9	
> 57.4	90	50.6	79	87.8	11	12.2		15	27.3	40	72.7	
Densidad CD8							0.547					<b>&lt;0.001</b>
< 21	85	49.1	74	88.1	10	11.9		30	68.2	14	31.8	

> 21	88	50.9	80	90.9	8	9.1		12	23.1	40	76.9	
Radio densidad CD8/CD3							0.115	27	52.9	24	47.1	<b>0.038</b>
< 0.5	85	49.4	72	85.7	12	14.3		14	31.8	30	68.2	
> 0.5	87	50.6	81	93.1	6	6.9						
Densidad CD163							0.205					0.111
< 21.6	46	48.4	43	93.5	3	6.5		14	56.0	11	44.0	
> 21.6	49	51.6	41	85.4	7	14.6		8	33.3	16	66.7	

**Tabla 6.** Asociación entre la expresión de p16, niveles de TIL y características clínicas en la población con tumor primario de orofaringe.

Variable	Total		P16				p	TIL				p
	n	%	No	%	Si	%		Low	%	High	%	
Edad (n=88)							0.348					0.565
<65 años	51	60.4	28	54.9	23	45.1		14	42.4	19	57.6	
≥65 años	37	39.6	24	64.9	13	35.1		8	34.8	15	65.2	
Sexo (n=88)							0.445					0.672
Femenino	31	36.0	20	64.5	11	35.5		9	42.9	12	57.1	
Masculino	57	64.0	32	56.1	25	43.9		13	37.1	22	62.9	
Disección (n=88)							<0.001					0.391
No	23	21.6	22	95.7	1	4.3		6	50.0	6	50.0	
Si	65	78.4	30	46.2	35	53.8		16	36.4	28	63.6	
Diferenciación (n=86)							<b>0.005</b>					0.638
Bien	17	17.4	15	88.2	2	11.8		4	50.0	4	50.0	
Moderado	58	67.9	34	58.6	24	41.4		15	35.7	27	64.3	
Pobre-Indiferenciado	11	14.7	3	27.3	8	72.7		3	50.0	3	50.0	
Queratinizante							<b>0.007</b>					0.950
No	24	34.0	10	41.7	14	58.3		5	38.5	8	61.5	
Si	50	66.0	37	74.0	13	26.0		15	37.5	25	62.5	
Ulcerado							0.840					0.444
No	5	12.8	22	75.9	7	24.1		1	50.0	1	50.0	
Si	34	87.2	4	80.0	1	20.0		6	25.0	18	75.0	
IPN							0.316					0.486
No	16	50.0	12	80.0	3	20.0		4	40.0	6	60.0	
Si	16	50.0	13	92.9	1	7.1		4	57.1	3	42.9	
ILV							0.593					0.510
No	24	70.6	17	81.0	4	19.0		6	42.9	8	57.1	
Si	10	29.4	8	88.9	1	11.1		3	60.0	2	40.0	
Estadio Clínico (n=111)							0.055					0.093
I	7	6.3	5	83.3	1	16.7		2	33.3	4	66.7	
II	17	15.3	12	85.7	2	14.3		6	75.0	2	25.0	
III	25	22.5	12	57.1	9	42.9		2	18.2	9	81.8	
IV	62	55.9	23	48.9	24	51.1		12	38.7	19	61.3	
Ki67%							<b>0.004</b>					0.640
< 30%	17	44.7	17	100.0	0	0.0		3	50.0	3	50.0	
> 30%	21	55.3	13	61.9	8	38.1		3	37.5	5	62.5	
TIL estromal							<b>0.020</b>					
< 70%	22	39.3	9	100.0	0	0.0		-	-	-	-	
> 70%	34	60.7	14	58.3	10	41.7		-	-	-	-	
Densidad CD3							0.307					0.673
< 57.4	15	60.0	13	86.7	2	13.3		4	66.7	2	33.3	



> 57.4	10	40.0	7	70.0	3	30.0		1	50.0	1	50.0	
Densidad CD8							0.475					0.673
< 21	13	54.2	11	84.6	2	15.4		4	66.7	2	33.3	
> 21	11	45.8	8	72.7	3	27.3		1	50.0	1	50.0	
Radio densidad CD8/CD3							0.350					0.850
< 0.5	10	41.7	7	70.0	3	30.0		2	66.7	1	33.3	
> 0.5	14	58.3	12	85.7	2	14.3		3	60.0	2	40.0	
Densidad CD163							0.205					0.083
< 21.6	6	54.5	5	83.3	1	16.7		3	75.0	1	25.0	
> 21.6	5	45.5	4	80.0	1	20.0		0	0.0	2	100.0	

**Tabla 7.** Descripción de los casos con estado de p16+ y niveles altos de TIL, densidad alta de CD3 (IT CD3) o CD8 (IT CD8).

TIL <sup>alto</sup> P16+	CD3 <sup>alto</sup> P16+	CD8 <sup>alto</sup> P16+	Edad (años)	Sexo	Primario	Estadio clínico	Grado histológico	Ki67 (%)	Sobrevida Global (años)	sTIL (%)	Densidad CD3 (Mdna57.4*)	Densidad CD8 (Mdna21*)
Si			39	Femenino	Orofaringe	I	2	40	9.92	70	16.2	6.8
Si			72	Masculino	Orofaringe	II	2		0.08	90		
Si			48	Femenino	Orofaringe	III	2		5.04	70		
Si			55	Masculino	Orofaringe	IV	2		8.16	80		
Si			75	Masculino	Orofaringe	IV	2		1.25	80		
Si			52	Masculino	Orofaringe	IV	2		8.98	80		
Si			72	Masculino	Orofaringe	IV	3		5.87	90		
Si			57	Masculino	Orofaringe	IV	2		4.89	100		
Si			45	Masculino	Orofaringe	IV	2		8.61	100		
Si			77	Masculino	Orofaringe	IV	2		0.54	80		
Si			42	Femenino	Cavidad oral	I	1		9.00	80		
Si			39	Femenino	Cavidad oral	II	2		0.10	80		
Si			57	Masculino	Cavidad oral	II	2	30	6.15	80		
Si			40	Masculino	Cavidad oral	III	2		0.00	90		
Si			74	Femenino	Cavidad oral	IV	2		0.07	80		
Si			33	Femenino	Cavidad oral	IV	2	30	1.25	80	9.4	0.6
Si	Si	Si	68	Femenino	Cavidad oral	I	1	30	3.95	80	175.0	115.4
	Si	Si	74	Masculino	Orofaringe	III	3	40	0.83		59.8	69.7
	Si	Si	44	Masculino	Orofaringe	IV	3	30	0.02		124.0	98.4
	Si	Si	59	Masculino	Orofaringe	IV	2	70	1.07		246.3	90.8
	Si	Si	40	Femenino	Cavidad oral	I	2	30	2.25	30	115.4	30.0
	Si	Si	74	Femenino	Cavidad oral	II	2	10	0.83	60	79.2	35.0
	Si	Si	58	Femenino	Cavidad oral	IV	2	40	0.35		152.2	102.6
	Si	Si	75	Masculino	Cavidad oral	IV	2	30	0.15		66.2	27.8
	Si		48	Femenino	Cavidad oral	II	2	70	0.80		171.2	15.0
	Si		37	Masculino	Cavidad oral	II	3	50	1.59	50	84.0	11.8
	Si		43	Femenino	Laringe	III	1	30	3.19	20	91.5	2.0

\* Células por campos de alta densidad.

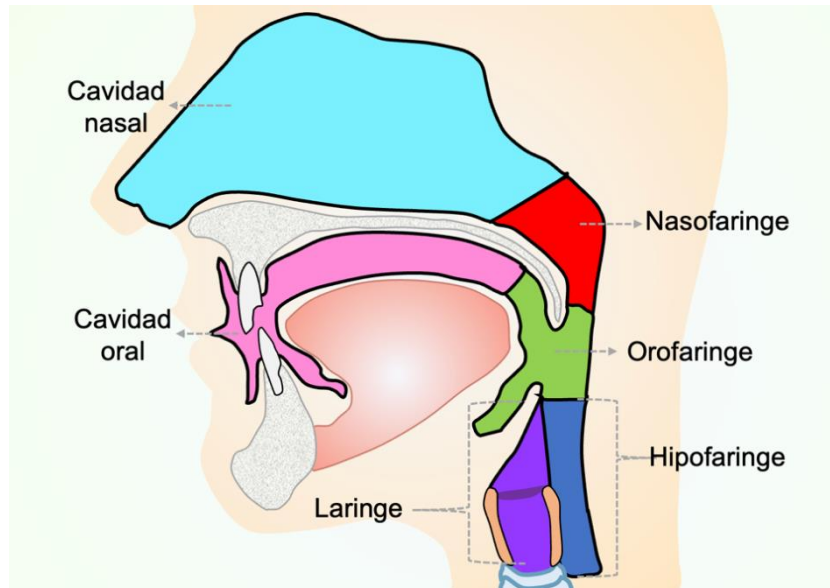
**Tabla 8.** Series que evalúa el rol de TIL en cáncer epidermoide de cabeza y cuello con información de infección por Virus Papiloma Virus.

Autores	Hombres y Mujeres	Mediana de Edad	Lesión primaria	Estadio III/IV	VPH+ y VPH-	Asociación entre VPH y TIL	Predictor de Sobrevida Larga
Wansom (29)	36 y 10	57	Orofaringe	9 y 37	25 y 13 (RT-PCR)	Si	<ul style="list-style-type: none"> <li>• VPH+</li> <li>• Suma de CD4y CD8</li> <li>• CD4/CD8</li> </ul>
Ward (27)	200 y 74	58	Orofaringe	219	149 y 121 (RT-PCR)	Si	<ul style="list-style-type: none"> <li>• VPH+</li> <li>• TIL alto</li> <li>• VPH+/TIL alto</li> </ul>
Haave (53)	128 y 40	62	Orofaringe	118 y 3	92 y 76 (RT-PCR)	Si	<ul style="list-style-type: none"> <li>• VPH+ o p16+</li> <li>• CD3+ o Foxp3+</li> <li>• CD68+</li> </ul>
Ruangritchankul (31)	188 y 44	59	Orofaringe VPH+	200 y 8	232 (p16)	No aplica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• TIL&gt;20%</li> </ul>
Spector (25)	329 y 135	61	Cavidad oral (228), orofaringe (147), laringe (74) e hipofaringe (15)	71 y 269	301 y 151 (p16 IHQ)	Si	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CD8+ (población total y orofaringe)</li> <li>• CD8+, CD3+ y Foxp3+ (población total y orofaringe)</li> </ul>
Castañeda (Tesis actual)	210 y 222	65	Cavidad oral (272), orofaringe (111), laringe (34), hipofaringe (15)	102 y 163	36 y 52 (p16 IHQ)	No en población total. Si en Orofaringe.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Baja densidad CD8+</li> <li>• Tendencia para subgrupo p16+ y TIL&gt;70% (alcanza significancia en subgrupo con primario orofaringe).</li> </ul>



## X. FIGURAS

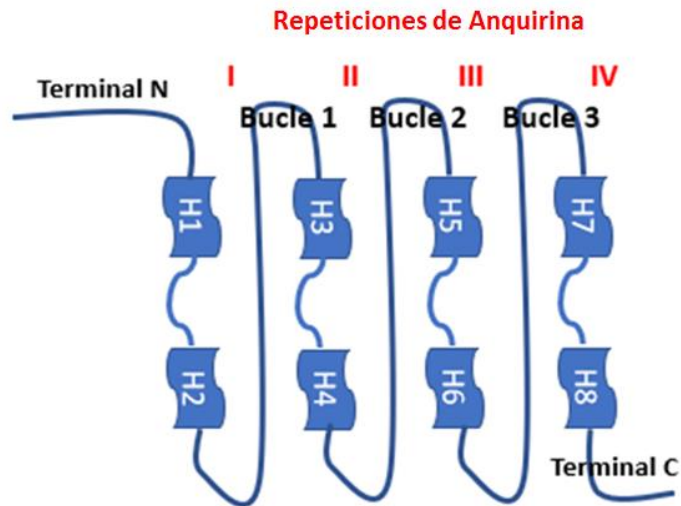
**Figura 1.** División Anatómica del área de primario Cabeza y Cuello. Fuente: Elaboración propia.



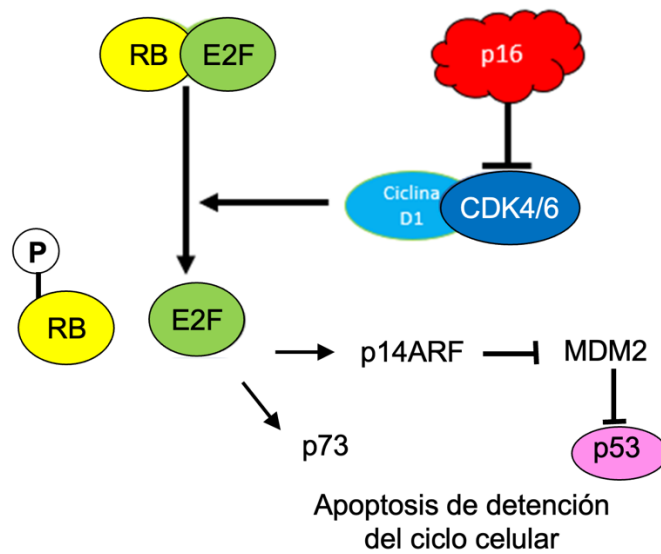
**Figura 2.** Representación del gen p16. Fuente: Elaboración propia



**Figura 3.** Representación esquemática de la proteína p16. Las repeticiones de anquirina consisten de una estructura hélice-vuelta-hélice. Las 4 regiones repetidas se conectan con 3 asas en estructura beta y gamma. Fuente: Elaboración propia.

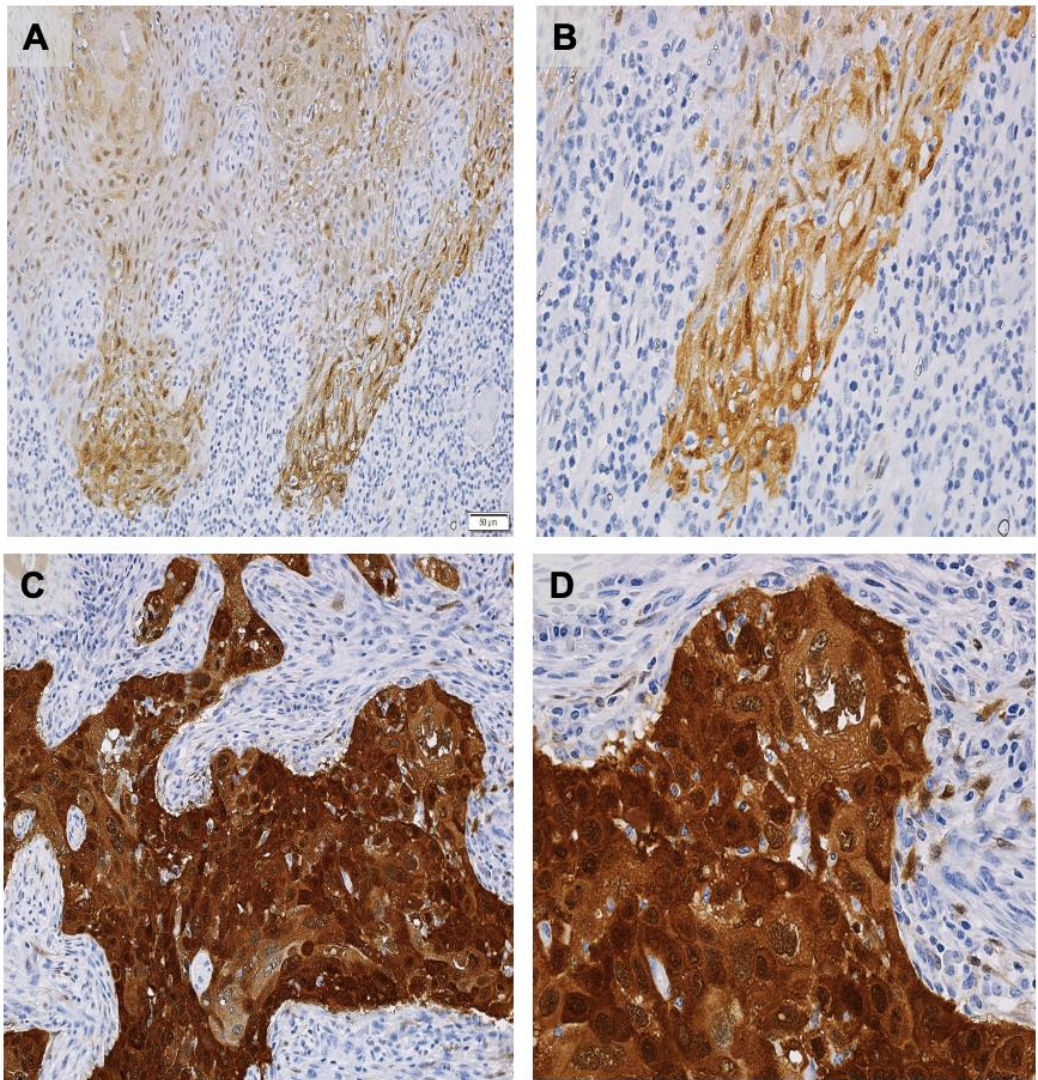


**Figura 4.** Esquema de efecto de p16 sobre ciclo celular. Fuente: Elaboración propia.



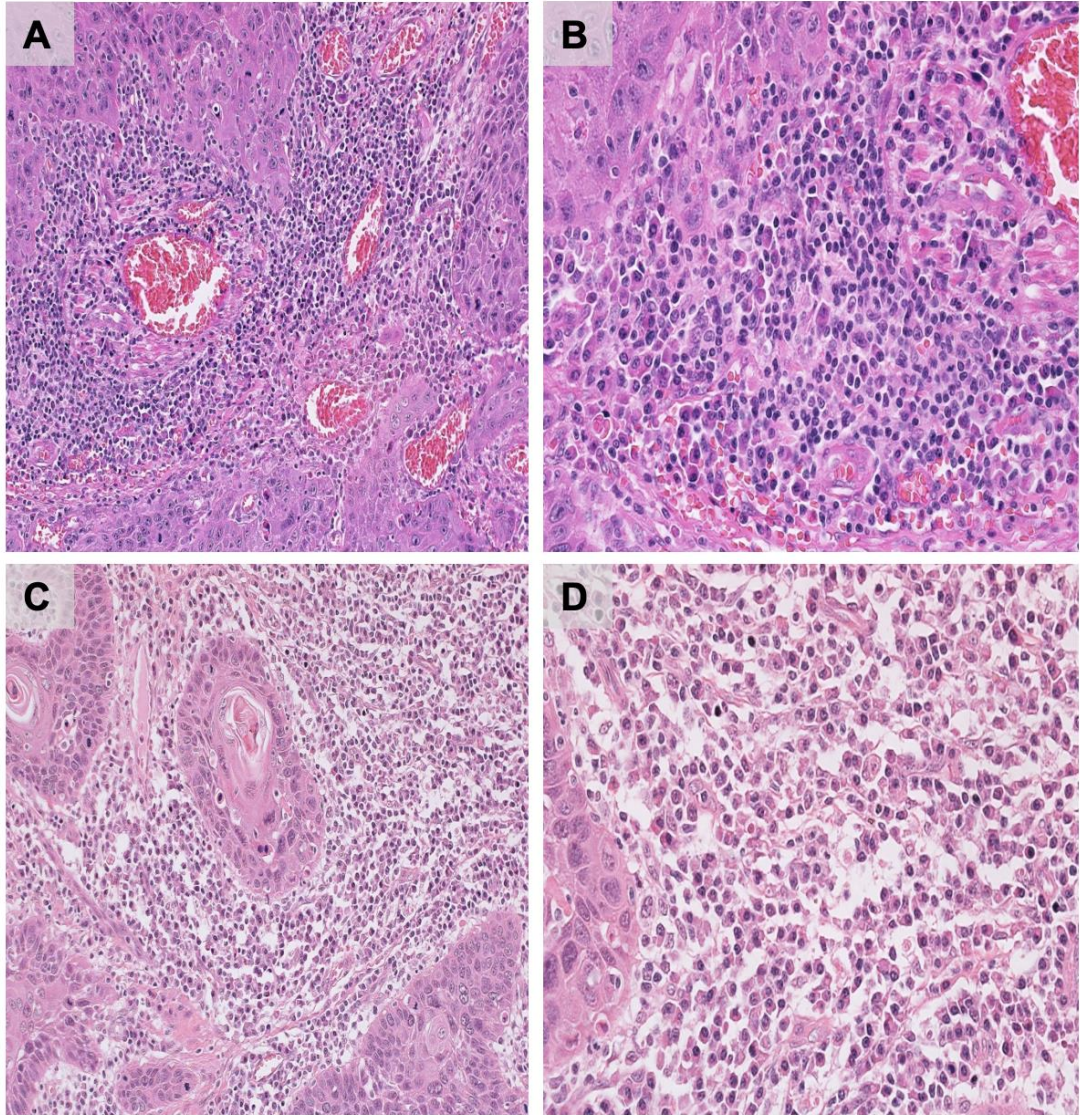


**Figura 6.** Tinción inmunohistoquímica de P16. Se muestran secciones representativas con tinción positiva para p16 (A y C), junto con recuadros de mayor aumento de las mismas secciones de tejido (B y D).

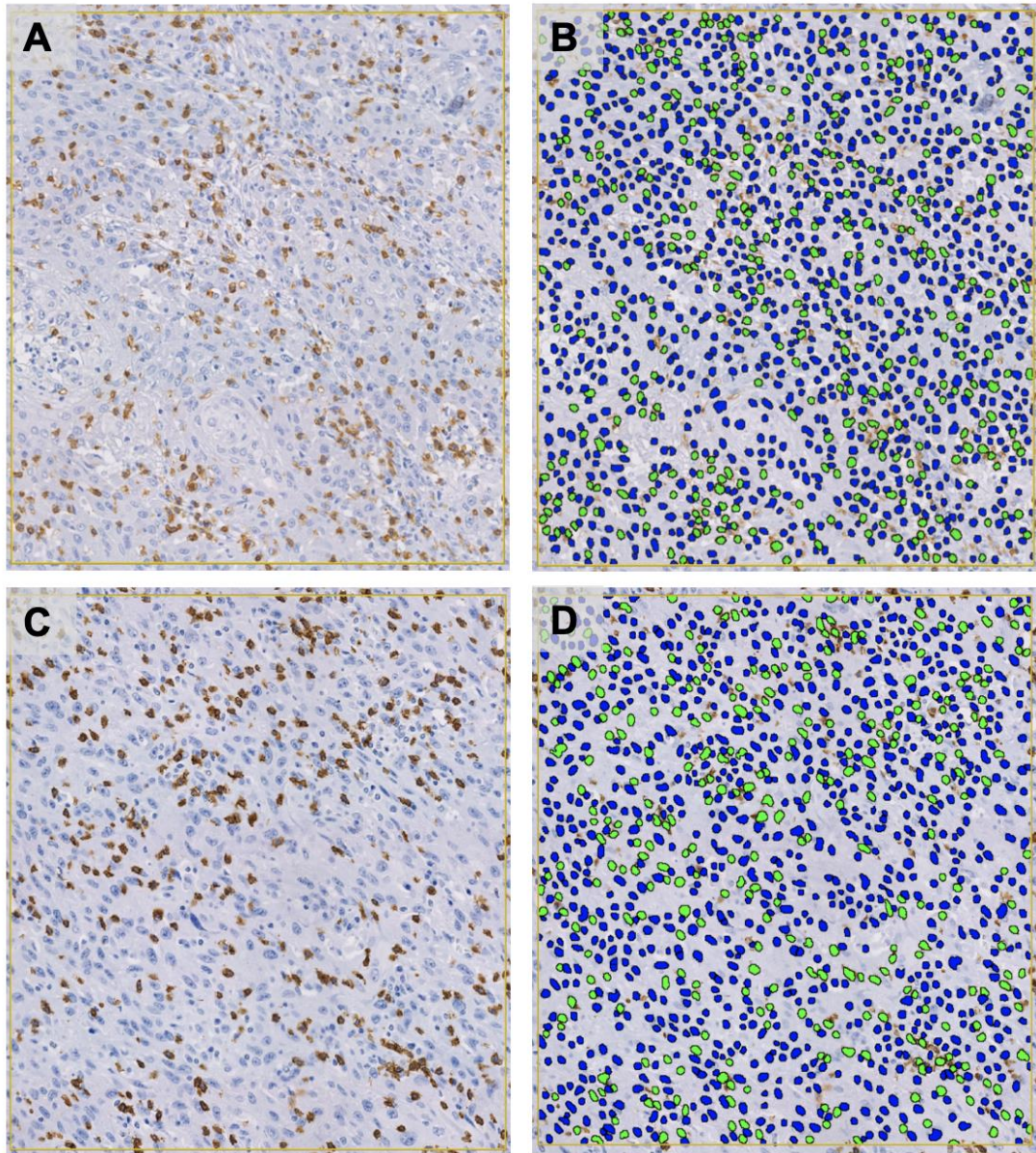




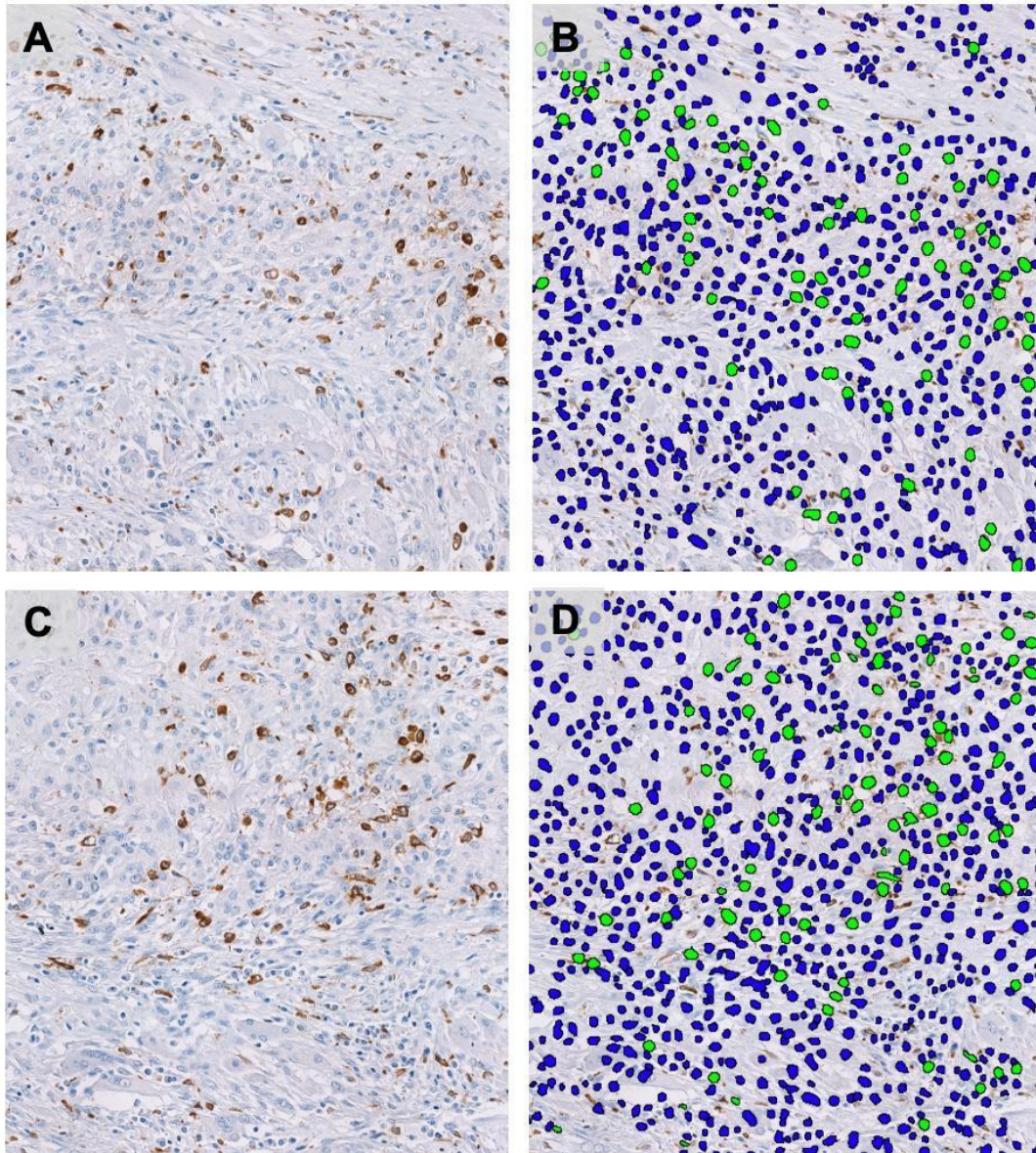
**Figura 7.** Dos casos de cáncer de cabeza y cuello con niveles elevados de TIL. Tinción HE del compartimento estromal con nivel alto de linfocitos infiltrantes de tumores de 90% (A y B) y 100% (C y D), a aumentos 20x y 40x.



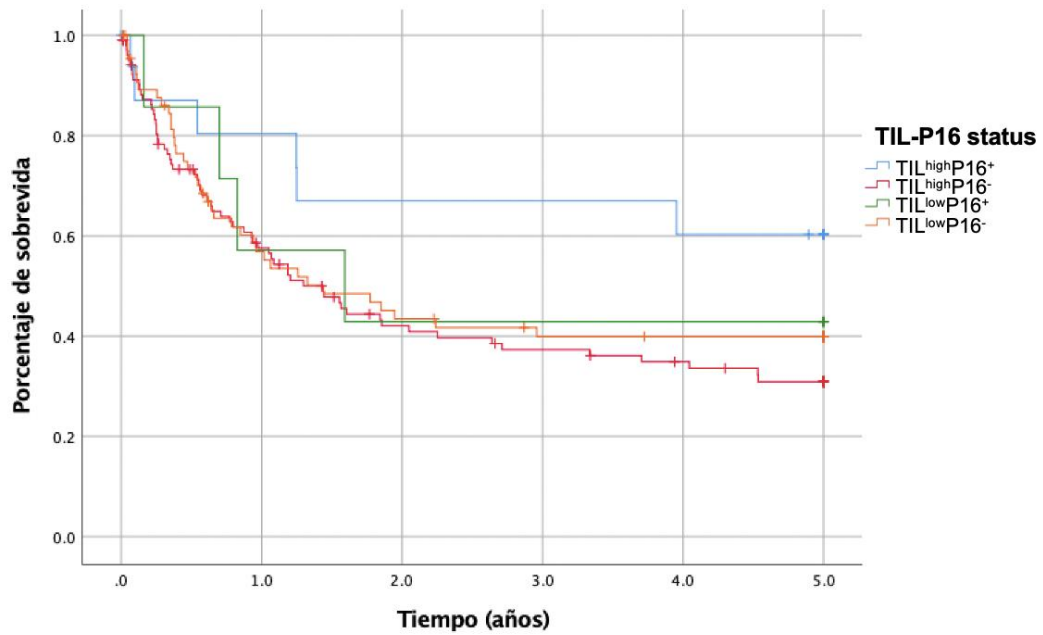
**Figura 8.** Identificación de linfocitos CD8 en imágenes de tinción de inmunohistoquímica (A, C) mediante procesamiento de imágenes basado en aprendizaje automático (B, D) que muestra células positivas (verde) y negativas (azul), (ampliación: 40x).



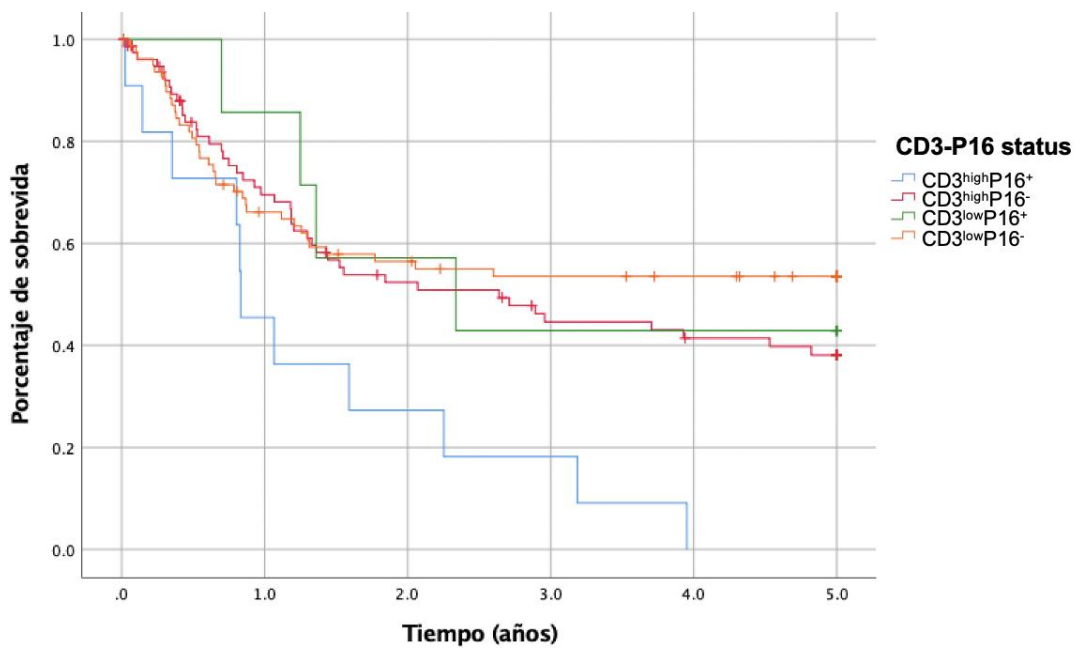
**Figura 9.** Identificación de linfocitos CD163 en imágenes de tinción de inmunohistoquímica (A, C) mediante procesamiento de imágenes basado en aprendizaje automático (B, D) que muestra células positivas (verde) y negativas (azul), (ampliación: 40x).



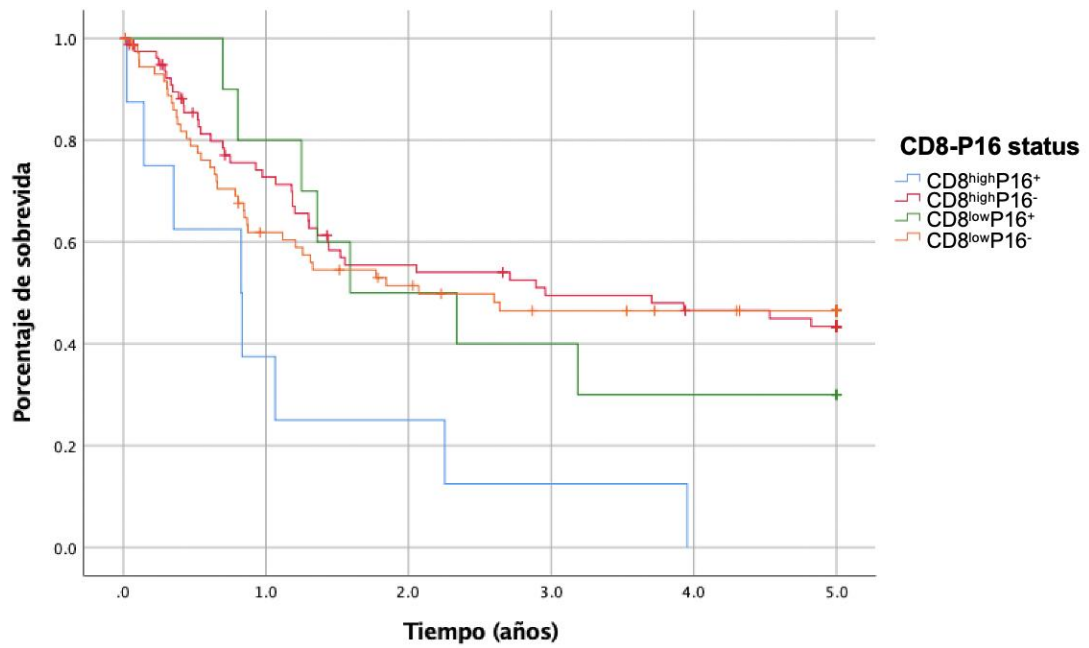
**Figura 10.** Curva de supervivencia global de Kaplan-Meier según el nivel de TIL y la expresión de p16 en la población general de CECC (p=0.083).



**Figura 11.** Curva de supervivencia global de Kaplan-Meier según la densidad de CD3 y el estado de expresión de p16 en la población general de CECC (p=0.002).



**Figura 12.** Curva de supervivencia global de Kaplan-Meier según la densidad de CD8 y el estado de expresión de p16 en la población general de CECC ( $p=0.002$ )



**Figura 13.** Curva de supervivencia global de Kaplan-Meier según el nivel de TIL y la expresión de p16 en el subgrupo de orofaringe ( $p=0.028$ ).

