



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Contribución Clínica al Estudio de Biomarcadores
del Cáncer Cutáneo No Melanoma**

D.^a Joana Cruaños Monferrer

2021



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. Enrique Poblet Martínez, Catedrático de Universidad del Área de Anatomía Patológica en el Departamento de Oftalmología, Optometría, Otorrinolaringología y Anatomía Patológica, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “CONTRIBUCIÓN CLÍNICA AL ESTUDIO DE BIOMARCADORES DEL CÁNCER CUTÁNEO NO MELANOMA“, realizada por D^a. JOANA CRUAÑES MONFERRER, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 1 de Agosto de 202

1

1

Firmante: ENRIQUE POBLET MARTINEZ. Fecha-hora: 11/08/2021 19:33:48. Emisor del certificado: C=ES,O=ACCY/OU=PKI/ACCY,CN=ACCYCA-202



Mod:T-20

Código seguro de verificación: RUxFMg5g-dRdsjNoW-5oXN08/G-ABzC/wpB

COPIA

ELECTRÓNICA - Página 1 de 1 Esta es una copia auténtica imprimible de un documento administrativo electrónico archivado por la Universidad de Murcia, según el artículo 27.3 c) de la Ley 39/2015, de 1 de octubre. Su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección:
<https://sede.um.es/validador/>





UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. Diego Hellín Meseguer, Doctor de Universidad del Área de OTORRINOLARINGOLOGÍA, en el Departamento de OFTALMOLOGÍA, OPTOMETRÍA, OTORRINOLARINGOLOGÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "CONTRIBUCIÓN CLÍNICA AL ESTUDIO DE BIOMARCADORES DEL CÁNCER CUTÁNEO NO MELANOMA", realizada por D^a. JOANA CRUAÑES MONFERRER, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 10 de Agosto de 2021

Firmado por Diego Hellín Meseguer el día 10/08/2021 con certificado digital

Directores/supervisores:

Prof. Diego Hellín Meseguer¹

Prof. Enrique Poblet Martínez²

¹Dpto. Otorrinolaringología, Hospital Universitario Virgen Arrixaca, Murcia

²Dpto. Anatomía Patológica, Hospital General Universitario Reina Sofía, Murcia



Agradecimientos

Al Dr. Carlos Manuel Martínez Cáceres, por su infinita y desinteresada ayuda con el procesamiento de las muestras histológicas, por su paciencia y amabilidad.

A la Dra. Guadalupe Ruiz Merino, pieza clave en el análisis estadístico de este trabajo y por sus contagiosas ganas de trabajar.

A todas las técnicas de laboratorio del H. General Universitario Reina Sofía, en especial a Carmen Sánchez Cano, por la ayuda para localizar las piezas tumorales.

A todo el servicio de Anatomía Patológica del H. Morales Meseguer, especialmente a Miguel y a Almudena, por su ayuda desinteresada, por las tardes que pasaron conmigo buscando pacientes y por su pasión por la ciencia.

A mis dos tutores, sin los cuales no hubiera podido ni siquiera plantearme este estudio.

Al servicio de Dermatología del H. General Universitario Reina Sofía, en especial a mi jefa, la Dra. Marién Giménez y a mi tutor de residencia, el Dr. Jesús Hernández-Gil, por estar siempre ahí y por las facilidades de horario.

Al Dr. Juan Monte Serrano, por animarme a emprender este trabajo y acompañarme en él.

A mis abuelos, porque sin ellos no podría haber estudiado la carrera de Medicina.

A mis padres y a mi hermana, por su apoyo incondicional.

Sin todos ellos, este proyecto no se hubiera podido llevar a cabo. Gracias infinitas.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	22
1.1 Anatomía y funciones de la piel humana	24
1.2 Respuesta inmunitaria cutánea.....	25
1.2.a Respuesta inmunitaria innata	26
1.2.b Respuesta inmunitaria adaptativa	27
1.3 Alteraciones en la respuesta inmunitaria cutánea.....	29
1.4 Queratosis actínicas	30
1.4.a Definición y epidemiología	30
1.4.b Presentación clínica, clasificación y diagnóstico	31
1.4.c Histología	33
1.4.d Tratamiento.....	34
1.5 Queratoacantoma	35
1.5.a Definición y epidemiología	35
1.5.b Origen.....	35
1.5.c Presentación clínica	36
1.5.d Histología.....	37
1.5.e Tratamiento.....	38
1.6 Carcinoma epidermoide cutáneo (CEC)	39
1.6.a Epidemiología y factores de riesgo	39
1.6.b Patogenia.....	40
1.6.c Clínica.....	41
1.6.d Histología.....	44
1.6.e Estadificación.....	45
1.6.f Pronóstico y factores de riesgo.....	48
1.6.g Tratamiento	52
1.7 Marcadores inmunohistoquímicos	60
1.7.a CD8	60
1.7.b CD57	61
1.7.c CD163	62
1.7.d FOXP3	63
1.7.e CD25	64
1.8 Microambiente tumoral	65
1.8.a Definición e implicaciones.....	65

1.7.b Componentes del microambiente tumoral.....	66
1.8 Papel pronóstico de los componentes de la inmunidad innata.....	73
1.8.a Macrófagos asociados al tumor tipo M2 y CD163	73
1.8.b Células Natural Killer y CD57.....	75
1.9 Papel pronóstico de los componentes de la inmunidad adquirida.....	78
1.9.a Linfocitos T citotóxicos y CD8.....	78
1.9.b Linfocitos T reguladores y FOXP3.....	80
2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS	82
3. OBJETIVOS	86
3.1 Objetivo general.....	88
3.2 Objetivos específicos.....	88
4. MATERIAL Y MÉTODOS	89
4.1 Diseño, tipo de estudio	91
4.2 Ámbito de estudio.....	91
4.3 Muestras a estudio.....	91
4.4 Criterios de selección	93
4.4.1 Criterios de inclusión.....	93
4.4.2 Criterios de exclusión:	93
4.5 Variables principales del estudio	94
4.5.1 Variables clínicas	95
4.5.1 Variables histológicas.....	96
4.5.1 Variables inmunohistoquímicas	99
4.5 Tissue array o matrices tisulares:.....	100
4.6 Procedimientos realizados	101
4.7 Tinciones Inmunohistoquímicas.....	109
4.8 Evaluación de las muestras, almacenamiento de datos y análisis estadístico.....	114
4.11 Aspectos éticos.....	117
5. RESULTADOS	118
5.1 Estadística descriptiva de las variables clínicas e histológicas	120
5.1.2 Estadística descriptiva de toda la muestra.....	120
5.1.3 Estadística descriptiva diferenciando según CEC metastásico o no metastásico	122
5.1.4 Estadística descriptiva diferenciando según el tipo de lesión tumoral (CEC, queratoacantoma, queratosis actínicas).....	123
5.2 Estadística analítica univariante de las variables clínicas e histológicas.....	124
5.2.1 Análisis univariante comparando CEC con metástasis y sin metástasis	124

5.2.2	Análisis univariante comparando CEC, QA y AK.....	132
5.3	Estadística descriptiva del infiltrado inflamatorio asociado al tumor.....	136
5.4	Estadística analítica univariante del infiltrado inflamatorio asociado al tumor	143
5.4.1	Estadística analítica univariante del infiltrado inflamatorio comparando CEC metastásicos y no metastásicos	143
5.4.2	Estadística analítica univariante del infiltrado inflamatorio comparando los tres tipos de lesiones (CEC, queratoacantoma y queratosis actínica)	146
5.5	Estadística multivariante	149
5.5.1	Estadística multivariante comparando CEC metastásico y no metastásico	149
5.5.2	Estadística multivariante comparando CEC, queratoacantoma y queratosis actínicas	150
5.6	Asociación entre marcadores IHQ y otras variables clínico-histológicas	152
5.6.1	Comparación poblaciones linfocitarias según la edad	152
5.6.2	Comparación poblaciones linfocitarias según el espesor tumoral	153
5.6.3	Comparación poblaciones linfocitarias según la presencia de invasión perineural/linfovascular	154
5.6.4	Comparación poblaciones linfocitarias según si se trata de CECAR o no	155
6.	DISCUSIÓN.....	156
6.1	Variables epidemiológicas recogidas	158
6.1.1	Sexo	158
6.1.2	Edad.....	159
6.1.3	Diámetro de la lesión	160
6.1.4	Localización	161
6.1.5	Márgenes afectos.....	163
6.1.6	Grado de diferenciación.....	163
6.1.8	Invasión perineural y/o perivascular.....	165
6.1.9	Espesor tumoral	166
6.1.10	Invasión dermoepidérmica	167
6.1.11	CECAR	168
6.2	Marcadores de inflamación.....	168
6.2.1	Marcadores de células inflamatorias comparando CEC metastásico y no metastásico	168
6.2.2	Marcadores de células inflamatorias comparando CEC, queratoacantomas y queratosis actínicas.....	174
6.2.3	Otros subanálisis	177
7.	PERSPECTIVAS DE FUTURO	180

8. RELEVANCIA Y LIMITACIONES	183
9. CONCLUSIONES	187
10. BIBLIOGRAFÍA	190
11. ANEXO	213

Lista de Figuras

Figura 1. Ilustración de las capas de la piel humana.

Figura 2. Interacción entre respuesta inmunitaria innata y adaptativa a nivel cutáneo.

Figura 3. Queratosis actínicas en cuero cabelludo en estadio I de Olsen.

Figura 4. Queratosis actínicas cuero cabelludo, estadio II de Olsen.

Figura 5. Queratosis actínica dorso nasal, estadio III de Olsen.

Figura 6. Imagen histológica de queratosis actínica.

Figura 7. Imágenes clínicas de queratoacantomas, con su morfología crateriforme

Figura 8. Imagen histológica de queratoacantoma.

Figura 9. Carcinoma epidermoide bien diferenciado en dorso de antebrazo, con queratina en superficie y base infiltrada.

Figura 10. Carcinoma Epidermoide en cuero cabelludo moderadamente diferenciado.

Figura 11. Carcinoma epidermoide escasamente diferenciado en mejilla derecha.

Figura 12. Imagen histológica de carcinoma epidermoide.

Figura 13. Representación esquemática realizada por Corchado y colaboradores, que muestra las diferentes terapias dirigidas disponibles en la actualidad¹.

Figura 14. Inmunograma, con sus siete parámetros principales².

Figura 15. Medición del espesor tumoral para el CEC³.

Figura 16. Construcción de un array tisular. Se realizan biopsias en sacabocados de las zonas previamente seleccionadas del bloque de parafina donante, mediante agujas

Figura 17. Dos bloques de parafina con sus respectivos portaobjetos teñidos con H&E, en los

Figura 18. Uno de los bloques donantes de parafina con el punch para el microarray ya extraído de su porción izquierda, con mayor infiltrado inflamatorio.

Figura 19. Microarrayer automatizado TMA Grand Master.

Figura 20. Colocación de los bloques tumorales donantes en el microarrayer automatizado TMA Grand Master (imagen extraída de la página web oficial del

Figura 21. Obtención del bloque donante ya formado, del microarrayer automatizado

TMA Grand Master (imagen extraída de la página web oficial del arrayer

Figura 22. Los tres microarrays tisulares ya construidos, en orden (JCF1, JCF2, JCF3).

Figura 23. Las tres laminillas teñidas con H&E obtenidas de cada uno de los tres microarrays y dispuestas en orden (JCF1, JCF2, JCF3).

Figura 24. Fragmento del microarray JCF-1 teñido con H&E.

Figura 25. Autoteñidor Dako Omnis.

Figura 26. Sistema automatizado Panoramic MIDI II.

Figura 27. Microscopio óptico utilizado para el análisis de las muestras.

Figura 28. Gráfico de barras que representa la distribución del sexo en CEC metastásicos y no metastásicos.

Figura 29. Diagrama de cajas que representa la distribución de las edades CEC metastásicos y no metastásicos.

Figura 30. Diagrama de cajas que representa la distribución del tamaño tumoral para CEC metastásicos y no metastásicos.

Figura 31. Gráfico de barras que representa la distribución de la localización tumoral en CEC metastásicos y no metastásicos.

Figura 32. Gráfico de barras que representa la distribución de la afectación de márgenes en CEC metastásicos y no metastásicos.

Figura 33. Diagrama de cajas que representa la distribución de CEC metastásicos y no metastásicos.

Figura 34. Gráfico de barras que representa la distribución del grado de diferenciación CEC metastásicos y no metastásicos.

Figura 35. Gráfico de barras que representa la distribución de tumores con invasión perineural entre CEC metastásicos y no metastásicos.

Figura 36. Gráfico de barras que representa la distribución de la invasión dermoepidérmica en CEC metastásicos y no metastásicos.

Figura 37. Gráfico de barras que representa la distribución de CECAR entre CEC metastásicos y no metastásicos.

Figura 38. Gráfico de barras que representa la distribución del sexo entre CEC,

queratoacantomas y queratosis actínicas.

Figura 39. Diagrama de cajas que representa la distribución de la edad entre CEC, queratoacantomas y queratosis actínicas.

Figura 40. Diagrama de cajas que representa la distribución del tamaño de la lesión entre CEC, queratoacantomas y queratosis actínicas.

Figura 41. Gráfico de barras que representa la distribución de la localización tumoral entre CEC, queratoacantomas y queratosis actínicas.

Figura 42. Gráfico de barras que representa la distribución de la afectación de márgenes quirúrgicos entre CEC, queratoacantomas y queratosis actínicas.

Figura 43. Uno de los focos incluidos en el estudio con intensa infiltración de células CD8 positivas.

Figura 44. Uno de los focos incluidos en el estudio con moderada infiltración de células CD8 positivas.

Figura 45. Uno de los focos incluidos en el estudio con escasa infiltración de células CD8 positivas.

Figura 46. Uno de los focos incluidos en el estudio con moderada infiltración de células CD57 positivas.

Figura 47. Uno de los focos incluidos en el estudio con escasa infiltración de células CD57 positivas.

Figura 48. Uno de los focos incluidos en el estudio con intensa infiltración de células CD163 positivas.

Figura 49. Uno de los focos incluidos en el estudio con moderada infiltración de células CD163 positivas.

Figura 50. Uno de los focos incluidos en el estudio con escasa infiltración de células CD163 positivas.

Figura 51. Uno de los focos incluidos en el estudio con intensa infiltración de células CD25-FOXP3 positivas.

Figura 52. Uno de los focos incluidos en el estudio con moderada infiltración de células CD25-FOXP3 positivas.

Figura 53. Uno de los focos incluidos en el estudio con escasa infiltración de células CD25-FOXP3 positivas.

Figura 54. Diagrama de cajas que representa la expresión de CD8 en el infiltrado.

inflamatorio peritumoral entre CEC metastásicos y no metastásicos.

Figura 55. Diagrama de cajas que representa la expresión de CD163 en el infiltrado inflamatorio peritumoral entre CEC metastásicos y no metastásicos.

Figura 56. Diagrama de cajas que representa la expresión de CD57 en el infiltrado inflamatorio peritumoral entre CEC metastásicos y no metastásicos.

Figura 57. Diagrama de cajas que representa la expresión de FOXP3 y CD25 en el infiltrado inflamatorio peritumoral entre CEC metastásicos y no metastásicos.

Figura 58. Gráfico de medias que representa la expresión de CD8 en el infiltrado inflamatorio peritumoral entre CEC, queratoacantomas y queratosis actínicas.

Figura 59. Gráfico de medias que representa la expresión de CD163 en el infiltrado inflamatorio peritumoral entre CEC, queratoacantomas y queratosis actínicas.

Figura 60. Gráfico de medias que representa la expresión de CD57 en el infiltrado inflamatorio peritumoral entre CEC, queratoacantomas y queratosis actínicas.

Figura 61. Gráfico de medias que representa la expresión de FOXP3 y CD25 en el infiltrado inflamatorio peritumoral entre CEC, queratoacantomas y queratosis actínicas.

Figura 62. Diagrama de dispersión que representa la expresión de CD57 en función del espesor tumoral.

Lista de Tablas

Tabla 1. Clasificación TNM de CEC según la AJCC versión 8.

Tabla 2. Número de factores de riesgo que debe tener el tumor para pertenecer a cada uno de los estadios T de la clasificación BWH para el CEC.

Tabla 3. Factores de riesgo para metástasis en CEC invasivo.

Tabla 4. Factores de riesgo para recurrencia local o metástasis, según las guías NCCN.

Tabla 5. Genes estudiados por Faberg y colaboradores.

Tabla 6. Cálculo del tamaño muestral (n) teniendo en cuenta el nivel de confianza, poder estadístico, precisión, varianza y proporción esperada de pérdidas.

Tabla 7: variables clínicas que se recogieron en la muestra con sus valores posibles.

Tabla 8. Variables histológicas con sus posibles valores.

Tabla 9. Variables inmunohistoquímicas con sus valores posibles.

Tabla 10. Distribución de las diferentes muestras de manera aleatoria en el array tisular número 1 (denominado JCF 1). Estaba formado por 75 piezas cilíndricas de 1.5 cm de diámetro cada una de ellas, distribuidas en 9 columnas y 10 filas. Por motivos técnicos y para facilitar la interpretación de los datos, se dejaron algunas columnas y filas sin casos.

Tabla 11. Distribución de las diferentes muestras de manera aleatoria en el array tisular número 2 (denominado JCF 2).

Tabla 12. Distribución de las 4 piezas restantes de manera aleatoria en el array tisular número 3 (denominado JCF 3).

Tabla 13. Anticuerpos utilizados, con descripción de los mismos.

Tabla 14. Análisis descriptivo de toda la muestra.

Tabla 15. Análisis descriptivo de la cohorte de CEC.

Tabla 16. Análisis univariante comparando CEC metastásicos y no metastásicos según las diferentes variables estudiadas.

Tabla 17. Análisis univariante comparando CEC, queratoacantomas y queratosis actínicas según las diferentes variables estudiadas.

Tabla 18. Media del porcentaje de expresión de los diferentes marcadores en toda la muestra.

Tabla 19. Media del porcentaje de expresión de los marcadores IHQ en CEC metastásicos y no metastásicos, así como análisis univariante.

Tabla 20. Media del porcentaje de expresión en de los diferentes marcadores IHQ entre CEC, queratoacantomas y queratosis actínicas, así como análisis univariante.

Tabla 21. Análisis multivariante comparando CEC metastásicos y no metastásicos en función de aquellas variables que fueron estadísticamente significativas en el análisis univariante.

Tabla 22. Análisis multivariante comparando queratoacantomas con CEC en función de aquellas variables que fueron estadísticamente significativas en el análisis univariante.

Tabla 23. Análisis multivariante comparando queratosis actínicas con CEC en función de aquellas variables que fueron estadísticamente significativas en el análisis univariante.

Tabla 24. Análisis multivariante comparando queratoacantomas con queratosis actínicas en función de aquellas variables que fueron estadísticamente significativas en el análisis univariante.

Tabla 25. Comparación de los diferentes marcadores IHQ según la edad

Tabla 26. Comparación de los diferentes marcadores IHQ según el espesor tumoral.

Tabla 27. Comparación de los diferentes marcadores IHQ según la invasión perineural.

Tabla 28. Comparación de los diferentes marcadores IHQ según si se trata de CECAR o no.

Lista de Abreviaturas

AJCC: American Joint Committee on Cancer's

BCR: Receptor Células B

BHE: Barrera Hematoencefálica

BSGC: Biopsia Selectiva Ganglio Centinela

BWH: Brigham and Women's Hospital

CAP: Colegio de Patólogos Americanos

CBC: Carcinoma Basocelular

CEC: Carcinoma Epidermoide Cutáneo

CECAR: Carcinoma Epidermoide de Alto Riesgo

CPA: Células Presentadoras de Antígenos

CTLA-4: Antígeno 4 del Linfocito T Citotóxico

CDKN2A: Inhibidor 2A de Quinasa Dependiente de Ciclina

CMH: Complejo Principal de Histocompatibilidad

EGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico

EMA: Agencia Europea Medicamento

FDA: Food and Drug Administration

FOXP3: Proteína P3 de la Forkhead Box

G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

HGURS: Hospital General Universitario Reina Sofía

HMM: Hospital Morales Meseguer

H&E: Hematoxilina y eosina

IFN: Interferon

IHQ: Inmunohistoquímica

IL: Interleuquina

IL2RA: Receptor A de la Interleuquina 2

kDa: Kilodalton

KIR: Receptores Inhibidores

LDH: Lactato Deshidrogenasa

MIF: Factor Inhibidor de Migración de Macrófagos

MMP: Metaloproteasa de Matriz

NCCN: National Comprehensive Cancer Network

NFAT: factor nuclear de las células T activadas

NFKB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NK: Natural Killer

OR: Odds Ratio

PBS: Tampón Fosfato Salino

PD-1: Proteína de muerte celular programada 1

RDEB: Epidermólisis Distrófica Recesiva

RPR: Receptores de Reconocimiento de Patrones

RR: Riesgo Relativo

RT: Radioterapia

TCR: Receptor de Células T

TFD: Terapia Fotodinámica

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta

Th: linfocitos T Helper

TMA: MicroArray Tisular

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

UV: radiación UltraVioleta

UVB: radiación UltraVioleta B

VEGF: Factor de Crecimiento Endotelial

VHP: Virus Papiloma Humano

5-FU: 5-Fluorouracilo

Resumen

INTRODUCCIÓN

Existen actualmente diversos sistemas de estadificación para el CEC que utilizan factores clínicos e histológicos para clasificar a los pacientes. Su capacidad para predecir el desarrollo de metástasis puede disminuir en algún perfil de pacientes. De este modo, son necesarios más factores pronósticos para clasificar correctamente a los pacientes con CEC según su pronóstico y subsiguiente manejo en la consulta.

El infiltrado inflamatorio asociado a diversos tumores puede tener implicaciones pronósticas y terapéuticas. Existen escasos estudios que evalúen y comparen la composición del infiltrado inflamatorio asociado a otras lesiones queratinocíticas como el queratoacantoma y la queratosis actínica, cuyos resultados han resultado dispares.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Ante la ausencia de datos concluyentes en cuanto a la respuesta inmunitaria asociada a CEC y a otras lesiones queratinocíticas, planteamos un estudio del infiltrado inflamatorio asociado a CEC no metastásico, CEC metastásico, queratoacantomas y queratosis actínicas, mediante el uso de diversos marcadores inmunohistoquímicos de células inmunitarias. De este modo, pretendemos evaluar la repercusión pronóstica del infiltrado inflamatorio en cuanto a CEC y evidenciar si existen diferencias en el mismo entre los tres tipos de lesiones queratinocíticas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo de casos y controles, en pacientes con lesiones cutáneas cancerosa y precancerosa, con un período mínimo de seguimiento de 3 años.

Se calculó el tamaño muestral (n) a partir de un estudio piloto inicial. Los pacientes fueron incluidos siguiendo los criterios de inclusión explicados posteriormente.

Se disponía de un bloque tumoral en parafina para cada paciente. Se recogieron variables clínicas, demográficas, histológicas y evolutivas de manera retrospectiva y se realizaron estudios inmunohistoquímicos sobre estas muestras (CD8, CD163, CD57, FOXP3 y CD25). Se construyeron tres arrays tisulares, con un foco para cada uno de los bloques donantes.

Inicialmente se realizó estadística descriptiva para caracterizar la muestra. También se realizó un análisis univariante, comparando CEC metastásicos y no metastásicos y también comparando CEC, queratoacantomas y queratosis actínicas. Asimismo, se realizó un análisis multivariante mediante el modelo de regresión logística.

RESULTADOS

El tamaño muestral final fue de 146 pacientes. Se encontraron diferencias en cuanto a la edad de pacientes con CEC metastásico, que tenían una edad media mayor que aquellos sin metástasis. El tamaño de los CEC era mayor en aquellos que metastatizaban. También se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos según la localización de la lesión y el espesor tumoral. En el caso de los CEC metastásicos, el 80% de estos reunían criterios para ser etiquetados como CECAR, mientras que tan solo el 24,3% de los CEC no metastásicos los reunían también.

En cuanto a la expresión de CD8 (como marcador de linfocitos T citotóxicos), la media de expresión de este marcador fue mayor en CEC no metastásicos que en metastásicos. La expresión media de CD57 (como marcador de células NK) y de CD25 + FOXP3 (células T reguladoras) en pacientes con CEC metastásico fue mayor que en no metastásicos. La media de expresión de CD8 fue mayor en queratosis actínicas que en CEC. La expresión media de CD57 en pacientes con CEC fue mayor que en pacientes queratoacantoma.

CONCLUSIONES

Tal y como se había observado en estudios previos, la edad, el tamaño tumoral, el espesor tumoral y la localización pueden representar factores pronósticos para el desarrollo de metástasis en CEC. En nuestro estudio también se evidenció que la clasificación de la BWH en CECAR sí tenía validez pronóstica, ya que aquellos pacientes con CEC metastásico eran con más frecuencia CECAR.

Aquellos CEC que metastatizaron presentan un infiltrado inflamatorio asociado al tumor (TIL) diferente a aquellos CEC que no metastatizaron, de manera que expresaron menor cantidad de células CD8+, mayor cantidad de células CD57 positivas y de células FOXP3-CD25 positivas. Las queratosis actínicas presentaban mayor porcentaje de células CD8 positivas que el CEC. Las muestras con CEC, por su parte, presentaban mayor expresión de células CD57 positivas que los queratoacantomas.

Abstract

INTRODUCTION

There are several staging systems for cSCC that use clinical and histological factors to classify patients. Some profiles of patients can be missclassified with these staging systems. Thus, more prognostic factors are necessary to correctly classify patients with cSCC according to their prognosis and subsequent clinical management.

The Tumour-associated inflammatory cell infiltrate can have prognostic and therapeutic implications. There are few studies that evaluate and compare the composition of this infiltrate in other keratinocytic lesions such as keratoacanthoma and actinic keratosis.

JUSTIFICATION AND OBJECTIVES

In the absence of conclusive data regarding the cSCC immune mediated response, we propose a study of the inflammatory infiltrate associated with non-metastatic cSCC, metastatic cSCC, keratoacanthomas, and actinic keratoses, using some immune cells' immunohistochemical markers. This way we intend to evaluate the prognostic impact of the inflammatory infiltrate, and investigate whether there are differences on it between three types of keratinocytic lesions.

MATERIAL AND METHODS

Retrospective case-control study in patients with cancerous and precancerous skin lesions, with a minimum follow-up period of 3 years.

The sample size (n) was calculated from an initial pilot study. All patients were included following the inclusion criteria explained later.

One paraffin tumor block was available for each patient. Clinical, demographic, histological and prognostic variables were collected retrospectively and immunohistochemical studies were performed on these samples (using CD8, CD163, CD57, FOXP3 and CD25). Three tissue arrays were constructed, with a focus for each of the donor blocks.

Descriptive statistics were initially performed to characterize the sample. An univariate analysis was also performed, comparing metastatic and non-metastatic SCC and also comparing SCC, keratoacanthomas and actinic keratoses. Finally, a multivariate analysis was performed using the logistic regression model.

RESULTS

The final sample size was 146 patients. Differences were found in terms of the age of patients with metastatic cSCC, who were older than those without metastases. The size of the cSCC was greater in those who metastasized. Statistically significant differences were also found between both groups according to the location of the lesion and the tumor thickness.

Regarding the expression of CD8 (as a marker of cytotoxic T lymphocytes), the mean expression of this marker was higher in non-metastatic than in metastatic cSCC. The mean expression of CD57 (as a marker of NK cells) and of CD25 + FOXP3 (regulatory T cells) in patients with metastatic SCC was higher than in non-metastatic patients. The mean expression of CD8 was higher in actinic keratoses than in cSCC. The mean expression of CD57 in patients with CPB was higher than in keratoacanthoma patients.

CONCLUSIONS

As observed in previous studies, age, tumor size, tumor thickness, and location may represent prognostic factors for the development of metastases in cSCC. In our study, it was also evidenced that the BWH classification in high-risk cSCC did have prognostic validity, since those patients with metastatic CEC were more frequently high-risk.

Those SCC that metastasized presented a tumor-associated inflammatory infiltrate (TIL) different from those SCC that did not metastasized, so that they expressed fewer CD8 + cells, more CD57 positive cells and FOXP3-CD25 positive cells. Actinic keratoses had a higher percentage of CD8 positive cells than SCC. The samples with SCC, on the other hand, presented higher expression of CD57 positive cells than the keratoacanthomas.

1. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.1 Anatomía y funciones de la piel humana

La piel es el órgano más grande del cuerpo, con un tamaño medio aproximado de 2 m² en el adulto, que recubre toda la superficie corporal, presentando continuidad con las membranas mucosas que recubren los orificios de la misma. Está dividida en tres capas principales: la epidermis representa una barrera que impide la pérdida de líquidos y electrolitos y proporciona protección frente a agresiones externas. Por debajo de ésta se sitúa la dermis, que aporta soporte estructural y nutricional debido a su composición rica en fibras colágenas, fibroblastos, con abundante vascularización y terminaciones nerviosas. En un plano inferior se encuentra el tejido celular subcutáneo. En la dermis se encuentran algunas estructuras anejas, entre las que se incluyen los folículos pilosos, las glándulas sebáceas y las glándulas sudoríparas, tanto ecrinas como apocrinas⁴.

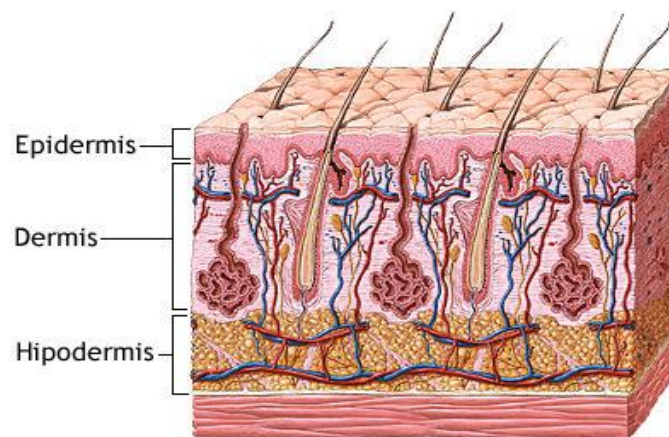


Figura 1. Ilustración de las capas de la piel humana⁴.

Anatómicamente, la característica más singular de la epidermis es la existencia del estrato córneo, que es la capa más externa de la misma y que está formada por pilas de corneocitos y lípidos intercelulares. No obstante, esta función barrera es imperfecta ya que el estrato córneo contiene múltiples comunicaciones con el exterior para la salida de los anejos cutáneos.

Es de sobra conocido que numerosos microorganismos (conocidos como la microbiota) viven en la superficie cutánea y establecen una relación comensal. Además, pueden influir en nuestra respuesta inmunitaria⁵. Debido a que los anejos carecen de estrato córneo, representan una zona estratégica para el acúmulo de la microbiota⁶.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, existen cuatro niveles funcionales de la barrera cutánea: la barrera del microbioma, la barrera química, la barrera física y la barrera inmunitaria. Estos se desarrollaron durante la evolución y sirven tanto para estabilizar como para restaurar la homeostasis cutánea y para el inicio de mecanismos de defensa en caso necesario. Las alteraciones en cada componente de la barrera cutánea pueden provocar diferentes condiciones patológicas, como infección, inflamación, sensibilización alérgica o desarrollo de tumores en la piel⁷.

1.2 Respuesta inmunitaria cutánea

Existe una constante exposición de la piel a patógenos externos, de modo que ésta presenta un entramado para el reconocimiento inmunológico, tanto innato como adaptativo. Algunos anejos cutáneos (folículos pilosos y glándulas sudoríparas), así como las vénulas, actúan como reservorios de las células inmunitarias, con potencial proliferación de tejido linfoide en los mismos⁶.

Tras la exposición cutánea a un antígeno, se produce una reacción inicial rápida, conocida como respuesta inmunitaria innata y una reacción específica más desarrollada, con capacidad de memoria: la respuesta inmunitaria adaptativa (Figura 2).

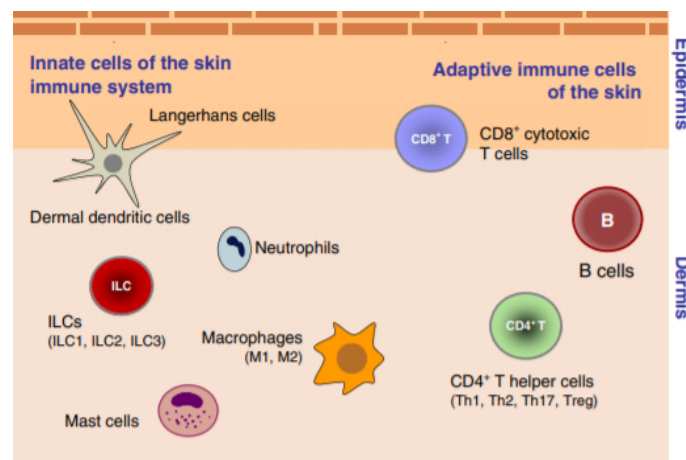


Figura 2. Interacción entre respuesta inmunitaria innata y adaptativa a nivel cutáneo⁸

INTRODUCCIÓN

1.2.a Respuesta inmunitaria innata

Los principales elementos celulares de la respuesta inmunitaria innata son macrófagos, neutrófilos, mastocitos y células dendríticas. Todos ellos presentan receptores de reconocimiento de patrones (RPR), que al reconocer sus ligandos activan cascadas con citoquinas proinflamatorias o proteasas como las caspasas, la IL-1 o la IL-33⁸.

Asimismo, los queratinocitos no son simplemente constituyentes de la barrera cutánea, sino también un componente del sistema inmunitario innato. Expresan varios patrones de receptores y son capaces de producir una gran variedad de citoquinas, como el factor de necrosis tumoral (TNF), la IL-33 y otros miembros de la familia IL-1. Estas citoquinas son esenciales para la activación de células inmunitarias residentes en la piel y para el reclutamiento de células inflamatorias circulantes^{9,6}.

Los macrófagos son células derivadas de los monocitos sanguíneos, con función fagocítica. Poseen receptores para anticuerpos y para el complemento, por lo que fagocitan microorganismos cubiertos por éstos. También presentan receptores para hidratos de carbono que no se encuentran en células humanas, por lo que son capaces de discriminar entre partículas propias o ajenas. Es destacable que presenten cierta función presentadora de antígenos. Cuando los macrófagos se activan, liberan una serie de citoquinas (G-CSF y GM-CSF) que inducen la proliferación de precursores mieloides en médula ósea y la liberación de neutrófilos al torrente sanguíneo¹⁰.

Los neutrófilos son los leucocitos más abundantes en el torrente circulatorio, y también representan una célula protagonista en la respuesta inmunitaria innata cutánea. Su producción y diferenciación es estimulada, por la G-CSF en médula ósea, además, también promueve su salida a la circulación¹¹. En los tejidos, ejercen su función fagocítica, con una regulación a la baja de la G-CSF.

Los mastocitos, tras detectar antígenos, producen histamina así como otras citoquinas y quimioquinas proinflamatorias. También se asocian con la respuesta inmunitaria T helper 2 (Th2)¹².

Los linfocitos natural killer (NK) o citolíticos naturales destruyen aquellas células tumorales o infectadas por virus mediante dos mecanismos: uno dependiente de anticuerpos IgG y otro independiente. Este último depende de receptores activadores

INTRODUCCIÓN

asesinos que reconocen moléculas expresadas por células nucleadas, que son destruidas a través de perforinas y granzimas. Además, los linfocitos NK poseen en su superficie receptores inhibitorios (KIR, receptores inmunoglobulinas de células K) que detectan moléculas de clase I del complejo principal de histocompatibilidad (CMH); e impiden la autólisis del huésped. Es habitual que tanto las células tumorales como las partículas virales regulen a la baja las moléculas del CMH clase I, por lo que estas células sin CMH tipo I serán detectadas y destruidas por los linfocitos NK.

1.2.b Respuesta inmunitaria adaptativa

Sus principales efectores son las células presentadoras de antígenos (CPA) y los linfocitos T y B. Tanto en procesos inflamatorios cutáneos como durante la formación de neoplasias, las células T efectoras que infiltran la piel detectan los antígenos presentados por las CPA cutáneas. Una vez reconocido el antígeno, estas células se activan y producen citoquinas/quimioquinas proinflamatorias.

Las células dendríticas son las principales CPA en la dermis y forman grupos para una presentación más eficiente a las células T. Después de adquirir antígenos en la piel, migran a través de los vasos linfáticos dérmicos para presentar los antígenos a las células T vírgenes a nivel de los ganglios linfáticos.

Por otra parte, las células de Langerhans son una estirpe de células presentadoras de antígenos (CPA) en la epidermis, que residen entre los queratinocitos. Se consideraban anteriormente un subconjunto de células dendríticas, ya que migran a los ganglios linfáticos. Sin embargo, recientes estudios ontogénicos han revelado que las células de Langerhans son en realidad un subconjunto de macrófagos residentes en los tejidos que adquieren un fenotipo similar a las células dendríticas¹³.

Tal y como se ha señalado previamente, los mastocitos también son capaces de actuar como CPA, aunque también pueden, de manera indirecta, activar a las CPA profesionales¹⁴.

Durante la inflamación o la formación de una neoplasia cutánea, se reclutan en la piel numerosas células T, así como neutrófilos y monocitos.

INTRODUCCIÓN

Los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ tienen en su superficie el receptor TCR (T Cell Receptor), que reconoce antígenos presentados a través del CMH clase I. Para la activación de los linfocitos T también se requiere de la unión del receptor CD8 a un correceptor. Asimismo, la señalización a través del receptor TCR requiere la presencia de señales coestimuladoras (moléculas superficiales y citoquinas) para activar a los linfocitos T. Las moléculas coestimuladoras más destacadas son la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1). Éstas se consideran correceptores asociados a los linfocitos T con efectos reguladores negativos. Esto significa que la neutralización de los correceptores mediante anticuerpos (ipilimumab para CTLA-4 o nivolumab/pembrolizumab para PD-1) supone una diana terapéutica eficaz para algunas neoplasias malignas, como el melanoma maligno o el carcinoma epidermoide.

Los linfocitos T helper CD4⁺ (Th) tienen en superficie también un receptor TCR, que reconoce antígenos presentados por las CPA a través del CMH clase II. Estos se pueden diferenciar en Th efectores, Th memoria y T reguladores o supresores.

Los linfocitos T reguladores CD4⁺ y FOXP3⁺ suponen el 20% de las células residentes T en piel tipo CD4⁺ y ejercen un efecto supresor inmunitario mediante la liberación de citoquinas inhibitorias, como IL-10 o TGF- β . Intervienen en el correcto funcionamiento de los linfocitos T efectores e incluso son capaces de inducir la apoptosis de éstos¹⁵. Asimismo, también producen una regulación negativa de la maduración y de la función de las CPA. De este modo, las células T reguladoras, representan un subtipo de células CD4⁺ que suprimen la acción de las células autorreactivas, por lo que mantienen una homeostasis inmunitaria. Además, también median en otros procesos de vital importancia como la regeneración del folículo piloso a partir de las células madre, la cicatrización y la tolerancia inmunitaria frente a la microbiota cutánea¹⁶.

Los linfocitos B presentan en su membrana el receptor BCR (B Cell Receptor), que es una inmunoglobulina que se unirá al antígeno presentado. Tienen otros tres correceptores para su activación durante esta interacción, que aumentan la eficacia de la unión: D21, CD19 y CD81. Tras su activación, se inician una serie de cascadas que llevan finalmente a la producción de inmunoglobulinas por parte de las células B.

1.3 Alteraciones en la respuesta inmunitaria cutánea

Las alteraciones en la respuesta inmunitaria, tanto por exceso como por defecto, tienen una importante repercusión clínica en el individuo, ocasionando enfermedades inflamatorias cutáneas, tales como dermatitis atópica, rosácea o bien desencadenando enfermedades autoinflamatorias, entre otras.

En cuanto al desarrollo de cáncer cutáneo, las poblaciones leucocitarias pueden ser protectoras y también pueden desempeñar un papel en la "escultura" del tumor naciente, lo que conduce a la pérdida de inmunogenicidad y subsiguiente progresión tumoral.

De sobra es conocido que el sistema inmunitario protege frente a la aparición de neoplasias malignas. Así pues, en los Países Bajos y en Noruega, la incidencia de CEC en trasplantados cardíacos y renales es de 65 a 250 veces más frecuente que en la población no inmunosuprimida¹⁷. Además, estos pacientes tienen mayor tendencia a recidivas y a aparición de metástasis. En comparación con otras enfermedades malignas en pacientes receptores de órganos trasplantados, el CEC es el tipo más frecuente de neoplasia maligna en éstos, lo cual lleva implícito que la respuesta inmunitaria juega un papel muy importante para el desarrollo del CEC invasor¹⁸.

INTRODUCCIÓN

1.4 Queratosis actínicas

1.4.a Definición y epidemiología

Las queratosis actínicas son lesiones que cursan con displasia de queratinocitos epidérmicos, característicamente localizadas en zonas fotoexpuestas de manera crónica y son más habituales en pacientes con fototipos claros. Representan un problema de salud pública debido a su elevada prevalencia, con un destacable coste económico y un potencial riesgo de transformación a CEC¹⁹.

Se trata de uno de los diagnósticos más frecuentemente realizados por parte de los dermatólogos y según algunos autores, en más del 10% de las visitas dermatológicas se efectúa un diagnóstico de queratosis actínica²⁰.

No existe consenso hoy en día sobre la definición exacta de queratosis actínica: algunos autores afirman que representa un carcinoma epidermoide in situ, mientras que otros la diferencian del mismo, debido, entre otros factores, a que muchas de ellas regresan espontáneamente²¹.

Las queratosis actínicas son el primer signo histológico de alteraciones displásicas de los queratinocitos, que pueden seguir uno de estos tres caminos: remisión espontánea, persistencia o transformación maligna, con potencial metastásico¹⁹.

El riesgo de transformación de las queratosis actínicas a CEC es muy bajo. Dependiendo de las series consultadas, se ha establecido en 0.075-0.6% por lesión al año¹⁹. Además, un estudio mostró que aproximadamente el 27% de los CEC se desarrollan sobre lesiones previas de queratosis actínicas y que un 56% presentan queratosis actínicas en proximidad²². Si bien es cierto que no se puede conocer qué queratosis actínica progresarán a CEC invasor, los signos clínicos de progresión incluyen induración, inflamación, tamaño mayor de 1 cm, crecimiento rápido, sangrado, eritema y ulceración^{19,23}. Según algunos autores, los CEC que se desarrollan sobre queratosis actínicas suelen ser de bajo riesgo¹⁸.

INTRODUCCIÓN

1.4.b Presentación clínica, clasificación y diagnóstico

Clínicamente se presentan en forma de pápulas eritematosas o color piel, hiperqueratósicas en mayor o menor grado. Su tamaño puede variar desde escasos milímetros hasta más de 2 centímetros de diámetro, ya que muchas pueden coalescer. Suelen localizarse en cara, dorso de manos y cuero cabelludo con alopecia.

A la dermatoscopia, se puede apreciar un pseudorretículo eritematoso, con rosetas blancas distribuidas geométricamente y con escamas blanquecinas evidentes. En muchas ocasiones son más palpables que visibles. La variante pigmentada cursa con un pseudorretículo pigmentado a nivel facial y con descamación superficial. Aquellas más hiperqueratósicas pueden mostrarse clínicamente en forma de cuernos cutáneos y a la dermatoscopia, la densa hiperqueratosis no permite evidenciar otras estructuras. Habitualmente las queratosis actínicas no suelen estar infiltradas al tacto, ya que no invaden más allá de la epidermis.

En cuanto a la clasificación de las mismas, existen múltiples sistemas, pero el más aceptado en la práctica clínica es el de Olsen²⁴, que gradúa las lesiones según su grosor y grado de hiperqueratosis en 3 niveles:

- Las lesiones de grado 1 son ligeramente palpables.
- Las lesiones de grado 2 lo son moderadamente.
- Las lesiones de grado 3 son muy gruesas e hiperqueratósicas.

La clasificación de Rowert-Huber²⁵ establece una gradación histológica de las queratosis actínicas según la extensión de queratinocitos atípicos, también en 3 niveles, de menor a mayor grado de displasia.

En el estudio de Schmitz *et al.*²⁶ se comprobó que no existe correlación entre la clasificación clínica de Olsen y la histológica de Rowert-Huber, lo cual significa que las lesiones más hiperqueratósicas no tienen por qué presentar más displasia que aquellas que no se palpan. Esto reforzó la necesidad de tratar todas las queratosis actínicas, independientemente de su estadificación clínica.

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico de las queratosis actínicas suele ser clínico aunque, en ocasiones, algunas variantes como las hiperpigmentadas o hiperqueratósicas, requerirán de biopsia para realizar diagnóstico diferencial con otras entidades como el léntigo maligno o CEC in situ. Es fundamentalmente por este motivo por el que disponemos en nuestra base de datos de piezas histopatológicas de queratosis actínicas.



Figura 3. Queratosis actínicas en cuero cabelludo en estadio I de Olsen.



Figura 4. Queratosis actínicas cuero cabelludo, estadio II de Olsen.



Figura 5. Queratosis actínica dorso nasal, estadio III de Olsen.

INTRODUCCIÓN

1.4.c Histología

Histológicamente, las queratosis actínicas presentan queratinocitos atípicos con núcleos pleomórficos y aumento de figuras mitóticas en la epidermis basal, que pueden llegar a extenderse en todo el espesor epidérmico. Típicamente, afectan a los queratinocitos más superficiales de las glándulas sudoríparas y de los folículos pilosos, en una profundidad que coincide con con el nivel de penetración de los rayos ultravioleta en la dermis. Sin embargo, no afectan a los queratinocitos más profundos de estas estructuras²⁵. A nivel córneo, suele existir hiperqueratosis con paraqueratosis alternante, debido al desarrollo anormal de los queratinocitos.

En la dermis suelen cursar con elastosis solar y con un escaso infiltrado linfocítico, con algunas células plasmáticas dispersas.

Existen diferentes variantes histológicas de las queratosis actínicas: bowenoide, hipertrófica, atrófica, acantolítica, liquenoide y proliferativa²⁶.

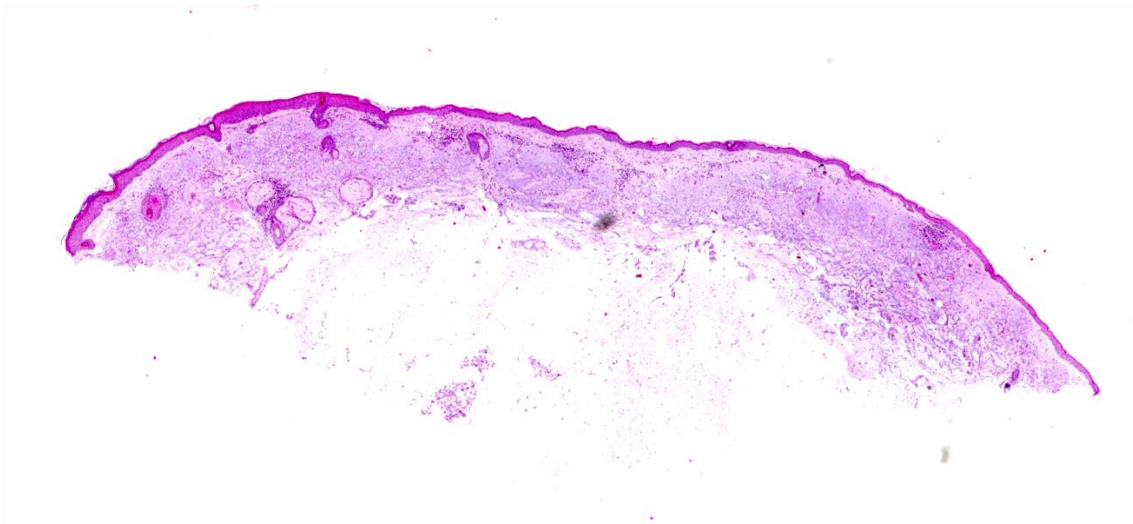


Figura 6. Imagen histológica de queratosis actínica, con elastosis solar (H-E x2,5).

INTRODUCCIÓN

1.4.d Tratamiento

Existen múltiples opciones terapéuticas para las queratosis actínicas. Los métodos más utilizados actualmente son la destrucción selectiva de la lesión o bien el tratamiento del campo de cancerización con medicamentos tópicos, que evitan la progresión de la queratosis actínica a CEC.

Dentro de las terapias de destrucción selectiva encontramos la crioterapia con nitrógeno líquido, láser CO₂, curetaje con o sin ácido tricloracético y dermoabrasión. En cuanto a las terapias de campo, existe una amplia variedad de tratamientos tópicos disponibles, entre los que destacan el 5-fluoruracilo, imiquimod, ingenol mebutato, diclofenaco y la terapia fotodinámica.

Un metaanálisis reciente comparó todas estas terapias en función de su eficacia para la eliminación completa de las queratosis actínicas. La más eficaz fue el 5-fluoruracilo, seguida de la terapia fotodinámica (TFD) con ácido aminolevulínico, imiquimod, ingenol mebutato, TFD con metil-aminolevulinato, crioterapia, diclofenaco con ácido hialurónico y placebo²⁷. No obstante, estos resultados no se han podido reproducir en otros metaanálisis, sin hallarse diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

Por todo esto, no existe consenso actualmente sobre el mejor tratamiento para las queratosis actínicas. Lo que sí se sabe es que las combinaciones de tratamientos localizados y terapias de campo pueden ser más eficaces que el tratamiento localizado en monoterapia¹⁹.

Asimismo, muchas de ellas pueden desaparecer espontáneamente, aunque es posible que reaparezcan posteriormente en la misma localización. Las tasas de regresión espontánea suelen variar del 20 al 30% al año en la mayoría de estudios, sin embargo, en un estudio del año 2013 se estableció esta tasa en un 63% al año²⁸.

Resulta fundamental el papel de la prevención para evitar el desarrollo de las queratosis actínicas mediante la fotoprotección.

INTRODUCCIÓN

1.5 Queratoacantoma

1.5.a Definición y epidemiología

Se trata de un tumor queratinizante, de morfología crateriforme, que aparece con mayor frecuencia en individuos con fototipos claros, sobre zonas fotoexpuestas, con un pico de incidencia entre los 50 y 80 años. Fue descrito en 1888 por Hutchinson²⁹, pero hoy día todavía sigue existiendo controversia sobre su clasificación como benigno o maligno.

Su incidencia en la población australiana es de 104 casos por cada 100.000 habitantes por año³⁰. No obstante, se cree que es una lesión infradiagnosticada, debido fundamentalmente a su potencial carácter autorresolutivo y al diagnóstico diferencial clínico dificultoso con el CEC³¹.

Al contrario que el CEC, el queratoacantoma deriva del folículo piloso³¹. Presenta marcadores similares a aquellos encontrados en el istmo e infundíbulo folicular. Tiene una naturaleza trifásica, con una etapa proliferativa, otra de estabilización y finalmente una fase de regresión. Esta naturaleza es similar al ciclo del folículo piloso³².

1.5.b Origen

Se han sugerido múltiples factores etiológicos, como radiación ultravioleta, inmunosupresión, uso de inhibidores BRAF, exposición a otros carcinógenos químicos, exposición a VHP, a rayos X o traumatismo previo en la zona³¹. Además, el queratoacantoma múltiple se ha asociado a diversos síndromes como Muir-Torre o Xeroderma pigmentoso.

Existe mucha controversia respecto a la relación entre el queratoacantoma y el CEC. Mientras algunos autores lo perciben como una neoplasia escamosa con un curso clínico benigno^{33,34}, otros lo consideran como una variante bien diferenciada de CEC^{35,36} con regresión espontánea habitualmente, aunque ocasionalmente puede mostrar comportamiento agresivo con desarrollo de metástasis. Esta última corriente también se

INTRODUCCIÓN

respalda en el hecho de que histológicamente no existen criterios definitivos que diferencien ambas entidades.

1.5.c Presentación clínica

Clínicamente suele presentarse en forma de una tumoración solitaria crateriforme en zonas crónicamente fotoexpuestas, con un crecimiento explosivo inicial que suele durar de 4 a 8 semanas, seguido de una fase de estabilización. Posteriormente es capaz de autoinvolucionar, habitualmente antes de los 6 meses, dejando una cicatriz deprimida en la zona.

A la dermatoscopia, no existen hallazgos patognomónicos que permitan una certera distinción entre queratoacantoma y CEC. Se aprecia habitualmente queratina, así como vasos puntiformes, al igual que en el CEC. Típicamente, la dermatoscopia de los queratoacantomas se presenta en forma de círculos concéntricos con un cráter central, rodeados de un área blanca, con los ya citados vasos en la periferia³¹.

Existen múltiples variantes clínicas de queratoacantomas: solitario, mucoso, subungueal, gigante, queratoacantomas múltiples, eruptivos y queratoacantoma centrifugo marginado.



Figura 7. Imágenes clínicas de queratoacantomas, con su morfología crateriforme.

INTRODUCCIÓN

1.5.d Histología

Las características celulares del queratoacantoma son idénticas a las del CEC. Aquello que nos permite realizar un correcto diagnóstico diferencial es la distribución de las células. Lo hacen de manera exofítica y simétrica, formando lóbulos de epitelio escamoso con una zona crateriforme central³⁷.

Atendiendo a la fase del desarrollo evolutivo, el queratoacantoma presenta diferentes patrones histológicos:

- Fase inicial: lóbulos bien circunscritos de epitelio escamoso, formado por células con un amplio citoplasma pálido, con escasa queratinización. Puede existir atipia moderada.
- Fase de estabilización: cráter central relleno de queratina, sin capa granular, al igual que en el folículo piloso. Pueden apreciarse nidos de células epiteliales con mayor atipia y de mayor tamaño, se pueden ver figuras mitóticas, así como un infiltrado inflamatorio perilesional con abundancia de eosinófilos, que puede tener un patrón liquenoide.
- Fase de regresión: cráter central con queratina, con epitelio maduro en periferia sin atipia. En dermis se aprecia fibrosis horizontal.

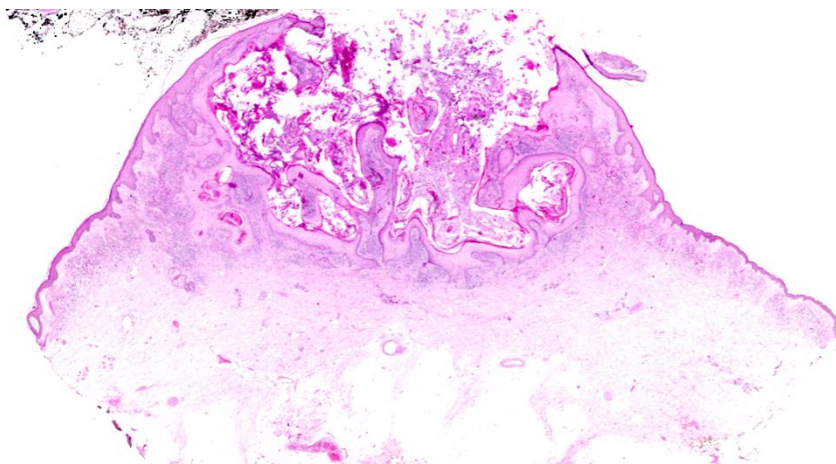


Figura 8. Imagen histológica de queratoacantoma (H-E x2,5).

INTRODUCCIÓN

1.5.e Tratamiento

Todavía existe controversia sobre el manejo del queratoacantoma solitario. El control evolutivo, asumiendo la regresión espontánea, es cuestionable a no ser que ya existan signos de regresión en el momento de la visita³⁸, pues no se puede saber el tamaño definitivo de la lesión, que puede ocasionar una desfiguración importante.

Si bien es cierto que el potencial de transformación maligna es escaso, hay que tenerlo en cuenta a la hora de elegir el adecuado tratamiento³¹. Según los criterios de búsqueda de Savage *et al.*³⁹, no se ha reportado ningún caso en la literatura de queratoacantoma con evolución fatal.

El tratamiento Gold standard es la extirpación quirúrgica de la pieza completa y aunque no existe consenso sobre los márgenes de seguridad, se suelen emplear los mismos que para el CEC.

En cuanto a su potencial de regresión espontánea, se ha postulado que se debe a la reacción inmunitaria circundante, a eventos relacionados con el ciclo del folículo piloso, o bien debido a la estimulación de factores que promueven la apoptosis⁴⁰.

INTRODUCCIÓN

1.6 Carcinoma epidermoide cutáneo (CEC)

1.6.a Epidemiología y factores de riesgo

En sujetos de raza caucásica, el cáncer cutáneo no melanoma supone la neoplasia maligna más frecuente, de manera que afecta al 20% de la población. El carcinoma basocelular (CBC) representa el 70-80% de estas neoplasias no melanocíticas. El carcinoma epidermoide cutáneo (CEC) es el segundo en frecuencia, de todos los tumores y puede suponer hasta un 25% del total⁴¹. Además el CEC supone el 20% de las muertes por cáncer de piel⁴².

En un análisis de los registros de cáncer en Australia (desde 2011 hasta 2014), en Alemania (de 2007 a 2015) y en Estados Unidos (de 2013 a 2015) se observó que la incidencia de CEC por 100.000 personas al año fue de 341, 54 y 497 respectivamente⁴³. En Reino Unido, la incidencia de CEC cutáneo en el periodo de 2013 a 2015 fue de 77 por 100.000 personas por año, con un incremento medio anual del 5%⁴⁴. Según una revisión sistemática del año 2016 llevada a cabo por Tejera-Vaquerizo y cols. la incidencia global de CEC en España es de 38 casos por 100.00 personas/año, aunque los propios autores remarcan que es posible que estos datos estén infrareportados⁴⁵.

La incidencia del CEC ha aumentado a lo largo de los últimos 20 años en población de raza blanca. Las posibles causas de este incremento son el aumento de la exposición solar, tanto de manera natural como artificialmente, así como el incremento progresivo de la edad poblacional⁴⁶. En múltiples estudios se ha corroborado que la incidencia del CEC aumenta de manera progresiva con la edad, de manera que en individuos mayores de 75 años, la incidencia es de 50 a 300 veces superior que en pacientes menores de 45 años⁴⁷. Según las guías Europeas la prevalencia de CEC es mayor en latitudes bajas⁴⁸.

En Estados Unidos, un estudio llevado a cabo por Karia *et al.*⁴³, demostró que en el año 2012, entre 5604 y 12,572 individuos con CEC desarrollaron metástasis ganglionares y que de 3932 a 8791 sujetos fallecieron por CEC en Estados Unidos durante ese año, con una cifra de mortalidad similar a la del cáncer renal, orofaríngeo y melanoma.

Eigentler *et al.*⁴⁹ realizaron un estudio retrospectivo en 2017 con un total de 2149 pacientes intervenidos quirúrgicamente por CEC, con un seguimiento medio de 36.5

INTRODUCCIÓN

meses. Se produjeron 40 muertes por CEC, suponiendo el 2.8%, 12 por metástasis a distancia y 28 por progresión local ganglionar.

Aquellos individuos de fototipos de Fitzpatrick más oscuros presentan menor incidencia de CEC⁵⁰. Así pues, en sujetos de raza negra esta tumoración maligna aparece en zonas sometidas a inflamación crónica o a traumatismos previos, con escasa relación con la fotoexposición.

La radiación UV acumulada a lo largo del tiempo es el principal factor etiológico del CEC, especialmente la radiación solar acumulada tipo UVB. Por el contrario, en el caso del carcinoma basocelular y del melanoma, el principal factor de riesgo es la exposición solar intensa e intermitente⁵¹.

La inmunosupresión es otro factor de riesgo a tener en cuenta. En Australia, el 70% de los pacientes trasplantados desarrollan CEC a los veinte años de seguimiento⁵².

Otros factores de riesgo para el desarrollo del CEC son la exposición a radiación ionizante, a arsénico o a radón, así como el tabaquismo. También aumentan el riesgo de sufrir CEC la inflamación crónica cutánea, algunas infecciones por genotipos determinados de papilomavirus, así como la toma de determinados fármacos (como tiazidas, inhibidores de BRAF o voriconazol)⁵³. Asimismo, existen factores genéticos que predisponen a sufrir este tipo de neoplasia, como historia familiar de CEC o sufrir algunos síndromes genéticos como xeroderma pigmentoso, o albinismo.

1.6.b Patogenia

El CEC se origina de los queratinocitos epidérmicos y de las estructuras anexiales, como unidades pilosebáceas y glándulas ecrinas.

Es uno de los tumores humanos con mayor carga mutacional⁵⁴. Inicialmente aparece una mutación en el gen supresor tumoral TP53, hasta en el 95% de los CEC⁵⁵. Esta mutación es inducida fundamentalmente por la radiación UV, de manera que también se encuentra en las queratosis actínicas⁵⁶. Permite evitar la apoptosis y promueve el desarrollo clonal de células con esta mutación.

INTRODUCCIÓN

Posteriormente, durante el proceso de carcinogénesis del CEC, se van produciendo otras mutaciones en genes supresores tumorales como CDKN2A o NOTCH, y en protooncogenes como RAS¹. Todo ello promueve un desarrollo clonal de las células tumorales. Asimismo, se ha documentado el papel de NOTCH en el desarrollo del microambiente tumoral, pues se ha visto que en ratones con déficit del mismo se promueve la angiogénesis, inflamación y fibroplasia⁵⁷.

La sobreexpresión de EGFR es común en el CEC y además, se asocia a fenotipos más agresivos y con peor pronóstico⁵⁸. EGFR es un miembro de la familia de receptores tirosin-kinasa ErbB, que transmite una señal de crecimiento a aquellas células que han sido estimuladas con el ligando para EGFR¹. Las vías que se ven afectadas por la activación de EGFR son: RAS-RAF-MEK-MAPK, PLC-gamma/PKC y PI3K/AKT/mTOR⁵⁹. La vía EGFR y las subsiguientes suponen una diana para terapias contra el CEC, como veremos a continuación.

La epigenética y el microambiente tumoral también juegan un papel fundamental en la patogenia del CEC. Esto es así ya que los queratinocitos epidérmicos en piel normal fotoexpuesta crónicamente también contienen mutaciones en muchos de los mismos genes que en el caso del CEC. Por esto, tanto las alteraciones epigenéticas como el microambiente tumoral de las lesiones premalignas son requeridos para la progresión a CEC invasivo y metastásico.

1.6.c Clínica

El CEC in situ o enfermedad de Bowen se presenta como una placa eritematosa bien delimitada, con escamas blanquecinas en superficie, sobre áreas fotoexpuestas crónicamente. Suele mostrar un crecimiento lento, durante años. A diferencia de las placas de enfermedades inflamatorias cutáneas como psoriasis o dermatitis atópica, suelen ser asintomáticos y no responden a corticoterapia tópica.

La presentación clínica del CEC invasivo puede ser muy variable y depende de la variante clínica y de la localización anatómica, aunque habitualmente se presenta en forma de una tumoración exofítica de superficie queratinizante o bien friable, en una

INTRODUCCIÓN

zona crónicamente fotoexpuesta. Aproximadamente el 55% de todos los CEC se localizan en cabeza y cuello y el 18% en superficies extensoras de manos y brazos⁶⁰.

La presentación también depende de la diferenciación histológica: aquellos bien diferenciados son más queratinizantes, y aquellos con menor diferenciación, se presentan como úlceras friables habitualmente.

Es frecuente apreciar un campo de cancerización en piel circundante, con múltiples queratosis actínicas.

También puede presentarse en forma de úlcera crónica que no reepiteliza pese a un adecuado tratamiento. Aquellos CEC que aparecen sobre heridas o úlceras crónicas también se denominan úlcera de Marjolin⁶¹.

A la dermatoscopia, los rasgos distintivos del CEC son fundamentalmente los vasos, que pueden ser puntiformes o bien glomerulares. Aquellos invasivos tienen vasos en horquilla y en serpentina. Los CEC pigmentados también cursan con glóbulos marrones, así como una pigmentación marrón-grisácea pigmentada⁶².



Figura 9. Carcinoma epidermoide bien diferenciado en dorso de antebrazo, con queratina en superficie y base infiltrada.



Figura 10. Carcinoma epidermoide en cuero cabelludo que histológicamente demostró ser moderadamente diferenciado.



Figura 11. Carcinoma epidermoide que histológicamente demostró ser escasamente diferenciado, localizado en mejilla derecha.

INTRODUCCIÓN

1.6.d Histología

Existe una proliferación de lóbulos formados por queratinocitos cuyos núcleos presentan diferentes niveles de pleomorfismo, sus nucleolos suelen ser prominentes. También son frecuentes las figuras mitóticas. El citoplasma de los queratinocitos suele ser rosado debido a la queratina³⁷.

Se pueden apreciar perlas formadas por queratina debido a la diferenciación celular, que es variable. Sin embargo, aquellos tumores mal diferenciados pueden ser difíciles de diagnosticar, con abundantes células fusiformes y con ausencia de clara queratinización.

Se han descrito diferentes variantes histológicas de CEC, como el ya mencionado queratoacantoma (aunque para algunos autores no representa una verdadera variante del CEC). El carcinoma verrucoso, también denominado cuniculatum cuando se localiza en la planta de los pies, es una variante de CEC muy bien diferenciada, con un comportamiento relativamente benigno, que no suele metastatizar, aunque sí puede tener un componente importante de destrucción tisular local.

El CEC desmoplásico es altamente infiltrante, con una tasa de recurrencias diez veces mayor que el resto de variantes y una tasa de metástasis seis veces superior⁶². La variante adenoescamosa se caracteriza por la presencia de estructuras tubulares secretoras y también presenta un alto riesgo de recurrencia local, metástasis y muerte⁶³.

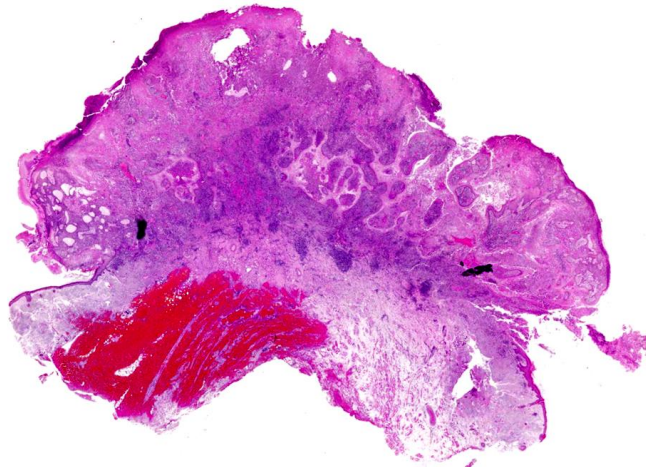


Figura 12. Imagen histológica carcinoma epidermoide (H-E x2,5).

INTRODUCCIÓN

1.6.e Estadificación

La estadificación es una herramienta fundamental para clasificar a los pacientes en grupos de diferente pronóstico y manejo. Existen diversos esquemas de estadificación del CEC, que permiten estratificar a los pacientes en grupos con similar pronóstico, lo que ayuda a estandarizar tanto tratamientos como seguimiento de los mismos.

El sistema de estadificación de la American Joint Committee on Cancer's (AJCC) más reciente es el AJCC-8, de 2018⁶⁴.

- T: Utiliza el diámetro del tumor mayor o igual a 2 cm como factor distintivo entre tumores T1 y T2. Para T3 incluye aquellos que tienen un diámetro mayor o igual a 4 cm, mínima erosión ósea, invasión perineural e invasión en profundidad mayor o igual a 6 mm o en plano graso. T4 está reservado para mayor invasión ósea.
- N: Las metástasis ganglionares son definidas por la categoría N, de manera que una metástasis solitaria parotídea o ganglionar regional menor o igual a 3 cm se categoriza como N1.
- M: según si presenta o no metástasis a distancia.

Categoría T	Criterios T	Categoría N	Criterios N	Categoría M	Criterios M
Tx	No se identifica primario	Nx	No se pueden estudiar los ganglios linfáticos regionales	M0	No metástasis a distancia
Tis	Carcinoma in situ	N0	No invasión ganglios linfáticos regionales	M1	Sí metástasis a distancia
T1	Tumor <2cm de diámetro	N1	Metástasis en un solo ganglio linfático ipsilateral ≤ 3 cm		
T2	Tumor ≥2 cm pero <4cm	N2	Metástasis en un ganglio linfático ipsilateral 3-6cm o en ganglios linfáticos contralaterales o bilateral, ninguno de >6cm		
T3	Tumor ≥4cm o erosión ósea menor o invasión perineural o invasión grasa	N2a	Metástasis en un ganglio linfático ipsilateral 3-6cm		
T4	Tumor con	N2b	Metástasis en múltiples		

INTRODUCCIÓN

	invasión ósea mayor, o de la base del cráneo		ganglios linfáticos ipsilaterales, ninguno >6cm		
T4a	Tumor con invasión ósea mayor	N2c	Metástasis en ganglios linfáticos contralaterales o bilateral, ninguno de >6cm		
T4b	Tumor con invasión de la base del cráneo	N3	Metástasis en ganglios >6cm con extensión extranodal, o en un solo ganglio ipsilateral >3cm con invasión extranodal o múltiples ganglios ipsilaterales o contralaterales con o sin invasión extranodal.		
		N3a	Metástasis en ganglios >6cm con extensión extranodal,		
		N3b	Metástasis en un solo ganglio ipsilateral >3cm con invasión extranodal o múltiples ganglios ipsilaterales o contralaterales con o sin invasión extranodal		

Tabla 1. Clasificación TNM de CEC según la AJCC versión 8⁶⁴.

El riesgo de aparición de eventos relacionados con la enfermedad es similar en pacientes estratificados como T2 y T3 según esta clasificación. De este modo, los clínicos deberían ser conscientes de que algunos tumores clasificados como T2 pueden tener mal pronóstico y se podrían beneficiar de terapia adyuvante o estadificación nodal. Esto ocurre fundamentalmente en aquellos tumores con escaso grado de diferenciación. A pesar de que la clasificación AJCC 8 para CEC sí reconoció el bajo grado de diferenciación como un factor de riesgo, se consideró que era muy inconsistente su definición y aplicación para incluirlo en este sistema de clasificación⁶⁵.

En 2013 se propuso el sistema de estadificación de Brigham and Women's Hospital (BWH), que ofrece una clasificación de T alternativa, aunque no incluye N ni M. Incluye como factores de riesgo:

- Diámetro tumoral mayor o igual a 2 cm.
- Invasión más allá de la grasa subcutánea.
- Invasión perineural de nervios de diámetro mayor o igual a 0.1 mm.
- Escasa diferenciación histológica.

INTRODUCCIÓN

* Los tumores con invasión ósea, pasan directamente a estadio T3.

Dependiendo del número de factores de riesgo que reúna cada tumor, se clasifica en diferentes estadios. Cuando un paciente tiene dos o más de estos factores de riesgo, se considera que presenta un CEC de alto riesgo (CECAR) según esta clasificación. Todo esto está recogido en la tabla 2.

Estadio	Número de factores de riesgo
T1	0
T2a	1
T2b	2-3
T3	4 o más

Tabla 2. Número de factores de riesgo que debe tener el tumor para pertenecer a cada uno de los estadios T de la clasificación BWH para el CEC⁶⁶.

Según algunos autores, esta última clasificación estratifica mejor a los pacientes en cuanto al riesgo de eventos adversos tras el tratamiento y también diferencia mejor aquellos pacientes T2 de los T3⁶⁷. Además, también se puede utilizar para estratificar los CEC fuera del área de la cabeza y cuello.

Es por estos últimos dos motivos por los que vamos a utilizar la clasificación del BWH para realizar nuestro estudio dividiendo a los pacientes en CECAR o no.

Existen otras clasificaciones de CEC y guías de práctica clínica, como la reciente BAD guideline (British Association of Dermatologists)⁶⁸ publicada en 2021, en la cual se clasifica en tres grados a los tumores (bajo, alto y muy alto). Los factores que consideran para esta clasificación son: diámetro tumoral, espesor, invasión dérmica, invasión perineural-linfovascular, grado diferenciación. Además, añade otras variables como márgenes <1mm de distancia y estado inmunitaria del paciente.

INTRODUCCIÓN

1.6.f Pronóstico y factores de riesgo

Según un estudio retrospectivo de cohortes del año 2013, que incluye 985 pacientes con CEC, la tasa de recurrencia local media fue de 4,6%, la tasa de adenopatías metastásicas fue del 3,7%, la tasa de mortalidad específica por enfermedad fue del 2,1% y la tasa de supervivencia a los 5 años fue del 90%⁶⁹.

El carcinoma epidermoide cutáneo suele mostrar un comportamiento indolente, por lo que menos de un 5% de éstos presentarán metástasis. En pacientes con CEC que han desarrollado adenopatías metastásicas, la supervivencia a los 2 años desciende al 60% con las técnicas de hoy en día (el tratamiento habitual es la resección tumoral con linfadenectomía y posterior radioterapia), con un 40% de recurrencias a los 2 años⁷⁰.

Según Burton y cols.⁷¹, mientras que el riesgo de recurrencia para la mayoría de CEC es del 2%, en el caso de CEC de alto riesgo (CECAR) se eleva hasta más del 20%. Además, el riesgo de adenopatías metastásicas en la mayoría de CEC es del 5% aproximadamente, mientras que en aquellos CECAR, es de más del 20% también.

En las últimas décadas, se han investigado factores pronósticos que complementen la clasificación TNM del CEC, con el objetivo de conseguir una mejor clasificación del riesgo respecto a supervivencia y recurrencia tumoral.

El factor de riesgo con mayor asociación con la mortalidad específica por enfermedad es el diámetro tumoral > 2 cm, duplicando el riesgo de recidiva local y triplicando el riesgo de metástasis, en comparación con lesiones de menor tamaño⁷².

Existe una importante correlación entre el espesor tumoral y la tasa de metástasis, de manera que, en tumores con más de 6 mm de profundidad, esta tasa alcanza el 16%⁷³. Además, en tumores con más de 2 mm de Breslow se ha reportado un aumento de diez veces del riesgo de recurrencia local⁶⁶.

La invasión perineural de nervios con diámetro mayor a 0.1 mm se asocia a un aumento de metástasis en ganglios linfáticos y a un aumento del riesgo de recidiva local y de mortalidad⁶⁶.

La diferenciación histológica de las células tumorales también tiene un importante papel en el pronóstico, de manera que en el estudio de Brantsch *et al.*⁷³ se identificó un riesgo de recidiva local más del triple (7% vs 2%) y un riesgo metastásico del doble (7% vs

INTRODUCCIÓN

3%) en CEC pobremente diferenciado, en comparación con CEC bien diferenciado. Eversman *et al.*⁷⁴ reportaron que el moderado grado de diferenciación también supone un factor de riesgo de mal pronóstico.

Eigentler *et al.*⁴⁹ demostraron que el espesor tumoral, la desmoplasia y la inmunosupresión también son factores de riesgo para mortalidad por CEC.

Según Varra *et al.*⁷⁰ la inmunosupresión y la extensión extracapsular son los factores más importantes en la supervivencia.

Otros factores identificados que aumentan el riesgo de recidiva local y de metástasis son la localización tumoral (labios, zona genital y pabellones auriculares), la aparición del CEC sobre una cicatriz previa y que se trate de un CEC recidivado⁷⁵. Todos estos factores de riesgo están resumidos en la Tabla 3.

Espesor tumoral mayor de 2 mm.
Diámetro mayor de 2 cm.
Localización: pabellón auricular, labios, mucosas.
Origen en una cicatriz
Características histológicas: mal diferenciado, acantolítico, origen en enfermedad de Bowen
Inmunodepresión

Tabla 3. Factores de riesgo para metástasis en CEC invasivo. Tabla extraída de Cuarta Edición, *Dermatología, Bologna*³⁷.

Según las guías NCCN⁷⁶, aquellos CEC localizados en cabeza y cuello tienen mayor riesgo de recurrencia que aquellos localizados en tronco y extremidades. Asimismo, estratifican todas las posibles áreas de aparición de CEC según el riesgo:

- Área H (de alto riesgo): zona de la “máscara” de la cara, compuesta por zona central, cejas, párpados, nariz, labios, barbilla, mandíbula, preauricular y postauricular, orejas. También incluye genitales, manos y pies.
- Área M (de moderado riesgo): mejillas, frente, cuero cabelludo, cuello, pretibial.
- Área L (de bajo riesgo): tronco y extremidades, excluyendo manos, uñas, pretibial y pies.

INTRODUCCIÓN

Esta guía también incluye como factor de riesgo la presencia de un proceso inflamatorio previo en la zona, cicatrices crónicas, o bien haber recibido RT previa sobre la misma.

Asimismo, considera como factor de mal pronóstico un rápido crecimiento tumoral.

La guía de práctica clínica incluye también las variantes histológicas acantolítica (adenoide), adenoescamosa y metaplásica como factores de riesgo independientes, a pesar de que son variantes raras, por lo que no existe mucha evidencia en la literatura de su valor pronóstico.

Los síntomas neurológicos también son considerados como factores de mal pronóstico, ya que son indicativos de invasión perineural. Además, esta guía tiene en cuenta la invasión linfática y vascular, más allá de la perineural.

Todos los factores de riesgo que se recogen en las guías NCCN están expresados en la tabla 4.

	Low Risk	High Risk
H&P Location/size ¹	Area L <20 mm Area M <10 mm ⁴	Area L ≥20 mm Area M ≥10 mm Area H ⁵
Borders Primary vs. recurrent Immunosuppression Site of prior RT or chronic inflammatory process Rapidly growing tumor Neurologic symptoms	Well-defined Primary (-) (-) (-) (-)	Poorly defined Recurrent (+) (+) (+) (+)
Pathology (See SCC-A) Degree of differentiation Acantholytic (adenoid), adenosquamous (showing mucin production), desmoplastic, or metaplastic (carcinosarcomatous) subtypes Depth ^{2,3} : Thickness or level of invasion Perineural, lymphatic, or vascular involvement	Well or moderately differentiated (-) ≤6 mm and no invasion beyond subcutaneous fat (-)	Poorly differentiated (+) >6 mm or invasion beyond subcutaneous fat (+)

Tabla 4. Factores de riesgo para recurrencia local o metástasis, según las guías NCCN.⁷⁶

Faberg *et al.*⁷⁷ propusieron una integración en las guías NCCN de los diferentes perfiles genéticos para pacientes con CEC de alto riesgo, utilizando un test de perfil de expresión de 40 genes validado. Asimismo, identificaron que más de la mitad de la cohorte definida como alto riesgo según la guía NCCN, realmente tenía bajo riesgo de metástasis, pues presentaba tasas de metástasis similares a las de los casos de bajo riesgo clinicopatológicos. Esto sugiere que este subgrupo podría manejarse clínicamente

INTRODUCCIÓN

en el extremo inferior dentro de las directrices de la NCCN para pacientes de alto riesgo. El test que utilizaron para evaluar el perfil de expresión de 40 genes fue validado por Wysong *et al.*⁷⁸ previamente. En el estudio se encontró que la determinación del perfil de expresión de estos 40 genes podría ser una herramienta complementaria para clasificar a los pacientes en función del riesgo de desarrollo de metástasis. En la Tabla 5 están representados los genes que se evaluaron.

GENE ID	GENE NAME	SOURCE
ACSBG1	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase ACSBG1	1
ALOX12	Arachidonate 12-Lipoxygenase, 12S Type	1
APOBEC3G	Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme Catalytic Subunit 3G	1
ATP6V0E2	ATPase H+ Transporting V0 Subunit E2	1
BBC3	Bcl-2-binding component 3	2
BHLHB9	Basic Helix-Loop-Helix Family Member B9	8
CEP76	Centrosomal protein of 76 kDa	1
DUXAP9	Double Homeobox A Pseudogene 9	8
GTPBP2	GTP Binding Protein 2	8
HDHC3	Guanosine-3',5'-bis(diphosphate) 3'-pyrophosphohydrolase MESH1	8
ID2	Inhibitor Of DNA Binding 2	3
LCE2B	Late Cornified Envelope 2B	1
LIME1	Lck Interacting Transmembrane Adaptor 1	8
LOC100287896	Uncharacterized LOC100287896	8
LOC101927502	Uncharacterized LOC101927502	8
MMP10	Matrix Metalloproteinase 10 (Stromelysin 2)	1, 4, 5
MRC1	Mannose Receptor C-Type 1	6, 7
MSANTD4	Myb/SANT DNA Binding Domain Containing 4 With Coiled-Coils	8
NFASC	Neurofascin	1
NFIC	Nuclear Factor I C	8
PDPN	Podoplanin	1
PI3	Peptidase Inhibitor 3	1, 4
PLS3	Plastin 3	8
RCHY1	Ring Finger And CHY Zinc Finger Domain Containing 1	2
RNF135	Ring Finger Protein 135	8
RPP38	Ribonuclease P/MRP Subunit P38	8
RUNX3	Runt-Related Transcription Factor 3	8
SLC1A3	Solute Carrier Family 1 Member 3	8
SPP1	Osteopontin	1
TAF6L	TATA-Box Binding Protein Associated Factor 6 Like	8
TFAP2B	Transcription Factor AP-2 Beta	1
ZNF48	Zinc Finger Protein 48	8
ZNF496	Zinc Finger Protein 496	8
ZNF839	Zinc Finger Protein 839	8

Tabla 5. Genes estudiados por Faberg y colaboradores⁷⁷.

En el metaanálisis de Mulvaney y cols.⁷⁹ se evaluó el patrón de expresión molecular asociado con metástasis en CEC. Se hallaron diferencias estadísticamente significativas para CEC metastásicos y no metastásicos en cuanto a PDL1 (OR: 2.31), EGFR (OR:2.57) y Podoplanina (OR: 2.33). A parte de todos los factores de riesgo previamente mencionados, existen otros muchos que se están investigando, como aquellos relacionados con el tejido circundante al tumor y el microambiente tumoral.

INTRODUCCIÓN

1.6.g Tratamiento

a. Tratamiento de pacientes con enfermedad local

En función de si se trata de CEC de bajo riesgo o de alto riesgo, las guías NCCN⁷⁶ establecen un tratamiento u otro, siempre para individuos con enfermedad local:

Para pacientes con CEC de bajo riesgo:

- Extirpación local con un margen de 4-6 mm.
 - Si el margen es positivo: cirugía de Mohs, re-extirpación local con control posterior de márgenes o bien RT si no es candidato a cirugía.
 - Si el margen es negativo: seguimiento.
- RT para aquellos pacientes no candidatos a tratamiento quirúrgico.

Para pacientes con CEC de alto riesgo:

- Cirugía micrográfica de Mohs.
 - Si el margen es positivo: reextirpación, RT +/- tratamiento sistémico o bien tratamiento sistémico si la RT no puede ser curativa.
 - Si el margen es negativo: RT adyuvante en caso de que exista invasión perineural significativa.
- Extirpación quirúrgica habitual con márgenes más amplios (10 mm):
 - Si el margen es positivo: cirugía micrográfica de Mohs o reextirpación quirúrgica habitual sino se dispone de la técnica previa.
 - Si el margen es negativo: RT adyuvante en caso de que exista invasión perineural significativa.
- En caso de no ser candidato a tratamiento quirúrgico:
 - RT +/- tratamiento sistémico.

INTRODUCCIÓN

- Tratamiento sistémico en aquellos pacientes que no sean candidatos a RT curativa.

No obstante, según un estudio realizado por Lansbury⁸⁰ el margen más adecuado para la extirpación quirúrgica del CEC es de 4 mm independientemente del estadiación del mismo.

b. Tratamiento de pacientes con adenopatías metastásicas

La afectación ganglionar empeora drásticamente el pronóstico de aquellos individuos con CEC y además, suele asociarse a otros factores de mal pronóstico. El manejo terapéutico de éstos es diferente y depende del tamaño de las adenopatías:

- Adenopatía solitaria menor o igual a 3 cm:
 - Excisión del tumor primario y disección selectiva ganglionar ipsilateral.
- Adenopatía solitaria mayor a 3 cm o múltiples adenopatías ipsilaterales:
 - Excisión del tumor primario y disección radical ganglionar ipsilateral.
- Adenopatías con afectación bilateral:
 - Excisión del tumor primario y disección radical ganglionar bilateral.
- Afectación parotídea:
 - Excisión del tumor primario y disección radical ganglionar ipsilateral, junto con parotidectomía.

Posteriormente, dependiendo del resultado histológico de la extirpación ganglionar, varía la actitud terapéutica:

- 1 adenopatía menor o igual a 3 cm sin extensión extracapsular:
 - RT
 - Observación

INTRODUCCIÓN

- 2 adenopatías menores o iguales a 3 cm o bien una mayor a 3 cm, sin extensión extracapsular:
 - RT
- Cualquier número de adenopatías, con extensión extracapsular:
 - RT +/- tratamiento sistémico
- Resección ganglionar incompleta:
 - RT +/- tratamiento sistémico

c. Tratamiento de CEC in situ

En pacientes con CEC in situ (enfermedad de Bowen), a parte de la cirugía, también se deben considerar otros tratamientos, como el 5-FU, imiquimod, TFD o crioterapia vigorosa. Aunque estos pueden tener menor eficacia curativa que la resección quirúrgica con márgenes libres.

En definitiva, los principios fundamentales del tratamiento según Guías de Práctica Clínica de la NCCN para el CEC, en su última actualización del año 2020⁷⁶ son:

- Siempre debe contarse con una biopsia cutánea previa al tratamiento del paciente para definir si se trata de un CEC de alto riesgo.
- El objetivo principal es la extirpación completa de la lesión.
- El tratamiento quirúrgico es el más efectivo para la curación, pudiendo respaldarse en la radioterapia adyuvante en casos de CEC de alto riesgo.

d. Tratamiento con Radioterapia para CEC

A pesar de que la cirugía sea el tratamiento de elección en pacientes con CEC, existen algunos factores que pueden convertir a la RT en tratamiento inicial, como aquellos pacientes con CEC in situ que tienen múltiples lesiones, o bien aquellos con CEC invasor que rechazan el tratamiento quirúrgico⁷⁶.

INTRODUCCIÓN

Se reserva habitualmente para pacientes mayores de 60 años debido a sus posibles secuelas a largo plazo y a la aparición de neoplasias malignas secundarias⁸¹. Asimismo, puede producir fibrosis cutánea, telangiectasias, alteraciones de la pigmentación o incluso aparición de úlceras crónicas en la zona receptora.

En un metaanálisis se estableció que la recurrencia a los 5 años tras RT de CEC primarios y recurrentes fue del 6.7% y del 10%, respectivamente⁸². Según Cognetta *et al.*⁸³, las tasas de curación varían del 0 al 10.5% en pacientes con CEC *in situ* tratados con RT como terapia inicial, con unas tasas de control local cercanas al 100%.

El papel adyuvante de la RT en pacientes intervenidos por CEC no está respaldado por ensayos clínicos prospectivos, por lo que es un tema de controversia importante. Las guías NCCN la recomiendan para cualquier CEC con evidencia de invasión perineural significativa y para CEC con márgenes positivos tras la resección quirúrgica. Los datos que apoyan este manejo están basados en estudios retrospectivos con poblaciones heterogéneas, que sugieren que esta estrategia terapéutica mejora el control local de la enfermedad y el tiempo libre de enfermedad, sin afectar al tiempo de supervivencia⁷⁶.

e. Tratamiento sistémico del CEC

En lo que respecta al tratamiento sistémico, existen diferentes opciones terapéuticas:

- Tratamientos citotóxicos:

Los más utilizados son carboplatino, cisplatino y 5-FU, en monoterapia o bien en combinación.

- Terapias dirigidas:

Las terapias dirigidas frente a moléculas específicas y la inmunoterapia han surgido recientemente como abordajes prometedores del tratamiento del CEC y de otras neoplasias malignas. Si bien es cierto que muchas de estas nuevas terapias han demostrado eficacia clínica, la tasa de supervivencia de los pacientes ha aumentado en menor proporción⁸⁴. Esto es así debido a que la mayoría de tumores desarrollan mecanismos de tolerancia frente a terapias tradicionales o dirigidas. Esta resistencia tumoral al tratamiento es una limitación muy importante en el tratamiento oncológico.

INTRODUCCIÓN

Se cree que se debe a un complejo mecanismo que ocurre en el microambiente tumoral⁸⁵.

Las terapias dirigidas más destacadas son los inhibidores de EGFR. Fueron una de las primeras terapias evaluadas para tratar el CEC. La terapia dirigida contra el EGFR inhibe la transducción de las vías PI3K/AKT/mTOR y RAS/RAF/ERK⁸⁶. Existen dos tipos de inhibidores de EGFR: Ac monoclonales que bloquean el dominio extracelular del receptor (cetuximab, panitumumab...) e inhibidores de la tirosin-kinasa (gefitinib, erlotinib...), que son moléculas de menor tamaño¹.

Cetuximab está aprobado por la FDA para pacientes con cáncer colorrectal y de cabeza y cuello, mostrando eficacia clínica como tratamiento de primera línea en pacientes con CEC irreseccable⁸⁷, con una tasa de control del 69% y una tasa de respuestas del 28% a las seis semanas, con un 6% de remisiones completas y un 22% de remisiones parciales.

La eficacia de los inhibidores del EGFR fue algo menor de lo esperado, por lo que se cree que una mejor selección de los pacientes podría optimizar estos resultados. Debe tenerse en cuenta que estas terapias dirigidas, que inhiben las vías de señalización que contribuyen a la progresión del CEC, alteran la homeostasis cutánea y pueden producir efectos secundarios en ésta con frecuencia¹.

- Inmunoterapia:

Cualquier tumor se compone de las células neoplásicas y del microambiente tumoral, que a su vez está constituido por el estroma tumoral y por el infiltrado inflamatorio. Este microambiente se puede modular para destruir a las células neoplásicas.

Las células tumorales producen neoantígenos que son reconocidos y atacados por el sistema inmunitario. Cuando una célula T reconoce el antígeno expresado por el antígeno leucocitario humano (HLA) de la célula tumoral, los co-receptores actúan como activadores e inhibidores de la respuesta inmunitaria^{1,88}.

Los co-receptores inhibidores, tales como programmed cell death 1 protein (PD-1) y Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA4) juegan un papel fundamental en la inmunoterapia.

PD-1 receptor expresado en la superficie de células T, B, monocitos células NK y dendríticas. Es capaz de unirse a dos ligandos (PD-L1 y PD-L2) que se encuentran en la

INTRODUCCIÓN

superficie de la célula tumoral, de manera que su interacción induce tolerancia inmunitaria mediante anergia y apoptosis de las células T¹.

Los anticuerpos monoclonales anti PD-1 se han utilizado previamente en pacientes con melanoma. Debido a la escasa respuesta del CEC a otras terapias, también se ha empezado a utilizar en estos pacientes, con buenas respuestas. Esto es así porque el CEC es el tipo de tumor que mayor carga mutacional presenta de todos, convirtiéndose en un buen candidato para la inmunoterapia⁵⁴.

Cemiplimab es el primer medicamento aprobado por la FDA y la EMA para el tratamiento de CEC localmente avanzado y metastásico. Este anti PD-1 ha demostrado eficacia en ensayos clínicos fase II con tasas de respuesta del 46.4%⁸⁹.

Pembrolizumab también es un Ac monoclonal anti PD-1, que fue estudiado en un ensayo clínico en fase II con 105 pacientes que presentaban CEC metastásico (NCT03284424). Pembrolizumab demostró una actividad antitumoral eficaz, con una tasa de respuesta del 34.3% y una tasa de control de enfermedad del 52.4%.

Nivolumab, otro inhibidor de PD-1, fue también estudiado en un ensayo clínico de fase II en 24 pacientes con CEC avanzado o metastásico en monoterapia (NCT03834233), con una tasa de respuesta global del 54.5% y una tasa de control de enfermedad del 77%. Asimismo, existen reportes de casos que demuestran su eficacia clínica⁹⁰.

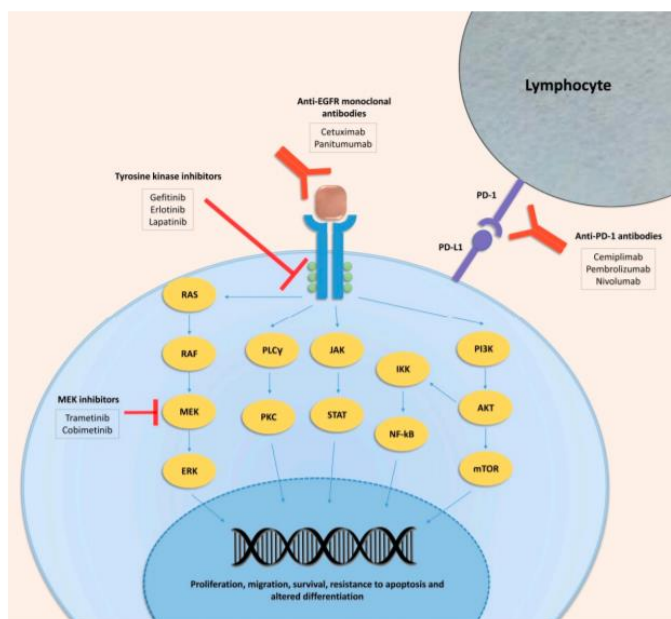


Figura 13. Representación esquemática realizada por Corchado y colaboradores¹, que muestra las diferentes terapias dirigidas disponibles en la actualidad¹.

INTRODUCCIÓN

Existen resistencias a agentes inmunoterápicos desde el inicio del tratamiento y otras adquiridas con el tiempo. Blank y cols.² describen las interacciones entre células tumorales y sistema inmunitario, construyendo un inmunograma del cáncer, para intentar adaptar la inmunoterapia a cada paciente de manera individual y para orientar la búsqueda de biomarcadores de respuesta a tratamiento. El inmunograma está formado por siete factores. Este algoritmo asume que la célula T es la principal efectora contra las células tumorales. También tiene como fundamento que la respuesta inmunitaria contra células tumorales depende de la inmunogenicidad de estas por una parte y de los mecanismos inhibitorios de las células T, por otra parte. De este modo, estos dos parámetros pueden variar ampliamente entre pacientes.

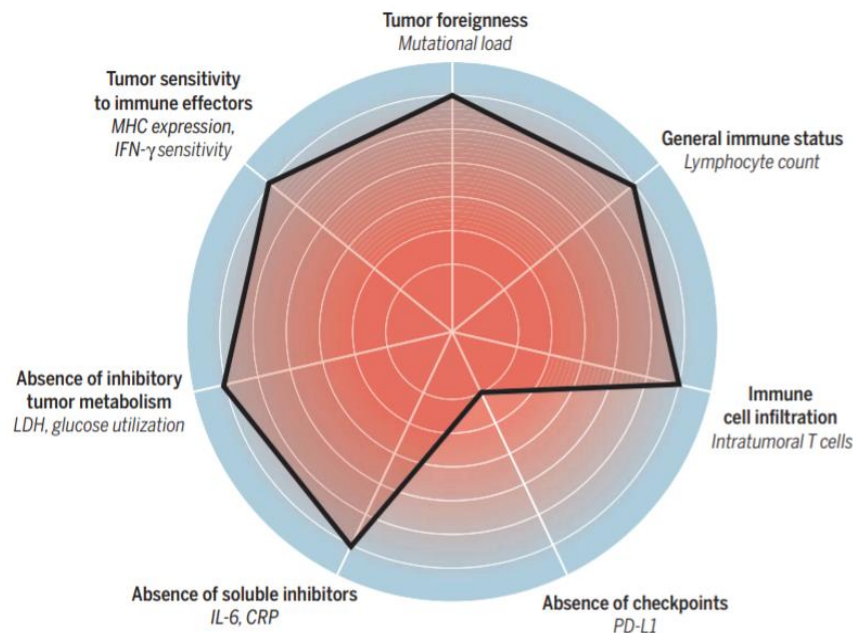


Figura 14. Inmunograma, con sus siete parámetros principales. Imagen extraída de “The cancer immunogram” de Blank y cols².

Los parámetros que incluye el inmunograma son los siguientes:

- Inmunogenicidad del tumor: está determinada en gran parte por su capacidad de expresión de neoantígenos. Se ha visto en algunos estudios una correlación entre la carga mutacional (como marcador subrogado de presencia de neoantígenos) con la

INTRODUCCIÓN

respuesta a inmunoterapia⁹¹. Si bien se necesitan más marcadores de inmunogenicidad tumoral.

- Estado inmunitario general del paciente: el marcador que se ha tomado como representativo es el recuento de linfocitos. Un descenso en este, se asocia con una disminución de la respuesta al bloqueo de CTLA4 en melanoma².
- Infiltrado tumoral asociado al tumor: la ausencia de infiltrado tumoral (en este caso, células T, con marcador CD8+) en el tumor se puede asociar a peor pronóstico. De este modo, puede reflejar una disminución de la inmunogenicidad del tumor o bien una incapacidad de atraer células T al lecho tumoral².
- Sensibilidad del tumor a la respuesta inmunitaria: Zaretsky y cols.⁹² Comprobaron que la pérdida del CMH y la resistencia a IFN gamma son mecanismos de resistencia adquirida a inmunoterapia.
- Ausencia de puntos control o “checkpoints”: la presencia de checkpoints como PD-L1 o CTLA-4 se asocia a mejor pronóstico ya que son dianas terapéuticas para inmunoterapia⁹³.
- Ausencia de inhibidores del metabolismo del tumor: en condiciones normales, la hipoxia mantenida desencadena la conversión de piruvato a lactato mediante la LDH. En caso de células neoplásicas, aún sin hipoxia ocurre esta conversión, de manera que la LDH se ha establecido como un biomarcador de agresividad tumoral⁹⁴.

f. Biopsia selectiva de ganglio centinela

La técnica de biopsia selectiva del ganglio centinela (BSGC) no está por el momento incluida en los protocolos terapéuticos ni diagnósticos ya que no ha reportado beneficios significativos. Según la guía Europea⁴⁸, existe evidencia limitada de que los pacientes con BSGC + tengan peor pronóstico que aquellos que no la tienen. Además, tampoco hay evidencia de calidad que indique que la disección radical ganglionar junto con RT en el lecho ganglionar tras una BSGC + mejore la supervivencia. La media de tasa de positividad de la BSGC en CEC es del 14%.

INTRODUCCIÓN

1.7 Marcadores inmunohistoquímicos

1.7.a CD8

Las células CD8⁺ constituyen un elemento fundamental de la respuesta inmunitaria adaptativa, que contribuye al aclaramiento de patógenos intracelulares a través de la destrucción de aquellas células infectadas/tumorales y de la producción de citoquinas como el IFN- γ y el TNF alfa. Esta función la realizan la subpoblación de linfocitos T CD8 más estudiados, que son los linfocitos Tc1. Estudios recientes postulan que el resto de funciones que efectúan los linfocitos T (en el contexto de alergia, autoinmunidad o neoplasias) son mediadas por otros subtipos de linfocitos T CD8⁹⁵.

Los linfocitos T CD8 vírgenes se activan a través del reconocimiento de los péptidos específicos presentados por el CMH tipo I por parte de las células presentadoras de antígenos (CPA) en los ganglios linfáticos periféricos. A continuación, las células CD8 experimentan un proceso de diferenciación y de expansión masiva, generando una gran cantidad de células efectoras, capaces de migrar a tejidos periféricos. Al final de esta respuesta primaria, la mayoría de linfocitos CD8 sufren apoptosis, pero algunos permanecerán como células T memoria⁹⁵.

Los linfocitos infiltrantes en tejido tumoral se han asociado a mayor supervivencia en diferentes tipos tumorales así como a mayor respuesta a inmunoterapia. No obstante, se desconoce el motivo por el cual algunos tumores tienen una elevada carga de CD8 y otros no. El estudio de Jansen y cols.⁹⁶ evaluó cuáles eran los requerimientos para que un tumor mantuviera una respuesta T CD8 contra las células neoplásicas. Encontraron que existen diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD8 en el microambiente tumoral, desde poblaciones similares a células madre a otras terminalmente diferenciadas. Describieron que las células CD8 similares a células madre (que son positivas para el marcador TCF1) dan lugar a aquellas terminalmente diferenciadas, con acciones efectoras. Para que un tumor tenga gran cantidad de células CD8⁺ es esencial que este proceso de diferenciación ocurra. De hecho, demostraron que aquellos tumores sin infiltración de células CD8 similares a células madre (llamado nicho inmunitario) no tienen una invasión importante de células CD8. Proponen que un mecanismo clave para el escape a la inmunoterapia sea la ausencia de estos nichos inmunitarios.

INTRODUCCIÓN

1.7.b CD57

CD57 es un marcador que originalmente se utilizó como identificador de células NK. Actualmente se utiliza de rutina para identificar aquellas células terminalmente diferenciadas o senescentes, con menor capacidad proliferativa. Es decir, la expresión de CD57 en los linfocitos indica una incapacidad para proliferar. No obstante, estas células sí presentan un elevado potencial citotóxico. En diversas ocasiones se han tratado de correlacionar los niveles de infiltración tumoral con células CD57 positivas con el pronóstico de algunos tumores⁹⁷.

Este marcador se encuentra tanto en linfocitos T CD8 como en linfocitos T CD4, en estadios tardíos de diferenciación, con escasa capacidad proliferativa. Es de sobra conocido que con el envejecimiento y la activación inmunitaria crónica se produce un aumento de células CD57 positivas. Los linfocitos CD8 + CD57 + presentan telómeros más cortos que aquellos CD8+ CD57-. No obstante, hay que tener en cuenta que estas células, a pesar de ser replicativamente senescentes, no están exhaustas funcionalmente, ya que ambos mecanismos se regulan de manera independiente. Las células exhaustas normalmente son aquellas que pierden su función debido a la estimulación antigénica repetida, que es independiente de la expresión de CD57⁹⁷.

El riesgo de padecer cáncer aumenta con la edad y se cree que se asocia con el déficit de inmunidad antitumoral. De hecho, se ha evaluado en muchas ocasiones el fenotipo y función de las células T CD8 en sangre y en tejido tumoral, con el objetivo de predecir si se asocia con el pronóstico del paciente⁹⁷.

Van den Hove y cols.⁹⁸ observaron que en pacientes con neoplasias hematológicas la actividad citotóxica de los linfocitos CD8 y CD4 era prácticamente llevada a cabo de manera exclusiva por parte del subtipo CD57 positivo. A pesar de la aparente preservación de funciones efectoras, estas células CD57 positivas parecían incapaces de inhibir el crecimiento de las células tumorales y podían incluso disminuir las respuestas antitumorales inmunitarias contra antígenos asociados a tumores, quizás al competir por nutrientes o citoquinas.

INTRODUCCIÓN

1.7.c CD163

CD163 es una proteína transmembrana de 130 kDa con una cola citoplasmática corta, un solo segmento transmembrana y una gran ectodominio que consta de nueve receptores de cisteína (SRCR). Se han descrito isoformas diferentes de receptor CD163 humano, que incluyen tres variantes con diferente longitud de la cola citoplasmática, siendo la forma de cola corta (42 aminoácidos) la más abundante⁹⁹.

Se trata de un receptor endocítico de alta afinidad del complejo hemoglobina-haptoglobina. También tiene afinidad, aunque menor, por la hemoglobina sola. Es fundamentalmente marcador de macrófagos. Estas células tienen un papel clave en la tumorigénesis, con un fenotipo pleiotrópico. Es decir, pueden actuar tanto con un fenotipo protumoral como antitumoral, encontrándose en el microambiente tumoral.

Dependiendo del microambiente en que se encuentren, los macrófagos pueden diferenciarse en diferentes perfiles¹⁰⁰. Mills y cols.¹⁰⁰ introdujeron este concepto, de manera que describieron los macrófagos M1 con un perfil proinflamatorio, y los macrófagos M2, con un perfil antiinflamatorio. No obstante, estudios posteriores han sugerido que existen formas intermedias entre ambos extremos¹⁰¹.

El macrófago CD163 positivo puede originarse a partir de la extravasación de monocitos o puede aparecer a partir de la transformación de macrófagos proinflamatorios M1 ya presentes. Es decir, la expresión regulada al alza de este receptor es uno de los principales cambios en la transición de macrófagos a otros fenotipos⁹⁹.

Los subtipos de macrófagos que habitualmente tienen un perfil antiinflamatorio se clasifican en los diferentes estudios por presentar los marcadores de superficie CD68, CD163, CD204 y/o CD206¹⁰¹.

INTRODUCCIÓN

1.7.d FOXP3

FOXP3 es un miembro de la familia de factores de transcripción forkhead. Se trata de uno de los miembros de receptores de la familia FOX más estudiados, definido por un dominio de unión común, llamado la caja forkhead.

A diferencia de otros miembros de esta familia, se expresa principalmente en un subconjunto de células T CD4 + que desempeñan un papel supresor en el sistema inmunitaria. Una de las principales funciones de FOXP3 es suprimir la acción de NFAT y NFKB, lo cual conduce a la supresión de la expresión de muchos genes, incluyendo IL-2 y citoquinas de células T efectoras. FOXP3 actúa también como un activador de la transcripción para muchos genes, incluido CD25 y CTLA4¹⁰².

Las células T FOXP3 + se producen en el timo y posteriormente migran a los tejidos linfoides secundarios, suprimiendo la presentación antigénica de los linfocitos. Tienen un papel fundamental en la supresión de las primeras respuestas inmunitarias en los tejidos linfoides. De este modo, las células T FOXP3 + memoria son necesarias para el mantenimiento eficaz de la tolerancia y la prevención de enfermedades autoinmunitarias.

FOXP3 se expresa en linfocitos T reguladores CD4+CD25+ y es necesario para su desarrollo¹⁰³. Se trata, por tanto, de una molécula intracelular clave para el desarrollo y la función de TRegs y se considera su marcador más específico hasta ahora. En condiciones normales, Los linfocitos TRegs FOXP3 + son supresores esenciales de las respuestas antitumorales y, por lo tanto, mantienen la tolerancia inmunológica a los tejidos del huésped. Sería por tanto esperable, que una alta infiltración de FOXP3 + TRegs esté asociada con una resultado desfavorable¹⁰².

Múltiples estudios han evaluado el papel del infiltrado rico en células FOXP3 en el pronóstico de diversos tumores. El metaanálisis de Chang *et al.*¹⁰² evaluó su papel pronóstico para diversos tipos tumorales. Encontraron que la mayor infiltración de FOXP3 + Tregs tuvo globalmente un efecto negativo en la supervivencia (OR 1,46, P <0,001), pero el efecto pronóstico varió mucho según el sitio del tumor. La infiltración alta de FOXP3 + Tregs se asoció significativamente con una menor supervivencia en la mayoría de los tumores estudiados, incluidos los cánceres de cuello uterino, renales,

INTRODUCCIÓN

melanomas y de mama, mientras que se asociaron con una mayor supervivencia en los cánceres colorrectal, de cabeza-cuello y de esófago.

1.7.e CD25

La IL-2 es una citoquina clave en la activación y proliferación de las células inmunitarias¹⁰⁴. CD25 (también denominado IL2RA) forma parte del receptor de interleuquina 2 heterotrimérico de alta afinidad (IL2R) en las células T activadas. Su afinidad por la IL2 y la función celular están estrechamente relacionadas y varían en diferentes tipos de células¹⁰⁵.

La mayoría de los linfocitos T expresan niveles elevados de CD25¹⁰⁴.

También hay estudios que demuestran la presencia de este marcador en tejidos distintos de las células T activadas. Waldmann *et al.*¹⁰⁶ describieron su expresión en células B inmaduras activadas en cocultivo con células T en presencia de mitógeno de hierba carmín, un potente estimulante mitógeno. También se ha detectado en células natural killer activadas y células activadas de la serie monocito-macrófagica, incluyendo macrófagos pulmonares, células de Kupffer hepáticas y de Langerhans de la piel¹⁰⁷. Más tarde se descubrió que se expresaba constitutivamente en los mastocitos tisulares en pacientes con enfermedades inflamatorias y en aquellos sin patología demostrable¹⁰⁴.

La alta frecuencia de CD25 en la superficie de muchas células tumorales hematológicas es bien conocida y a parte de su importancia pronóstica, CD25 podría estar presente en las células madre leucémicas y permitir vías de señalización oncogénicas en éstas. Además, la alta expresión de CD25 en células inmunitarias circulantes activadas y TRegs es un factor que ya ha sido explotado por inmunoterapias de IL2 (basiliximab es anti IL-2) para el tratamiento de pacientes trasplantados y con enfermedades autoinmunitarias¹⁰⁴.

1.8 Microambiente tumoral

1.8.a Definición e implicaciones

Tal y como se ha indicado previamente, el CEC es una neoplasia con una elevada carga tumoral, superior a la del resto de tumores de estirpe epitelial y hasta cuatro veces superior en comparación al melanoma⁵⁴. Esta alta tasa mutacional se correlaciona con una mayor antigenicidad tumoral ya que se producen más neoantígenos. La antigenicidad del tumor es fundamental para estimular la respuesta inmune antitumoral.

En el CEC, por tanto, las poblaciones leucocitarias tienen un papel fundamental en la protección contra el desarrollo tumoral, y también intervienen en “esculpir” el tumor incipiente, a través de la pérdida de inmunogenicidad con la subsiguiente progresión tumoral¹⁰⁸. El conocimiento del papel de la inmunidad en el desarrollo tumoral ha ido evolucionando con el tiempo, de manera que se ha sustituido la idea de que las células premalignas u oncogénicas eran detectadas y eliminadas por los leucocitos por una idea más compleja llamada “inmunoedición”. Esto consiste en un proceso por el que la eliminación de células tumorales conlleva una selección positiva de aquellas clonas que han perdido la expresión de antígenos inmunogénicos, por lo que proliferan y forman un microambiente tumoral. De esta manera, el proceso de inmunoedición consta de tres fases:

- **Eliminación:** el sistema inmunitario destruye el tumor que se está desarrollando, antes de que sea clínicamente visible. Esta fase puede dar como resultado una eliminación completa de las células tumorales o bien pueden quedar algunas clonas tumorales que resisten la eliminación y entran en la fase de equilibrio.
- **Equilibrio:** la proliferación de las clonas que han sobrevivido previamente al no ser inmunogénicas está controlada por el sistema inmunitario. Ocurre también una edición de la inmunogenicidad del tumor, como consecuencia de una selección positiva por parte del sistema inmunitario.
- **Escape:** las células tumorales que han resistido son capaces de proliferar en un huésped inmunocompetente, a través de mecanismos como evasión inmunitaria, supresión inmunitaria o resistencia a la apoptosis¹⁰⁸. Estas células son capaces de proliferar y formarán el tumor clínicamente aparente. Ejemplos de escape

INTRODUCCIÓN

inmunitaria incluyen la pérdida de antígenos tumorales o la pérdida de capacidad de presentar los antígenos tumorales con el CMH tipo I¹⁰⁹.

El microambiente tumoral interviene de manera significativa en la carcinogénesis del CEC, por lo que en los últimos años se están realizando múltiples estudios en esta línea. Uno de los principales componentes del microambiente tumoral son las células inflamatorias, que pueden actuar como iniciadores y promotores tumorales¹¹⁰. Por otra parte, la ausencia de respuesta inflamatoria también puede llevar a la progresión tumoral¹¹¹. De esta manera, el microambiente tumoral tiene un importante papel tanto en la iniciación del cáncer, como en su progresión y en la respuesta a tratamientos.

1.7.b Componentes del microambiente tumoral

Los componentes tanto celulares como moleculares del microambiente tumoral están implicados en la invasión, metástasis y progresión tumoral, así como en la respuesta a inmunoterapia¹¹².

a. Componentes celulares

Estos componentes son fibroblastos asociados al tumor, macrófagos asociados al tumor, células de Langerhans, células mieloides supresoras, células Natural killer (NK) y diferentes variantes de células T como linfocitos CD4 y CD8, células T reguladoras (Treg) y células T naive-like¹¹³. En función de la presencia o ausencia de células T en el microambiente tumoral, podemos encontrar dos subtipos: rico en células T o con pocas células T¹¹⁴.

- a) Los macrófagos asociados al tumor son atraídos por diferentes citoquinas y quimioquinas¹¹⁵. Existen dos polarizaciones diferentes de los macrófagos asociados al tumor:
 - Los macrófagos M1 son inducidos básicamente por IFN-g y promueven un microambiente tumoral proinflamatorio, segregando diferentes citoquinas como la IL-1 y reclutando células T citotóxicas CD8+.

INTRODUCCIÓN

- Los macrófagos M2 tienen un perfil antiinflamatorio, reclutando células T reguladoras (CD4+, FOXP3+), las cuales segregan citoquinas antiinflamatorias como la IL-10¹¹⁵.
- b) Los neutrófilos también pueden favorecer o impedir la progresión de células tumorales, variando según su estado de diferenciación, que depende de la presencia de TGF- β .
- Neutrófilos tipo N1: El bloqueo de TGF- β aumenta las quimioquinas que atraen a este subtipo de neutrófilos, lo que resulta en una afluencia de neutrófilos asociados al tumor tipo CD11b+/Ly6G+. Estas son unas células hipersegmentadas, con mayor capacidad citotóxica contra las células tumorales y que expresan niveles más altos de citoquinas proinflamatorias, las cuales reclutan linfocitos T citotóxicos CD8+¹¹⁶.
 - Neutrófilos tipo N2: La presencia de TGF- β dentro del microambiente tumoral induce una población de neutrófilos con un fenotipo protumoral. El bloqueo de TGF- β es, por tanto, una diana terapéutica contra el CEC y otros tumores¹¹⁶.
- c) Los mastocitos son capaces de producir múltiples factores pro-angiogénicos como vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor, TGF- β y TNF- α . También pueden producir metaloproteasas de matriz como la MMP9, que está relacionada con la angiogénesis y el remodelado del estroma tumoral¹¹⁷.
- d) Células NK: son componentes del sistema inmunitaria innato, que equivalen a los linfocitos T citotóxicos del sistema inmunitaria adaptativo. Su principal diferencia es que los primeros no requieren del CMH tipo I para su activación. Además, las células NK juegan un papel importante en la inmunidad adaptativa, mediante la secreción de citoquinas y su interacción con las células dendríticas. Tienen, por tanto, una acción global antitumoral habitualmente¹¹⁸.

- e) También se reclutan en la zona tumoral otros subtipos de linfocitos T CD4+ helper, los cuales pueden tener efectos antiinflamatorios o proinflamatorios (son los linfocitos Th1, Th2 y Th17).
- f) La densidad de infiltración de células T CD3+ y CD8+ puede ser evaluada mediante técnicas inmunohistoquímicas y parece ser crucial para la respuesta inmunitaria antitumoral en diversos tipos tumorales, ya que los linfocitos T citotóxicos CD8+ serían las células clave efectoras que destruirían las células tumorales¹¹⁹.
- g) Los linfocitos T reguladores, que expresan tanto CD4 como FOXP3, están involucrados en la interacción tumor-hospedador mediante la supresión de la respuesta inmunitaria¹¹⁵. Inhiben la activación, proliferación y función efectora de múltiples tipos celulares, entre los que destacan los linfocitos T citotóxicos CD8+ y CD4+¹²⁰. No obstante, los linfocitos T reguladores también pueden ejercer una función contra la proliferación de las células tumorales, bajo diversas circunstancias, de manera que suprimen la inflamación promotora del tumor¹²¹.
- h) Los linfocitos B CD20+ se pueden dividir en varios subtipos según sus receptores de superficie (transicionales, inmaduros, de los centros germinales, de la zona marginal, etc).
- Destaca el papel en el microambiente tumoral de los linfocitos B reguladores, que mantienen la tolerancia inmunitaria y suprimen la respuesta inmunitaria contra las células tumorales, mediante la liberación de moléculas inhibitoras, como la IL-10 y el PD-L1¹²².
 - Otros subtipos de linfocitos B pueden actuar como células presentadoras de antígenos y producir señales estimuladoras hacia las células T citotóxicas, adquiriendo una función antitumoral¹²³. Su acción como células presentadoras de antígenos presenta ventajas respecto a las

INTRODUCCIÓN

células dendríticas, ya que es capaz de reconocer los Ag a pesar de existir una baja cantidad de los mismos¹²⁴.

b. Componentes no celulares

La interacción entre el tumor y el huésped no solo se ve influida por el tipo de infiltrado celular en el microambiente tumoral. También hay que tener en cuenta los mecanismos de escape, que permiten al tumor evadir el ataque del infiltrado inflamatorio. A parte de la ya conocida expresión de receptores de puntos de control inmunitaria como el PD-L1 y PD-L2, publicaciones recientes insisten en el papel fundamental de la transición epitelio-mesenquimal y del estroma tumoral como mecanismos fundamentales de escape tumoral¹¹⁵.

- a) Por su parte, el estroma tumoral previene el ataque de las células inflamatorias del microambiente tumoral frente a las células neoplásicas, al actuar como una barrera física.

- b) La transición epitelio-mesenquimal hace que las células neoplásicas pierdan o disminuyan la expresión de HLA en su membrana y de esta manera no son atacadas por las células inmunitarias¹¹⁹. Un patrón histológico característico de la transición epitelio-mesenquimal es la presencia de pequeños grupos de células tumorales separados, invadiendo. Esto se ve en tinciones habituales con H-E y se ha asociado a peor pronóstico en algunos tipos tumorales, como el CEC en mucosa oral¹¹⁵.

- c) Los fibroblastos asociados al tumor son diferentes a los fibroblastos de tejido sano. Según Erez *et al.*¹²⁵, las células tumorales pueden modular a los fibroblastos normales, induciéndolos a la expresión de genes proinflamatorios, con lo que reclutan macrófagos, estimulan la angiogénesis y liberan diferentes tipos de factores de crecimiento. Se cree que TGF- β 1/3 y su cascada de señalización son los responsables de que los precursores de los fibroblastos se diferencien hacia el subtipo de fibroblastos asociados al tumor¹²⁶. Se ha demostrado que los fibroblastos asociados al tumor poseen más de 500 genes

alterados, los cuales codifican para proteínas como IL-6, IL-8, o factor de crecimiento insulínico tipo 2 (IGF-2)¹²⁷. Los fibroblastos asociados al tumor también participan en la transición epitelial-mesenquimal de las células tumorales y contribuyen al mantenimiento de las células madre neoplásicas. En el estudio de Li *et al.*¹²⁸ se documentó que existe una comunicación bidireccional entre las células tumorales y los fibroblastos. Existen dos patrones de fibroblastos asociados al tumor, dependiendo de su distribución respecto al mismo¹¹⁸:

- Fibroblastos con un patrón en red: se disponen por todo el estroma tumoral.
- Fibroblastos con un patrón fusiforme: se localizan sobre todo en la periferia tumoral.

d) Las citoquinas producidas por las diferentes células inflamatorias son capaces de controlar la respuesta inmunitaria, favoreciendo una respuesta proinflamatoria o bien anti-inflamatoria¹¹⁰:

- Las principales citoquinas con actividad antitumoral (Tipo 1) se encuentran habitualmente disminuidas en el microambiente tumoral del CEC: IL-2, IL-12, IFN γ .
- Las principales citoquinas que promueven el crecimiento tumoral (Tipo 2) suelen estar elevadas en el microambiente tumoral del CEC: IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-22, IL-33.
 - La IL-6 generalmente se considera como una molécula proinflamatoria, pero su actividad es mucho más amplia. Tiene una actividad pleiotrópica y se encuentra elevada en suero de pacientes oncológicos, por lo que tiene un efecto sistémico en éstos. Sus niveles elevados en suero se asocian a cambios en el metabolismo del cáncer, influyendo sobre el metabolismo de los adipocitos, hepatocitos y células de músculo estriado¹²⁷. También puede producir efectos caquécticos relacionados con el cáncer, ya que cruza la barrera hematoencefálica (BHE), reduciendo el

apetito y produciendo síndromes depresivos¹²⁹. El efecto directo de la IL-6 sobre las células en el microambiente tumoral depende del tipo de receptor que active. Finalmente, la IL-6 interacciona muy estrechamente con la IL-8, junto con la que controla la actividad migratoria de las células cancerígenas¹²⁷.

- La IL-22 es segregada por diferentes tipos celulares, sobre todo los linfocitos T CD4+. Es capaz de estimular el crecimiento tumoral, la migración celular y la liberación de citoquinas proinflamatorias¹¹⁸.
 - La IL-33 es un miembro de la familia de las citoquinas tipo IL-1, que interviene como ligando para el receptor ST2L. La unión a su receptor induce la activación NF- κ B y de MAPK y la producción de IL-5 e IL-13 por las células Th2. También estimula a las células NK, a los linfocitos T CD8+¹³⁰. Su función durante la génesis tumoral permanece con bastante controversia.
- e) Asimismo, las alteraciones en la composición de la membrana basal y en la matriz extracelular son clave en la progresión del CEC. La presencia de estructuras microbianas y la afluencia de células inflamatorias promueven la secreción de proteasas, que a su vez regulan la disponibilidad de factores de crecimiento, citoquinas y quimioquinas y, por lo tanto, también son capaces de influir en el crecimiento e invasión del CEC¹³¹.
- Al inicio de la fase de progresión a CEC (fase de queratosis actínica), se pierde el colágeno XV y XVIII de la membrana basal subyacente a la lesión¹³². En la fase de progresión de CEC, por otra parte, aparece el colágeno XV y colágeno XVIII en el estroma tumoral, que no se encuentra en queratinocitos de piel normal ni de queratosis actínicas. Además, se ha demostrado que el colágeno VII regula la señalización del factor de crecimiento β (TGF- β) y suprime la vascularización en el CEC, disminuyendo la secreción de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)¹³¹. Esto puede desempeñar un papel importante en el desarrollo

de la CCSC en epidermólisis distrófica recesiva (RDEB), que carecen de colágeno VII¹³³.

- Las metaloproteasas de matriz son liberadas por las células tumorales, los fibroblastos del microambiente tumoral y otras células inflamatorias. Favorecen el crecimiento e invasión tumoral mediante el remodelado de la membrana basal¹³⁴. También regulan la actividad y disponibilidad de los factores de crecimiento, citoquinas y quimioquinas en el microambiente tumoral, por lo que pueden promover el desarrollo tumoral¹³⁵.
- Las serpinas son inhibidores de las serin-proteasas, que regulan la diferenciación de los queratinocitos¹³⁶ y la progresión de los tumores malignos¹³¹. También pueden ejercer funciones supresoras tumorales al inhibir la motilidad celular y la angiogénesis, así como al inducir la apoptosis¹³⁶.
- El sistema del complemento, que forma parte de la inmunidad innata, se ha considerado como un mecanismo de defensa contra las células neoplásicas. La activación del complemento genera moléculas proinflamatorias, como anafilotoxinas, que promueven la quimiotaxis de células inflamatorias. No obstante, el complemento también puede promover la proliferación y supervivencia de las células cancerígenas, aumentando su vascularización¹³⁷. Algunos componentes del complemento son serin-proteasas, que pueden regular la composición del microambiente tumoral y liberar metaloproteasas¹³⁸. Por otra parte, estas últimas también pueden inactivar otros componentes del complemento, protegiendo a las células tumorales de los efectos citotóxicos del complemento¹³⁹.

1.8 Papel pronóstico de los componentes de la inmunidad innata

1.8.a Macrófagos asociados al tumor tipo M2 y CD163

Los macrófagos son una de las poblaciones celulares más frecuentes en el infiltrado tumoral leucocitario. Modelos animales e in vitro han mostrado que los macrófagos erradican varias líneas tumorales¹⁴⁰. Sin embargo, en algunas estirpes tumorales se ha asociado la presencia de mayor infiltrado macrofágico tumoral con peor pronóstico¹¹³. Esta paradoja podría explicarse por el hecho de que los macrófagos infiltrantes tumorales son influidos por las señales paracrinas inducidas por TGF- β , IFN- γ y TNF- α . Tal y como se ha señalado previamente, pueden diferenciarse según la exposición a estos factores en dos fenotipos: M2 con un perfil inmunosupresor protumoral y M1 con un perfil fagocítico antitumoral. La polarización hacia tipo M2 ocurre ante la presencia de citoquinas como TGF β e IL-4, IL-10, IL-13. La polarización hacia M1 está guiada fundamentalmente por el IFN- γ ¹⁴¹.

CD163 es un marcador inmunohistoquímico (IHQ) de macrófagos tipo M2, es decir, de aquellos macrófagos que tienen un perfil inmunosupresor y promueven el desarrollo tumoral. Se trata de un miembro de la familia de los receptores scavenger ricos en cisteína (SRCR) y expresado exclusivamente en células del linaje monocítico.

Los macrófagos tipo M2 liberan factores de crecimiento como VEGF, factor de crecimiento plaquetario (PDGF), TGF β y factor de crecimiento fibroblástico. De esta manera promueven la angiogénesis, el desarrollo de las células tumorales y favorecen la futura metastatización¹⁴².

Su papel en el pronóstico del CEC ha sido estudiado por diferentes autores.

En el metaanálisis realizado por Troiano *et al.*¹⁴³ se observó que una mayor expresión de células CD163+ entre las células del microambiente tumoral (solo en el estroma tumoral, no en el centro del tumor) de CEC de cabeza y cuello (laringe, hipofaringe y cavidad oral) se correlacionaba con una menor tasa de supervivencia, aumentando el riesgo de mortalidad 2.26 veces. Sin embargo, no se asoció con un mayor riesgo de metástasis ni con el estadio tumoral.

INTRODUCCIÓN

Yamagata *et al.*¹⁴⁴ sí encontraron que la presencia de células CD163+ en el estroma tumoral se asociaba con la aparición de metástasis ganglionares en pacientes con CEC oral.

En otro estudio llevado a cabo en pacientes con CE oral también se reportó una menor tasa de supervivencia global en pacientes con mayor expresión de células CD163+ en el microambiente tumoral¹⁴⁵.

A nivel de CEC se ha estudiado también el marcador CD163. En un estudio realizado 2011 se observó que este marcador celular se expresaba más en CEC que en piel normal, pero no se evaluó su valor pronóstico¹⁴⁶.

Por todo esto, el marcador CD163 se postula como una nueva diana terapéutica en CEC. Se ha visto en un reciente estudio *in vitro* que el bloqueo de esta molécula a través de ácido corosólico induce una diferenciación de todos los macrófagos hacia el perfil fenotípico M1, con una acción antitumoral¹⁴⁷.

El papel de los macrófagos M2 en el queratoacantoma también se ha estudiado en otro trabajo, que comparó la expresión de CD163 en el microambiente tumoral entre queratoacantoma y CEC, con mayor expresión de este marcador en CEC que en el primero¹⁴⁸.

Existen escasos estudios que evalúen el rol de los macrófagos en el desarrollo de las queratosis actínicas. Heise *et al.*¹⁰, partiendo de la hipótesis de que el factor inhibidor de migración de macrófagos (MIF) tenía un papel fundamental en la patogenia del CEC, comprobaron, mediante tinciones IHQ, la mayor presencia de este factor en queratosis actínicas y en CEC, en comparación con piel normal.

En otros tipos de cáncer cutáneo, como el melanoma, también se han reportado implicaciones pronósticas de este marcador con una asociación del mismo con un peor pronóstico (una menor supervivencia global y un estadio más avanzado)¹⁴⁹.

INTRODUCCIÓN

1.8.b Células Natural Killer y CD57.

Las células Natural Killer (NK) son células linfoides innatas que no presentan receptores de célula T o B, ni tampoco expresan marcadores mieloides ni dendríticos. Son las células citolíticas de la inmunidad innata más estudiadas. Se localizan habitualmente en dermis de piel normal y raramente en epidermis.

Suponen un componente efector fundamental en el sistema inmunitario innato, que comparten muchas características con los linfocitos T citotóxicos, pero a diferencia de éstos, son capaces de destruir células sin mediación del CMH-I. Se dividen en:

- CD56 bright o positivas (elevada densidad de expresión del marcador CD56), que son a su vez CD57 negativas. Esta estirpe de células NK son de tipo regulador.
- CD56 dim o negativas (presentan baja densidad de CD56), son CD57+ y se trata de un fenotipo citotóxico¹⁵⁰.

Como marcadores de superficie, las células NK expresan CD16 y CD56, pero cuando se diferencian también expresan CD57, las variantes diferenciadas tienen mayor actividad citolítica¹³⁰. El marcador CD56 se ha utilizado en algunos estudios de CEC como marcador de células NK, pero la tendencia actual es a utilizar el marcador CD57, ya que se ha descrito como un marcador fenotípicamente estable que representa aquellas células con mayor actividad citotóxica. Este último marcador no solo se expresa en células NK, sino también en linfocitos T CD8 y CD4, sobre todo en aquellos que están en fase de senescencia, con escasa actividad proliferativa y elevada actividad citotóxica⁹⁷.

En modelos murinos se ha visto, según Ortner *et al.*¹⁵⁰ que las células NK juegan un papel fundamental suprimiendo el desarrollo del CEC cutáneo, de modo que la depleción de células NK causaba un acúmulo de daño en el ADN y aceleraba el crecimiento tumoral. El grupo de Ortner también elucidó cómo se reclutan las células NK en el microambiente tumoral, que ocurre gracias a citoquinas producidas tras la activación de TNF α , como CCL2 y CXCL10. La interacción con células de Langerhans también tiene un papel fundamental en el reclutamiento y quimiotaxis de las células NK.

INTRODUCCIÓN

Las células NK tienen receptores activadores (NKG2D, NKP46) y otros inhibidores (KIRs, CD94), que controlan su actividad citotóxica. Además, también expresan el receptor IgG CD16, que les permite detectar y lisar a células mediante una citotoxicidad mediada por anticuerpos¹⁵¹.

Del mismo modo, el microambiente tumoral puede disminuir la capacidad citotóxica de estas células, mediante la modulación a la baja de sus receptores activadores¹³⁰. Esto ocurre debido a que un aumento de la expresión de aquellos componentes que forman parte del eje IL-33/ST2 inhiben la actividad citotóxica de las células NK, según Ghinelli y cols.¹³⁰. TGF- β también puede reducir la producción de citoquinas por parte de las células NK, dando como resultado una inhibición de su función citotóxica¹⁵².

Se ha estudiado en múltiples neoplasias humanas la expresión de CD57 en el microambiente tumoral, intentando relacionarla con el pronóstico de los pacientes. Su papel todavía no se conoce completamente, ya que para algunos tipos de cáncer se ha comprobado que confiere buen pronóstico una mayor expresión (mama, pulmón y esófago, entre otros) mientras que para otros tipos de neoplasias se asocia a mal pronóstico (carcinoma renal, melanoma o mieloma)¹⁵³.

Para CEC de piel y mucosas, dependiendo de las series consultadas, una mayor expresión de este marcador confiere mejor o peor pronóstico.

En diversos estudios, incluyendo un metaanálisis para CE oral, se observó que una mayor expresión de células CD57+ en el microambiente tumoral se asociaba a un aumento de la supervivencia¹⁵¹. En el estudio de Taghavi *et al.*¹⁵¹, también realizado en pacientes con CE de mucosa oral, se comprobó que una mayor expresión de células CD57+ en el microambiente tumoral aumentaba la supervivencia con un HR de 17. De manera análoga, en el reciente metaanálisis realizado por Bisheshar *et al.*¹⁵⁴ se observó que mayor expresión de células NK CD56+ y CD57+ se asociaba a mejor pronóstico en pacientes con CEC de cabeza y cuello.

Sin embargo, existen dos estudios destacables, en los que se observó que una mayor expresión de células CD57+ se asociaba a peor pronóstico en CEC. En el estudio reciente se ha correlacionado una mayor expresión de células CD57+ en el microambiente tumoral de CE oral con peor pronóstico¹⁴⁵. Del mismo modo, en el estudio de Carvalho *et al.*¹⁵⁵ se observó que una mayor expresión de CD57+ se

INTRODUCCIÓN

correlacionaba con la aparición de metástasis linfáticas en CE de cabeza y cuello y con tumores de mayor tamaño.

No hemos encontrado según nuestros criterios de búsqueda estudios que analicen el valor pronóstico de las células CD57+ en CEC.

En el artículo de Cabibi *et al.*¹⁵⁶ sí se analizó la presencia de CD57 en CEC, y se comparó con queratoacantomas, comprobándose que existía mayor expresión de este marcador en queratoacantoma que en CEC cutáneo.

En un estudio de 2005¹⁵⁷ se analizó la expresión de CD57 en displasia oral en comparación con CEC oral, y se observó que el número de células CD57+ aumentaba progresivamente según el grado de displasia, pero disminuía cuando se trataba de CEC invasivo. Tampoco hemos encontrado ningún estudio que analice la presencia de CD57 en queratosis actínicas.

1.9 Papel pronóstico de los componentes de la inmunidad adquirida

1.9.a Linfocitos T citotóxicos y CD8

Los linfocitos T y B son las principales células efectoras de la respuesta inmunitaria adaptativa. Todos los linfocitos T expresan el marcador de superficie CD3+. Estas células a su vez se pueden clasificar en linfocitos T CD4+ (T helper o Th) y linfocitos T CD8+ (T citotóxicos). Los Th producen citoquinas que modulan otras células inmunitarias, y quimioquinas que atraen a células inflamatorias. Dependiendo del estímulo que reciben, los linfocitos Th se pueden diferenciar a Th1, Th2, Th9, Th17 y Treg. Los linfocitos T CD8 citotóxicos son estimulados por diversas citoquinas, como IL-12 e $\text{INF}\alpha/\beta$, con lo que producen $\text{INF}\gamma$ y $\text{TNF}\alpha$, así como perforinas y granzimas, las cuales conllevan la destrucción de las células tumorales.

Los linfocitos CD8+ tienen la capacidad de destruir de manera directa clonas de células tumorales, a través de la unión al CMH-I. Cabría esperar, por tanto, que a mayor número de linfocitos T citotóxicos CD3+ CD8+ en el infiltrado tumoral del CEC, exista mejor pronóstico. Sin embargo, estas células pueden presentar receptores inhibidores en superficie, como CTLA-4 y PD-1, que impiden su actividad citotóxica, lo cual explicaría que en algunos estudios no se encuentren diferencias en el pronóstico, a pesar de que sí que reporten diferencias en el número de linfocitos T CD8+ en muestras de CEC.

En efecto, diversos estudios y metaanálisis han demostrado que la mayor expresión de células CD8+ se asocia a mejor pronóstico en CE de cabeza y cuello^{158 159 160}. En el estudio de Chester Lai *et al.*¹⁶¹ realizado en CEC, se observó de manera análoga que una mayor expresión de células CD8+ en el microambiente tumoral se asociaba a un mejor pronóstico (concretamente observaron que existía menor expresión de CD8 en aquellas muestras tumorales que producían metástasis que en aquellas que no).

Resulta destacable que Shimizu *et al.*⁵⁸ únicamente encontraran asociación con mayor supervivencia entre los linfocitos CD8+ localizados en la periferia tumoral, y no los centrales, en pacientes con CEC oral.

INTRODUCCIÓN

En el estudio de Cabibi *et al.*¹⁵⁶ no se encontraron diferencias en el número de células CD8+ en el microambiente tumoral entre CEC y queratoacantomas. Del mismo modo, Kambayashi *et al.*¹⁴⁸ tampoco encontraron diferencias en el número de linfocitos CD8+ entre queratoacantomas y CEC. Bauer y colaboradores¹⁸ sí que observaron diferencias entre queratoacantomas y CEC con respecto a las células CD8+, encontrando que el CEC tenía mayor número de estas que el queratoacantoma.

En un artículo¹⁶² se comparó el nivel de infiltración de CD8 en queilitis actínica y en CEC cutáneo, comprobándose que existía mayor infiltración por ese tipo celular en queilitis actínica que en CEC. Por el contrario, en otro estudio¹⁸ se analizó la presencia de células CD8+ en queratosis actínicas vs CEC, con menor expresión de las mismas en queratosis actínicas.

Stravodimou *et al.*¹⁶³ demostró el incremento progresivo de células CD8+ desde piel normal a CEC in situ, pasando por queratosis actínica. No se observaron muchas diferencias en estas células entre CEC in situ e invasor. Su hipótesis para explicar esto es que los linfocitos asociados al tumor tienen diferentes funciones y efectos biológicos en CEC in situ que en CEC invasor.

INTRODUCCIÓN

1.9.b Linfocitos T reguladores y FOXP3

Los linfocitos T reguladores (TReg) son células que promueven la inmunotolerancia a nivel del microambiente tumoral. FOXP3 es un factor de transcripción necesario para la inducción de la función inmunosupresora de los linfocitos TReg y también es un marcador muy específico de la presencia de este tipo celular en el microambiente tumoral¹⁶⁴.

Debido al hecho de que los linfocitos TReg inhiben la respuesta inmunitaria antitumoral, elevados números de células FOXP3+ en el infiltrado tumoral se asocian clásicamente con mal pronóstico en diversos tipos tumorales, incluyendo el CEC.

Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que a mayor presencia de células FOXP3 en el infiltrado tumoral existe mayor supervivencia en determinados tipos tumorales, incluyendo CEC de cabeza y cuello¹⁶⁵. En el metaanálisis de Koike *et al.*¹⁶⁶ también se asoció más expresión de FOXP3 con mayor supervivencia en pacientes con CEC oral. Posibles hipótesis que expliquen estos hallazgos serían que existen algunas células FOXP3+ que no son linfocitos TReg, a pesar de que sea un marcador muy específico para éstas. Ejemplo de estas células serían los linfocitos T citotóxicos CD8+. Es decir, son otras células que no realizan funciones protumorales, si no que tienen funciones antitumorales. Otra posible causa de estos resultados según de Koike¹⁶⁶ consiste en que los linfocitos TReg no son capaces de inhibir, como de costumbre, la acción citotóxica de los linfocitos T CD8+ cuando éstos están sobreestimados. Por último, también postularon que las células CTLA4+ suprimen la acción inmunosupresora de los linfocitos TReg.

Del mismo modo, el estudio de Ruiter¹⁵⁸ determinó que una mayor expresión de FOXP3 en el microambiente tumoral proporcionaba mejor pronóstico para CEC de cabeza y cuello. Estos autores también trataron de explicar este hecho paradójico, con la hipótesis de que el número de células FOXP3+ solo es un reflejo de la cantidad total de células T presentes en el epitelio y que el efecto beneficioso de los T CD8+ enmascara el efecto inmunosupresor de los Treg. Debido a este motivo propusieron el ratio CD8/FOXP3. Así pues, un ratio alto, sería un biomarcador potencialmente robusto de pronóstico en diferentes tipos tumorales, al reflejar una depleción relativa de Treg. Otros estudios en

INTRODUCCIÓN

la misma línea, sugieren que para discriminar aquellos linfocitos TReg con perfil inmunosupresor se necesitarían marcadores adicionales: FOXP3+, CD25+ y CD127-¹⁶⁷.

Sin embargo, los mecanismos que conducen a la correlación observada entre la infiltración de FOXP3 + Tregs y el pronóstico favorable y su impacto clínico siguen sin estar claros y justifican una mayor investigación.

En el estudio de Lai *et al.*¹⁶¹ sí se correlacionó mayor expresión de FOXP3 en el microambiente tumoral de CEC cutáneo con peor pronóstico. Del mismo modo, en un trabajo de 2014¹⁶⁸, se estudió la expresión de FOXP3 junto a CD25 en CEC de piel, para identificar linfocitos TReg correlacionándose con peor pronóstico. Destaca de este último estudio que los TReg que permitieron discernir el pronóstico se encontraban en la periferia tumoral. También evaluaron el ratio CD8/FOXP3+CD25+ en el microambiente, tanto en zona peritumoral como en el seno del propio tumor. Concluyeron que un ratio CD8/FOXP3+CD25+ menor podría contribuir a mayor agresividad del CEC cutáneo, al igual que se ha visto en otros tumores sólidos.

De manera similar, el trabajo de Stravodimou y cols.¹⁶³ demostró que existen mayor cantidad de células FOXP3 en CEC más agresivos y de mayor grado según la clasificación TNM, en comparación con aquellos de menor grado.

En otro trabajo¹⁴⁸ se comparó la expresión de FOXP3 en el microambiente tumoral entre queratoacantoma y CEC, con mayor expresión de este marcador en CEC que en queratoacantoma. Sin embargo, en el estudio de Bauer *et al.*¹⁸ se encontró mayor cantidad de células FOXP3 positivas en queratoacantoma que en CEC.

En cuanto a queratosis actínicas, en dos estudios se demostró que estas expresaban mayor porcentaje de células FOXP3 que el CEC cutáneo^{162,146}. Sin embargo, Jang y cols.¹⁶⁹ encontraron hallazgos contrarios, con una prevalencia de linfocitos Treg FOXP3+ significativamente mayor en CEC que en queratosis actínicas.

2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

El carcinoma epidermoide es el segundo tipo más frecuente de cáncer cutáneo no melanoma y representa la segunda causa de mortalidad por cáncer cutáneo. Esta última se debe, fundamentalmente, a la extensión a distancia y metástasis ganglionares del CEC. Resulta fundamental encontrar marcadores que permitan diferenciar entre aquellos CEC que desarrollarán metástasis y aquellos que no.

En la actualidad se conocen diversos factores clínicos e histológicos que confieren mal pronóstico al carcinoma epidermoide, como un diámetro clínico superior a 2 cm, la inmunosupresión, un espesor histológico mayor de 6 mm, la presencia de invasión perineural, y el escaso grado de diferenciación celular, entre otros. No obstante, las clasificaciones pronósticas actuales para este tipo tumoral tienen limitaciones para predecir la tasa de metástasis, con un valor predictivo positivo bajo. Esto dificulta el manejo de los pacientes en cuanto al riesgo de metástasis⁷⁷. De este modo, aquellos pacientes con CEC se beneficiarían de más herramientas pronósticas para determinar qué pacientes de entre aquellos clasificados como CECAR tienen menor riesgo de metástasis.

Asimismo, no existe un consenso sobre la repercusión pronóstica de las células inflamatorias del microambiente tumoral en el caso de CEC. Se han realizado estudios similares pero para otras estirpes tumorales, como melanoma¹⁷⁰.

Por tanto, nos planteamos la siguiente pregunta de investigación: *¿Cuál es el papel pronóstico de las células inmunitarias en el cáncer cutáneo no melanoma, concretamente en el carcinoma epidermoide?*

Existen diversos estudios que utilizan técnicas inmunohistoquímica (IHQ) para detectar la presencia de las diferentes células inflamatorias en el estroma tumoral y en la región peritumoral, para diferentes tipos tumorales. En el caso del CEC hay controversia, según las distintas series consultadas, sobre la repercusión pronóstica de los diferentes tipos de células del microambiente tumoral.

También se ha postulado que las diferentes células inflamatorias juegan un papel fundamental en cuanto a la respuesta a inmunoterapia. Es de vital importancia conocer en detalle la respuesta inmunitaria contra las células tumorales del carcinoma epidermoide, con el fin de encontrar nuevas dianas para futura inmunoterapia.

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

Por todo esto, se requieren más estudios que evalúen diferentes marcadores IHQ en pacientes con CEC en diferentes estadios evolutivos y con distinto pronóstico, para comparar las diferencias entre éstos.

Por otra parte, es interesante comparar el infiltrado inflamatorio presente en queratosis actínicas, queratoacantomas y CEC. Esto es así porque el estudio de los diferentes marcadores nos permitirá conocer mejor la respuesta inmunitaria frente a estas lesiones cutáneas y su efecto en las distintas etapas evolutivas del CEC cutáneo.

Ante esta situación, planteamos un estudio del infiltrado inflamatorio asociado a CEC no metastásico, CEC metastásico, queratoacantomas y queratosis actínicas mediante el uso de marcadores inmunohistoquímicos (CD8, CD57, CD163, FOXP3 y CD25).

Nuestras hipótesis generales son las siguientes:

- Aquellos CEC que metastatizan presentan un infiltrado inflamatorio asociado al tumor (TIL) diferente a aquellos CEC que no metastatizan.
- Las células inmunitarias que forman parte del microambiente tumoral tienen un papel en el pronóstico del CEC cutáneo, en cuanto al desarrollo de metástasis.
- Existen diferencias significativas entre las células inmunitarias que infiltran queratosis actínica, queratoacantoma y CEC cutáneo invasivo.

3. OBJETIVOS

OBJETIVOS

OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- a) Conocer la presencia de las diferentes células inmunitarias del microambiente tumoral en pacientes intervenidos por CEC cutáneo invasor, queratoacantoma y queratosis actínicas en el Hospital General Universitario Reina Sofía (HGURS) y Hospital Morales Meseguer (HMM) desde el año 2000 hasta el 2017.
- b) Establecer una correlación entre la presencia de estas células inmunitarias y parámetros clínicos.

3.2 Objetivos específicos

- a) Describir según las características clínico-histológicas nuestra muestra de pacientes con CEC, queratoacantomas y queratosis actínicas.
- b) Investigar la presencia de las diferentes células inmunitarias del microambiente tumoral y su distribución en el infiltrado en pacientes intervenidos por CEC cutáneo invasor, queratoacantomas y queratosis actínicas en el HGURS desde el año 2000 hasta el 2017, a través de la utilización de diferentes marcadores celulares inmunohistoquímicos: CD8, CD57, CD163, FOXP3, CD25.
- c) Analizar la repercusión pronóstica (aparición o no de metástasis antes de 3 años de seguimiento) en los pacientes intervenidos por CEC según su grado de expresión de los diferentes marcadores celulares inmunohistoquímicos en el microambiente tumoral: CD8, CD57, CD163, FOXP3, CD25.
- d) Estudiar las diferencias en la expresión de los marcadores celulares inmunohistoquímicos del microambiente tumoral CD8, CD57, CD163, FOXP3, CD25 entre CEC, queratoacantoma y queratosis actínicas.
- e) Estudiar las diferencias en la expresión de los marcadores celulares inmunohistoquímicos del microambiente tumoral CD8, CD57, CD163, FOXP3, CD25 dependiendo de algunas variables clínico-histológicas de los pacientes, como la edad, el espesor tumoral, la invasión perineural y tratarse de CECAR (carcinoma epidermoide cutáneo de alto riesgo).

4. MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Diseño, tipo de estudio

Se trata de un estudio retrospectivo de casos y controles, analítico, en pacientes con lesiones cutáneas, tanto cancerosa infiltrante como precancerosa, con un período mínimo de seguimiento de los pacientes desde la extirpación de la lesión cutánea de 3 años.

Los casos se obtuvieron mediante una selección de manera retrospectiva de casos consecutivos, desde los archivos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital General Universitario Reina Sofía (HGURS) y del Hospital Morales Meseguer (HMM) de Murcia. Todos los casos fueron revisados por un anatomopatólogo previamente a la inclusión en nuestro estudio, con el fin de confirmar el diagnóstico histológico.

4.2 Ámbito de estudio

Pacientes que fueron diagnosticados, tratados e intervenidos quirúrgicamente de queratosis actínica, queratoacantoma o carcinoma epidermoide cutáneo, con resección completa de la pieza tumoral, en el Hospital General Universitario Reina Sofía y Hospital Morales Meseguer de Murcia. Todos los pacientes tuvieron un seguimiento clínico posterior mínimo de tres años (este tiempo viene respaldado por el estudio de Venables y cols.¹⁷¹ en el cual se observó que más del 85% de los pacientes con CEC metastásico desarrollaban las metástasis antes de los dos primeros años).

4.3 Muestras a estudio

Previo a la realización del estudio se calculó el tamaño muestral (n) a partir de un estudio piloto inicial (no se disponían de datos en la literatura) en el cual se seleccionó CD57 como marcador IHQ y la aparición o no de metástasis como variable principal. Se observó una diferencia de 7 unidades entre ambos grupos en cuanto al porcentaje de células teñidas con CD57 (la media en aquellos que no metastatizaban era de 6.8+/-3.9 y en aquellos que sí metastatizaban era de 15.5+/-12.3, con una varianza de 16). Se seleccionó un nivel de confianza del 95%, con una potencia beta del 90%. El tamaño

muestral necesario en cada uno de los grupos era de 34, teniendo en cuenta una proporción de pérdidas esperada del 10%.

COMPARACIÓN DE DOS MEDIAS
(Se pretende comparar si las medias son diferentes)

Indique número del tipo de test	
Tipo de test (unilateral o bilateral)	1 UNILATERAL
Nivel de confianza o seguridad (1- α)	95%
Poder estadístico	90%
Precisión (d) <small>(Valor mínimo de la diferencia que se desea detectar, datos cuantitativos)</small>	3,00
Varianza (s^2) <small>(De la variable cuantitativa que tiene el grupo control o de referencia)</small>	16,00
TAMAÑO MUESTRAL (n)	30
EL TAMAÑO MUESTRAL AJUSTADO A PÉRDIDAS	
Proporción esperada de pérdidas (R)	10%
MUESTRA AJUSTADA A LAS PÉRDIDAS	34

Beatriz López Calviño
Salvador Pita Fernández

Tabla 6. Cálculo del tamaño muestral (n) teniendo en cuenta el nivel de confianza, poder estadístico, precisión, varianza y proporción esperada de pérdidas.

El material estudiado provenía de biopsias fijadas en formol y procesadas de manera habitual, por lo que disponíamos de bloques tumorales en parafina. El tamaño muestral de pacientes con lesiones cutáneas cancerosas y precancerosas fue de 146 pacientes, compuesto por 36 pacientes con queratosis actínica, 38 pacientes con queratoacantoma y 72 pacientes con carcinoma epidermoide infiltrante, de los cuales 37 no desarrollaron adenopatías/metástasis a los tres años de seguimiento y 35 sí desarrollaron adenopatías/metástasis en los tres primeros años de seguimiento.

Los pacientes se seleccionaron de forma consecutiva entre el 1 de enero del año 2000 y el 31 de diciembre de 2017. Finalmente, de entre todos los pacientes incluidos, 128 pertenecían al HGURS y 18 pertenecían al HMM.

Se obtuvo un listado de pacientes, que se anonimizó de manera parcial durante el proceso de recogida de datos, a través de la eliminación de nombre y apellidos de los pacientes, conservando el número de historia clínica y el número de petición de biopsia para evitar confusiones y duplicidades.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se recogieron variables clínicas, demográficas, histológicas y evolutivas de manera retrospectiva y se realizaron estudios inmunohistoquímicos sobre estas muestras.

Previo a la realización del proyecto, éste fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación del HGURS (Anexo I).

4.4 Criterios de selección

4.4.1 Criterios de inclusión

- Se seleccionaron aquellos pacientes, sin restricción de edad, que fueron tratados quirúrgicamente por queratosis actínica, queratoacantoma, carcinoma epidermoide cutáneo no metastásico y carcinoma epidermoide metastásico en el Hospital General Universitario Reina Sofía y Hospital Morales Meseguer de Murcia, en el período de tiempo entre el año 2000 y 2017.
- Pacientes sin otros tumores malignos asociados.
- Pacientes inmunocompetentes, sin enfermedad autoinmune conocida y sin enfermedad inflamatoria crónica.
- Pacientes con un informe histopatológico inequívoco de la pieza reseca.
- En el caso de carcinoma epidermoide, pacientes con un seguimiento clínico/radiológico tras la intervención mínimo de 3 años, a excepción de fallecimiento debido a la enfermedad durante el período de seguimiento.

4.4.2 Criterios de exclusión:

- Pacientes con enfermedades autoinmunes conocidas.
- Pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas.
- Pacientes con otros tumores malignos coexistentes.
- Pacientes inmunodeprimidos.
- Localización mucosa de la lesión tumoral.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Metástasis de CEC de las cuales no se disponía de la pieza tumoral completa.
- Aparición de metástasis del carcinoma epidermoide más allá de tres años tras la resección del tumor primario cutáneo.
- Pacientes con dificultad o incapacidad para continuar el seguimiento clínico.
- Pacientes cuya historia clínica informatizada fue incompleta.
- Pacientes con informe histopatológico dudoso o conflictivo.

4.5 Variables principales del estudio

Para la recogida de los datos se recurrió a la historia clínica informatizada de cada uno de los pacientes, estas variables fueron incluidas de manera retrospectiva. Con el fin de identificar a cada paciente se utilizó el número de historia clínica y el número de petición de biopsia, sin registro de otros datos personales. Tras la construcción de los microarrays y la interpretación de las tinciones en cada una de las muestras, a cada paciente se le atribuyó un número de manera aleatorizada, para conseguir la anonimización completa de la muestra.

Las variables clínicas estudiadas para cada uno de los pacientes fueron: sexo, edad, tipo de lesión (queratosis actínica, queratoacantoma o carcinoma epidermoide), diámetro mayor, localización de la lesión, afectación de márgenes quirúrgicos.

Para aquellos con CEC también se recogieron otras variables histológicas: espesor tumoral, grado de diferenciación tumoral, presencia de metástasis, invasión perilinfática/perineural, invasión de tejido celular subcutáneo, CECAR.

Para todos los tipos de lesiones se midió, en forma de porcentaje, la expresión de cada uno de los marcadores de células inflamatorias del infiltrado inflamatorio peritumoral: CD8, CD163, CD57, FOXP3 y CD25.

MATERIAL Y MÉTODOS

4.5.1 Variables clínicas

Las variables clínicas recogidas para todos los tipos de lesiones las encontramos en la siguiente tabla.

Variable incluida	Tipo de variable	Valores adoptados
Sexo	Cualitativa	0. Varón 1. Mujer
Edad	Cuantitativa	Cifra (años)
Tipo de lesión	Cualitativa	1. CEC 2. Queratoacantoma 3. Queratosis actínica
Tamaño	Cuantitativa	Cifra del diámetro máximo clínico (mm)
Localización	Cualitativa	0. Áreas de no alto riesgo 1. Áreas de alto riesgo

Tabla 7: variables clínicas que se recogieron en la muestra con sus valores posibles.

A continuación, explicamos con mayor detalle la tabla anterior:

- Sexo: variable cualitativa dicotómica. Los pacientes varones adoptaron el número 0 y las pacientes mujeres el número 1.
- Edad: variable cuantitativa discreta. Es la edad en años al diagnóstico de la lesión tumoral cutánea primaria.
- Tipo de lesión: variable cualitativa nominal. Los pacientes con CEC se describieron con el número 1, con queratoacantoma con el número 2 y con queratosis actínica, el número 3.
- Diámetro tumoral: variable cuantitativa continua. Se recogió en milímetros, midiendo el mayor diámetro tumoral de la pieza in vivo. Esto se hace así para evitar el sesgo por retracción de las piezas histológicas.
- Localización: variable cualitativa nominal. Con el valor 0 se designaron aquellos que tenían lesiones en áreas que no fueran de alto riesgo, con el valor 1 se designaron aquellos que tenían la lesión en áreas de alto riesgo H (zona de la “máscara” de la cara, compuesta por zona central, cejas, párpados, nariz, labios,

MATERIAL Y MÉTODOS

barbilla, mandíbula, preauricular y postauricular, orejas. También incluye genitales, manos y pies).

4.5.1 Variables histológicas

En el caso de carcinoma epidermoide, se recogieron también otras variables histológicas:

Variable incluida	Tipo variable	Valores adoptados
Márgenes quirúrgicos	Cualitativa	0. Libres 1. Afectos
Grado de diferenciación	Cualitativa ordinal	0. Bien diferenciado o moderadamente diferenciado 1. Escasamente diferenciado
Invasión perineural y/o perivascular	Cualitativa dicotómica	0. No 1. Sí
Invasión tejido celular subcutáneo	Cualitativa dicotómica	0. No 1. Sí
Espesor tumoral	Cuantitativa continua	Cifra (en mms)
Metástasis	Cualitativa dicotómica	0. No 1. Sí
CEC alto riesgo	Cualitativa dicotómica	0. No 1. Si

Tabla 8. Variables histológicas con sus posibles valores.

MATERIAL Y MÉTODOS

Explicadas con mayor detalle las variables anteriores:

- Márgenes quirúrgicos: variable cualitativa dicotómica. Se designó con el número 0 aquellos que tenían márgenes histológicos libres y con el número 1 aquellos con márgenes afectos.
- Grado de diferenciación: variable cualitativa ordinal, que adquirió el valor 0 si era un CEC bien diferenciado o moderadamente diferenciado y el valor 1 para aquellos escasamente diferenciados.
- Invasión perineural: variable cualitativa dicotómica, indica la invasión de nervios mayores de 0.1 mm de diámetro. Se designó con el número 0 aquellos que no tenían invasión perineural y con el número 1 aquellos que sí la presentaban.
- Invasión del tejido celular subcutáneo: Se designó con el número 0 aquellos que no tenían invasión más allá de la dermis profunda y con el número 1 aquellos que sí la presentaban.
- Espesor tumoral: variable cuantitativa continua. A diferencia del índice de Breslow, que se mide desde la capa granulosa y sí tiene en cuenta el componente exofítico de la tumoración, en el caso del CEC, según la octava edición de la AJCC, el espesor tumoral se mide desde la capa granulosa adyacente al tumor.

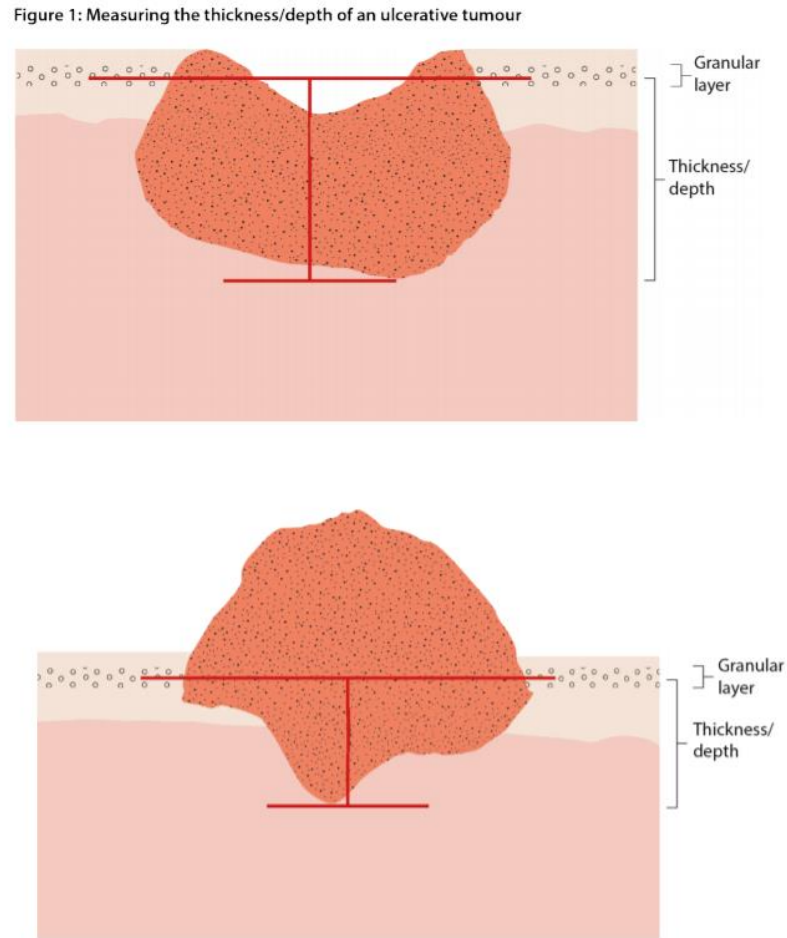


Figura 15. Medición del espesor tumoral para el CEC desde la capa granulosa. En la figura superior se aprecia cómo se mide para una lesión ulcerada y en la superior, para una exofítica. El índice de Breslow sería mayor para la lesión exofítica que para la ulcerada, sin embargo, con este sistema de medición es al contrario. Imagen extraída de <https://www.rcpath.org/uploads/assets/9c1d8f71-5d3b-4508-8e6200f11e1f4a39/Dataset-for-histopathological-reporting-of-primary-invasive-cutaneous-squamous-cell-carcinoma-and-regional-lymph-nodes.pdf>³.

- Metástasis: variable cualitativa dicotómica. Se designó con el número 0 aquellos que no tenían adenopatías metastásicas ni metástasis a distancia y con el número 1 aquellos que sí las presentaban.
- CECAR: variable cualitativa dicotómica. Se designó con el número 0 aquellos que no eran de alto riesgo y con el número 1 aquellos que sí lo eran. Siguiendo

MATERIAL Y MÉTODOS

el sistema de estadificación de Brigham and Women's Hospital (BWH), aquellos CEC que tenían dos o más de las siguientes características se consideraron de alto riesgo (los tumores con invasión ósea también se consideraron CECAR):

- Diámetro tumoral mayor o igual a 2 cm.
- Invasión más allá de la grasa subcutánea.
- Invasión perineural de nervios de diámetro mayor o igual a 0.1 mm.
- Escasa diferenciación histológica.

4.5.1 Variables inmunohistoquímicas

Para todas las muestras tumorales se evaluó la positividad para los marcadores IHQ recogidos en la siguiente tabla:

Variable	Tipo variable	Valores posibles
CD8	Cuantitativa continua	Cifra en porcentaje
CD57	Cuantitativa continua	Cifra en porcentaje
CD163	Cuantitativa continua	Cifra en porcentaje
FOXP3 y CD25	Cuantitativa continua	Cifra en porcentaje

Tabla 9. Variables inmunohistoquímicas con sus valores posibles.

Para evaluar el infiltrado inflamatorio asociado a las piezas tumorales, en cada foco de los diferentes microarrays se seleccionó el campo con mayor infiltrado inflamatorio en cada pieza tumoral y se calculó con un aumento de 200 x el porcentaje de células teñidas respecto al total de infiltrado inflamatorio en cada uno de estos campos (en una escala del 1 al 100)¹⁵⁶. El procedimiento fue realizado por parte de J.C, residente de dermatología, que no conocía la distribución de los cilindros en los diferentes bloques de parafina.

Esta evaluación de las muestras teñidas fue realizada de manera análoga también por E.P, experto anatomopatólogo, que tampoco conocía la distribución de las muestras en

MATERIAL Y MÉTODOS

los arrays. Los dos observadores eran independientes y no conocían el resultado de los valores dados por su compañero.

La media de los valores obtenidos por parte de cada investigador (en forma de porcentaje) fue utilizada para el estudio estadístico.

4.5 Tissue array o matrices tisulares:

Se trata de una técnica descrita en 1998 por Kononen y colaboradores¹⁷², que permite analizar de manera simultánea gran cantidad de piezas tumorales. Se selecciona un pequeño cilindro representativo de cada una de las muestras, previamente marcado con tinta. Estos cilindros se obtienen de los bloques donantes mediante agujas de acero de forma manual, aunque también existen sistemas automatizados.

Los cilindros se incluyen en un bloque de parafina receptor de manera ordenada, con una distancia entre ellos y una disposición sobre el mismo previamente determinadas en una matriz electrónica. Este bloque receptor de parafina puede contener finalmente centenares de piezas y se denomina tissue array o matriz tisular.

El tissue array se procesa y se tiñe de manera similar a un bloque de parafina común.

Este método permite estandarizar el análisis de las diferentes piezas ya que las tinciones y el procesamiento de las mismas se realizan en las mismas condiciones. Además, permite analizarlas de manera rápida.

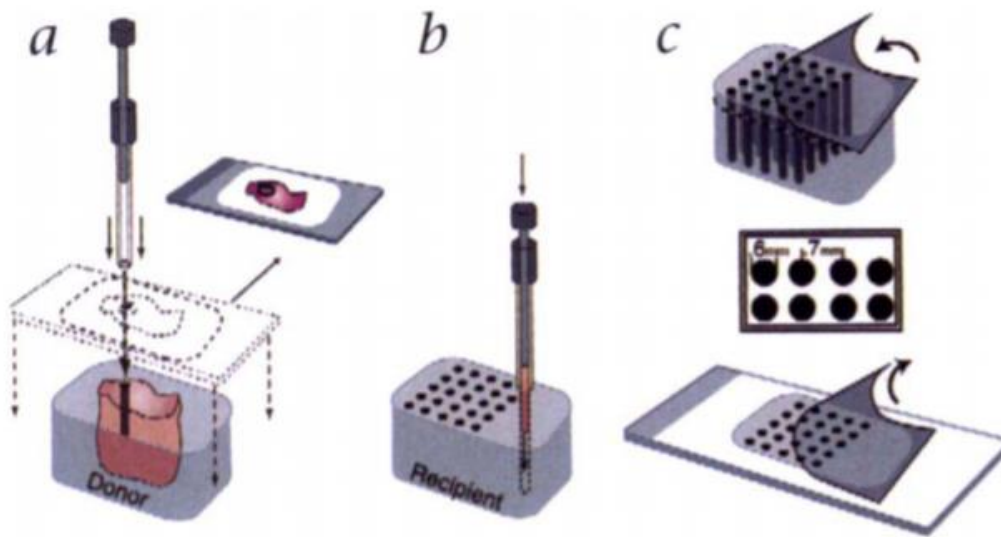


Figura 16. Construcción de un array tisular. Se realizan biopsias en sacabocados de las zonas previamente seleccionadas del bloque de parafina donante, mediante agujas finas de acero cilíndricas (a). Se transfieren los cilindros de manera ordenada sobre el bloque de parafina receptor (b). Se coloca una tapa adhesiva, la cual permite el corte del bloque receptor. Este corte se coloca sobre un portaobjetos (c). Imagen extraída del estudio de Kononen y cols.¹⁷²

4.6 Procedimientos realizados

La fuente de información para la elaboración de la base de datos con los diferentes participantes se obtuvo del servicio de Documentación del HGURS. Todo ello respaldado por la propia base de datos del servicio de Anatomía Patológica del HGURS y del HMM.

La obtención de las variables epidemiológicas y clínicas, tales como edad, sexo, tipo de lesión y localización de la lesión, se realizó recurriendo a la historia clínica informatizada de cada paciente. El resto de variables clínicas evolutivas (adenopatías, metastásis, recidiva tumoral) también se obtuvieron recurriendo a la historia clínica informatizada de los pacientes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se recuperaron los 146 bloques de parafina de los diferentes tumores y se realizaron cortes de 4-5 μm de grosor, mediante un microtomo semiautomático de rotación.

Posteriormente, estas secciones se tiñeron con hematoxilina-eosina, mediante el protocolo estandarizado del teñidor automático Leica. Inicialmente se desparafinaron con xilol, siendo hidratadas posteriormente con etanol en series decrecientes, seguido de una tinción con hematoxilina de 2 minutos, lavado con agua y contratinción con eosina durante 1 minuto. A continuación, se deshidrataron y se ensamblaron con xilol.

Estos cortes se observaron a microscopia óptica mediante un experto anatomopatólogo para confirmar el tipo de lesión, el diámetro máximo de cada pieza, para evaluar la afectación de márgenes en todos los casos, así como la invasión del tejido celular subcutáneo, la infiltración perivascular y perineural y el grado de diferenciación en caso de CEC.

En el caso de los CEC, también se determinó si se trataba de un CEC de alto riesgo (CECAR) o no, recurriendo a la clasificación de BWH. De este modo, aquellos que tuvieron dos o más de las siguientes características se consideraron de alto riesgo (los tumores con invasión ósea también se consideraron CECAR):

- Diámetro tumoral mayor o igual a 2 cm.
- Invasión más allá de la grasa subcutánea.
- Invasión perineural de nervios de diámetro mayor o igual a 0.1 mm.
- Escasa diferenciación histológica.

Durante la visualización de cada laminilla al microscopio óptico, se marcó con tinta negra la zona peritumoral con mayor infiltrado inflamatorio, sobre cada una de estas laminillas teñidas con H-E. Todas las zonas que se marcaron estaban a menos de 1 mm del borde más lejano del tejido tumoral. De este modo, el infiltrado inflamatorio evaluado se consideraría intra-tumoral para algunos autores como Galon¹⁷³.

Finalmente se seleccionaron 146 focos de estudio (1 foco por cada bloque donante de parafina), marcados con tinta negra en forma de punto sobre la zona de interés de cada portaobjetos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Antes de la construcción de los arrays tisulares, se almacenaron los bloques de parafina y los portaobjetos con la zona de interés marcada. Esto se realizó en una habitación a temperatura aproximada de 25-30°C.



Figura 17. Dos bloques de parafina con sus respectivos portaobjetos teñidos con H&E, en los cuales se ha seleccionado la zona con mayor infiltrado inflamatorio peritumoral con tinta negra. A mayor detalle se puede observar como el cilindro ya está tomado de esa misma zona en el bloque de parafina (círculos).

Se procedió a la construcción de los microarrays tisulares en el Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria Virgen de la Arrixaca (IMIB) por parte del doctor Carlos Manuel Martínez. Previo a esto, en una hoja de cálculo de Microsoft Excel, se diseñó una plantilla con el orden de las diferentes muestras en los distintos arrays, el cual fue aleatorizado.

MATERIAL Y MÉTODOS

JCF 1	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9
Y1	17B9605	14B15965	16B12869	17B4067		17B12865	17B4480	17B12956	11B15997
Y2	17B11054	15B10705	16B14287	17B4198		17B11818	17B1875	16B11038	11B4941
Y3	17B1219	15B11698	16B15583	17B12899		17B11169	17B8438	13B7774	11B1629
Y4	17B8792	15B12227	16B13297	17B13243		17B10505	16B18279	13B2138	14B16111
Y5	17B11943	15B13600	16B11688	17B5852		17B9727	16B17887	13B7772	14B4322
Y6	17B20099	15B17377	16B14103	17B9729		17B9712	16B18967	12B17117	15B18542
Y7	16B18417	16B3795	16B19670	17B10931		17B14288	14B15222	12B15116	15B10639
Y8	16B14238	14B14467	16B20383	17B6412		17B7285	15B8819	12B10013	
Y9	17B7146	16B10511	17B2453			17B7258	16B21347	12B7193	
Y10	16B8150	16B10792	17B4096			17B6190	16B20611	18B18325	

Tabla 10. Distribución de las diferentes muestras de manera aleatoria en el array tisular número 1 (denominado JCF 1). Estaba formado por 75 piezas cilíndricas de 1.5 cm de diámetro cada una de ellas, distribuidas en 9 columnas y 10 filas. Por motivos técnicos y para facilitar la interpretación de los datos, se dejaron algunas columnas y filas sin casos.

JCF 2	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9
Y1	15B17996	17B13071	17B12040	16B5965		17B13051	04B4481	10B3439	17B3582
Y2	18B2608	17B11353	17B12272	12B18768		10B10528		06B2011	16B6391
Y3	17B14250	17B11034	17B7254	17B20486		15B6688	8B13507	15B14102	10B16951
Y4	18B1087	17B10845	17B8567	15B12486		12B8931	16B19384	05B6221	2B11099
Y5	15B13525	17B10507	17B7643	15B13142		10B6333	10B12553	07B326	12B1324
Y6	15B14500	17B10306	17B18722	17B13608				07B11937	05B8193
Y7	17B12956	17B13406	17B3345			15B3832		08B16637	16B7361
Y8	17B12587	16B17412	17B18711					11B12961	03B3415
Y9	17B11998	17B9112	17B13444			115B19308		12B3352	
Y10	17B11491	17B12963	15B16178			16B19807		15B13687	

Tabla 11. Distribución de las diferentes muestras de manera aleatoria en el array tisular número 2 (denominado JCF 2). Estaba formado por 66 piezas cilíndricas de 1.5 cm de diámetro cada una de ellas, distribuidas en 9 columnas y 10 filas. Por motivos técnicos y para facilitar la interpretación de los datos, se dejaron algunas columnas y filas sin casos.

Se introdujeron los bloques donantes en el microarrayer automatizado TMA Grand Master (Figura 20), el cual obtuvo un foco por cada uno de los bloques donantes (estos focos estaban seleccionados en las correspondientes laminillas de H-E). Cada foco se obtuvo en forma de biopsia en sacabocados de 1.5 mm de diámetro, con morfología

MATERIAL Y MÉTODOS

cilíndrica. Estos cilindros se introdujeron en los bloques receptores de parafina, que también se introdujeron en el arrayer automatizado.



Figura 18. Uno de los bloques donantes de parafina con el punch para el microarray ya extraído de su porción inferior izquierda (círculo), con mayor infiltrado inflamatorio.



Figura 19. Microarrayer automatizado TMA Grand Master.



Figura 20. Colocación de los bloques tumorales donantes en el microarrayer automatizado TMA Grand Master (imagen extraída de la página web oficial del arrayer <https://www.3dhitech.com/research/tissue-microarrays/tma-grand-master/>).

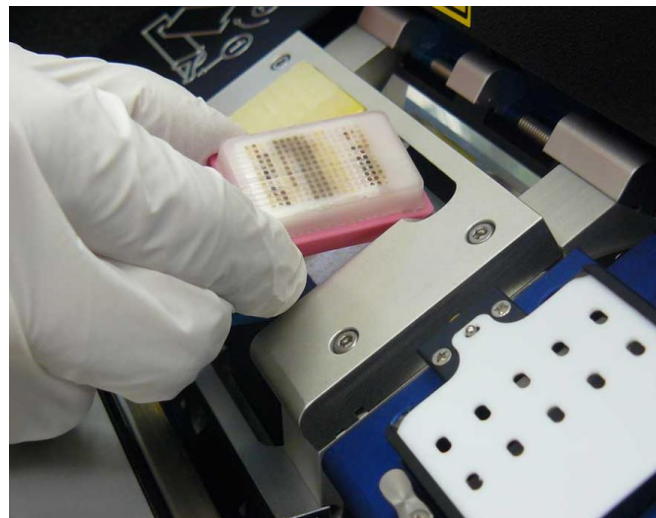


Figura 21. Obtención del bloque donante ya formado, del microarrayer automatizado TMA Grand Master (imagen extraída de la página web oficial del arrayer <https://www.3dhitech.com/research/tissue-microarrays/tma-grand-master/>).

Tal y como se diseñó en las matrices previas, 146 piezas de 1.5 mm de diámetro se integraron en tres bloques receptores de parafina, es decir, se construyeron 2

MATERIAL Y MÉTODOS

Microarrays tisulares (TMAs). El primer microarray contenía 75 piezas y el segundo 67 piezas, que se introdujeron según el orden prefijado en la matriz previamente construida de Microsoft Excel. Las piezas estaban separadas 1.5 mm entre sí.

Se revisaron los microarrays y se comprobó que faltaban cuatro muestras de piezas donantes, por lo que se construyó un nuevo microarray con 4 cilindros (JCF 3). De este modo, finalmente se construyeron 3 Microarrays tisulares (TMAs). El primer microarray contenía 75 piezas, el segundo 67 piezas y el tercero 4 piezas.

JCF 3	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9
Y1		15B15117							
Y2									
Y3		04B8319							
Y4									
Y5		01B5030							
Y6									
Y7		14B12779							
Y8									
Y9									
Y10									

Tabla 12. Distribución de las 4 piezas restantes de manera aleatoria en el array tisular número 3 (denominado JCF 3). Estaba formado por 4 piezas cilíndricas de 1.5 cm de diámetro cada una de ellas, distribuidas en una misma columna.

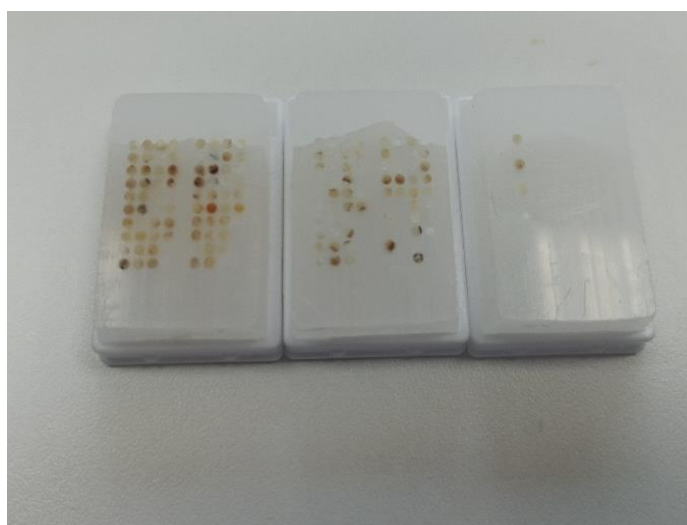


Figura 22. Los tres microarrays tisulares construidos, en orden (JCF1, JCF2, JCF3).

MATERIAL Y MÉTODOS

Una vez contruidos los 3 TMAs, se incubaron durante 15 minutos a 37°C en una estufa con objetivo de mejorar la fijación de los cilindros de tejido tumoral a la parafina circundante en los diferentes espacios del bloque receptor. Esta temperatura permite mejorar la fijación sin derretir la parafina, lo cual produciría una alteración en el orden y distribución de los distintos cilindros.

Posteriormente, se obtuvieron dos laminillas de 4 µm de grosor de cada microarray, las cuales se tiñeron con hematoxilina-eosina para un control inicial de calidad. De este modo, se comprobó que la mayor parte de los focos estaban en buen estado y tenían cantidad suficiente de tumor para evaluar posteriormente con las técnicas inmunohistoquímicas.

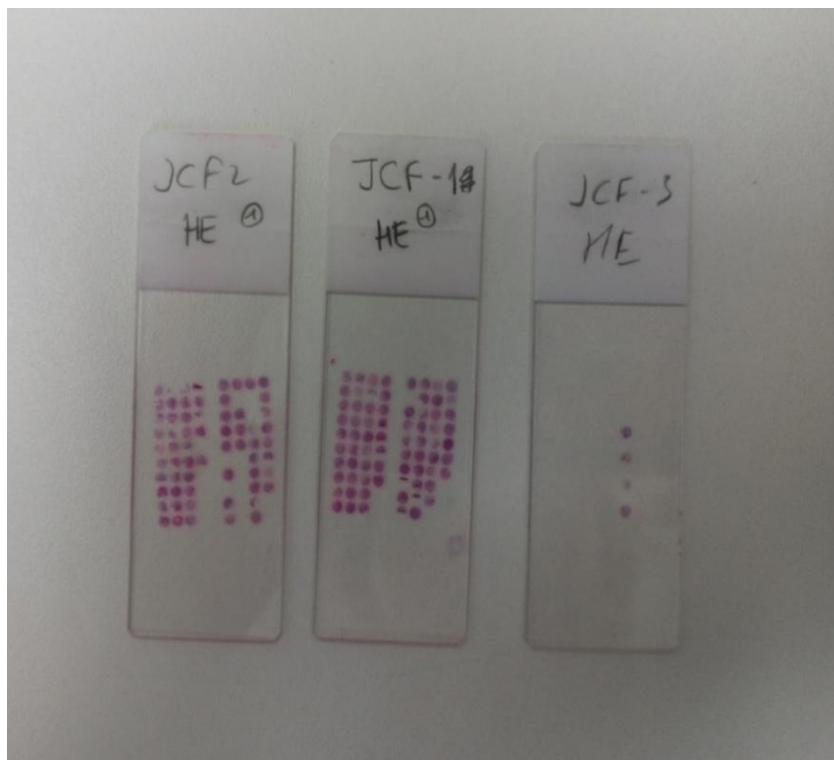


Figura 23. Las tres laminillas teñidas con H&E obtenidas de cada uno de los tres microarrays y dispuestas en orden (JCF1, JCF2, JCF3).

MATERIAL Y MÉTODOS

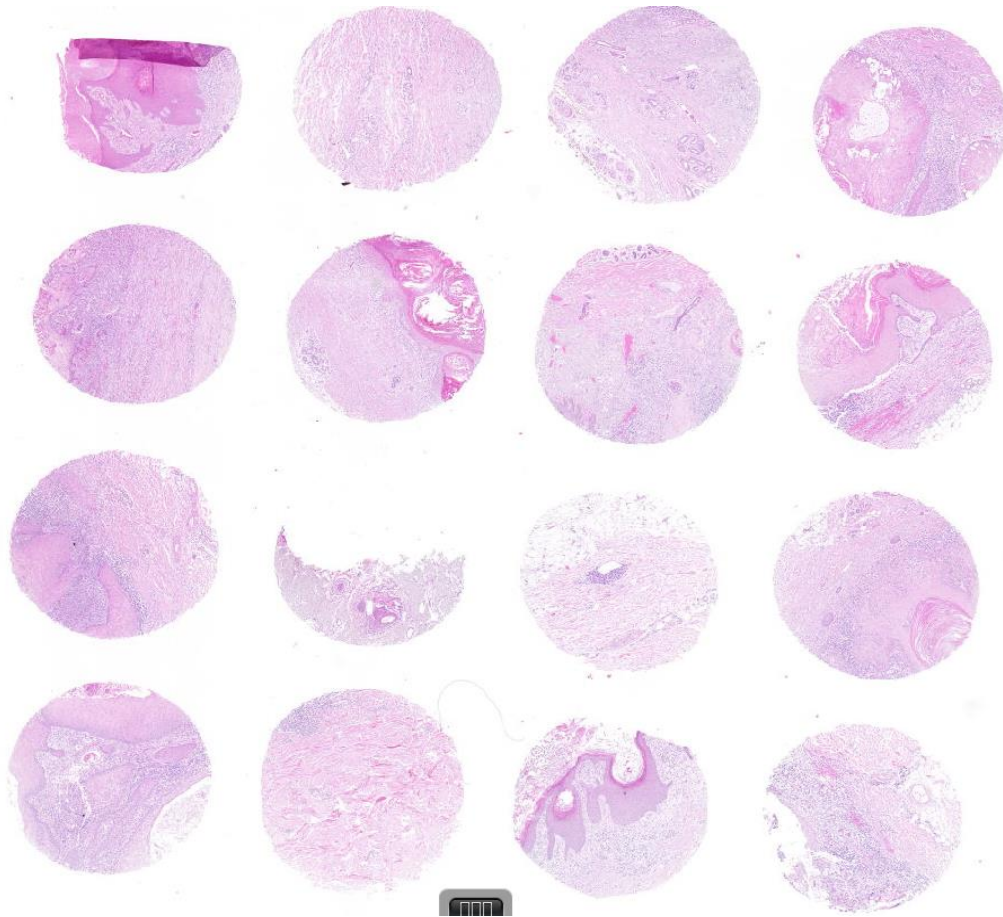


Figura 24. Fragmento del microarray JCF-1 teñido con H&E con 16 focos.

4.7 Tinciones Inmunohistoquímicas

Para la tinción inmunohistoquímica se utilizaron los anticuerpos CD8, CD57, CD163, FOXP3 y CD25 tal y como se detalla en la siguiente tabla.

Anticuerpo	Clona	Marca	Dilución y tiempo incubación	Desenmascaramiento
CD8	C8/144B	DAKO IR623	Listo para usar. 20 minutos.	PH elevado
CD57	TB01	DAKO	Listo para	PH elevado

MATERIAL Y MÉTODOS

		GA647	usar 20 minutos	
CD163	10D6	Abcam AB74604	Listo para usar 20 minutos	PH elevado
FOXP3	23JFK-16s	EBioscience 17-5773-82	1:75 20 minutos.	PH bajo
CD25	4C9	Gennova AP10094	1:50 30 minutos	PH elevado

Tabla 13. Anticuerpos utilizados, con descripción de los mismos (clon, marca, dilución, tiempo de incubación y desenmascaramiento).

Inicialmente se realizaron cortes de 4 μ m de grosor de cada uno de los tres TMA, los cuales se colocaron sobre portaobjetos adhesivos, específicos para técnicas inmunohistoquímicas.

Se realizó una preparación de las muestras: los cortes se mantuvieron durante 10 horas a 45 grados en la estufa, con el objetivo de fijar el tejido al portaobjetos. Se dejaron durante 20 minutos a temperatura ambiente, con posterior desparafinación en xilol durante 20 minutos y rehidratación con alcoholes decrecientes. A continuación, las muestras se lavaron con tampón PBS (tampón fosfato salino).

Posteriormente, se realizó el desenmascaramiento antigénico mediante la solución Target Retrieval Soluticon de Dako, con un pH de 9. Los diferentes portaobjetos se introdujeron durante 30 minutos en esta solución, incubando al baño maría. Tras esto, se enfriaron las muestras durante 20 minutos, con posterior aclaramiento en tampón PBS durante 5 minutos y también durante 5 minutos con agua destilada.

A continuación, se introdujeron las muestras en el autoteñidor Dako Omnis autotech, el cual efectúa la siguiente secuencia:

- a) Lavado con PBS.
- b) Incubación de las piezas con peróxido de hidrógeno 3% durante 5 minutos para inactivar la peroxidasa.

MATERIAL Y MÉTODOS

- c) Lavado con PBS.
- d) Incubación con cada uno de los anticuerpos primarios, según sus diferentes protocolos. Todos ellos se incubaron durante 30 minutos.
- e) Lavado con PBS.
- f) Incubación con polímero marcado con peroxidasa durante 20 minutos.
- g) Lavado con PBS x2.
- h) Incubación con cromógeno durante 10 minutos (Fex DAB).
- i) Lavado con PBS.
- j) Contratinción con hematoxilina (FLEX) durante 5 minutos.
- k) Lavado con PBS.
- l) Lavado con agua destilada.

Finalmente se deshidrataron los portaobjetos en alcoholes crecientes con xilol.

La técnica de doble tinción con FOXP3 y CD25 también se realizó a través del autoteñidor Dako Omnis, tras desparafinación en xilol, rehidratación con alcoholes decrecientes y desenmascaramiento antigénico. La secuencia realizada por el autoteñidor fue la siguiente:

- a) Lavado con PBS.
- b) Incubación de las piezas con peróxido de hidrógeno 3% durante 5 minutos para inactivar la peroxidasa.
- c) Lavado con PBS.
- d) Incubación con FOXP3 durante 30 minutos.
- e) Lavado con PBS.
- f) Incubación con polímero marcado con peroxidasa durante 20 minutos.
- g) Lavado con PBS x2.
- h) Incubación con cromógeno durante 10 minutos (DAB)

MATERIAL Y MÉTODOS

- i) Lavado con PBS.
- j) Contratinción con hematoxilina (FLEX) durante 5 minutos.
- k) Lavado con PBS.
- l) Lavado con agua destilada.
- m) Lavado con PBS.
- n) Incubación de las piezas con peróxido de hidrógeno 3% durante 5 minutos para inactivar la peroxidasa.
- o) Lavado con PBS.
- p) Incubación con CD25 durante 30 minutos.
- q) Lavado con PBS.
- r) Incubación con polímero marcado con peroxidasa durante 20 minutos.
- s) Lavado con PBS x2.
- t) Incubación con cromógeno durante 10 minutos (Magenta Dako).
- u) Lavado con PBS.
- v) Contratinción con hematoxilina (FLEX) durante 5 minutos.
- w) Lavado con PBS.
- x) Lavado con agua destilada.

Finalmente se deshidrataron los portaobjetos en alcoholes crecientes con xilol.

El autoteñidor Dako Omnis requiere la introducción de los distintos portaobjetos y de las tinciones en los pocillos; seguidamente se selecciona el programa correcto.



Figura 25. Autoteñidor Dako Omnis.

Los resultados de los distintos portaobjetos con sus tinciones IHQ fueron escaneados utilizando el sistema automatizado Pannoramic MIDI II.



Figura 26. Sistema automatizado Pannoramic MIDI II.

4.8 Evaluación de las muestras, almacenamiento de datos y análisis estadístico

Se procedió a la evaluación del grado de expresión de cada uno de los autoanticuerpos (CD8, CD57, CD163, FOXP3 y CD25) en las distintas piezas. Esto se realizó a través de un microscopio óptico del HGURS, observando los tres microarrays a diferentes aumentos.



Figura 27. Microscopio óptico utilizado para el análisis de las muestras.

Para ello, se seleccionó el campo con mayor infiltrado inflamatorio en cada pieza de caso y se calculó con un aumento de 200 x el porcentaje de células teñidas respecto al total de infiltrado inflamatorio en cada uno de estos campos (en una escala del 1 al 100)¹⁵⁶. El procedimiento fue realizado por parte de J.C, residente de dermatología, que no conocía la distribución de los cilindros en los diferentes bloques de parafina.

Esta evaluación de las muestras teñidas fue realizada de manera análoga también por E.P, experto anatomopatólogo, que tampoco conocía la distribución de las muestras en los arrays. Los dos observadores eran independientes y no conocían el resultado de los valores dados por su compañero.

MATERIAL Y MÉTODOS

La media de los valores obtenidos por parte de cada investigador fue utilizada para el estudio estadístico.

Se combinaron los datos obtenidos con la distribución en la matriz de las diferentes piezas tumorales, y estos datos se introdujeron en la previamente formada base de datos de IBM SPSS Statistics, en su versión 26, junto con los datos clínicos e histológicos previamente recogidos en la misma.

Se trata de un estudio a doble ciego, ya que los datos estaban codificados y los dos evaluadores no conocían qué piezas estaban analizando. También eran ciegos los datos que se analizaron durante el estudio estadístico.

Las variables cualitativas se describieron en el estudio en forma de porcentajes. Las variables cuantitativas se describieron a través de la media y la desviación estándar.

Inicialmente se realizó estadística descriptiva, sin necesidad de realizar el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov debido al suficiente tamaño muestral.

Se tomó como referencia un p-valor menor o igual a 0.05 para establecer diferencias estadísticamente significativas.

Se efectuó un análisis univariante con el objetivo de comparar los grupos de CEC que metastatizaban con aquellos que no lo hacían, utilizando el test Chi cuadrado para realizar comparaciones con variables cualitativas y sus proporciones, como sexo, localización de la lesión, márgenes, invasión perineural, invasión dermoepidérmica y CECAR.

Para comparar los dos grupos (CEC metastásico vs no metastásico) en cuanto a variables numéricas, como edad, tamaño, espesor tumoral, % de expresión de los diferentes marcadores IHQ (CD8, CD163, CD57 y CD25+FOXP3) se realizó el test T de Student.

También se efectuó un análisis de regresión logística para CEC que metastatizaban y aquellos que no lo hacían, con respecto a todas las variables anteriormente descritas.

Asimismo, se calcularon los residuos tipificados corregidos. Aquellas celdas que tenían un valor tipificado menor que -1.96 o bien mayor que +1.96 se interpretaron como una asociación estadísticamente significativa.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para evaluar las diferencias entre CEC, queratoacantoma y queratosis actínicas en cuanto a variables cuantitativas (edad, tamaño, % de expresión de los diferentes marcadores IHQ) se utilizó el test de ANOVA y Bonferroni. Además, se realizó un análisis de regresión logística para comparar estos tres grupos.

Se utilizó el test Chi cuadrado para evaluar las diferencias entre CEC, queratoacantoma y queratosis actínicas en cuanto a variables cualitativas (sexo, localización de la lesión y márgenes). Asimismo, se calcularon los residuos tipificados corregidos. Aquellas celdas que tenían un valor tipificado menor que -1.96 o bien mayor que +1.96 se interpretaron como una asociación estadísticamente significativa.

Por último, se efectuó un análisis de regresión logística para CEC, queratoacantoma y queratosis actínicas, con respecto a todas las variables anteriormente descritas que mostraron asociación estadísticamente significativa en el análisis univariante.

4.11 Aspectos éticos

El estudio se diseñó siguiendo los principios de la declaración de Helsinki y el proyecto fue aprobado por el CEI del HGURS en octubre de 2020.

La realización del trabajo de investigación no conllevó riesgo físico alguno, ya que no existió proceso de experimentación, ni los pacientes fueron sometidos a ningún tipo de prueba complementaria. No se recogieron datos personales ni otros identificativos sobre el paciente, de manera que no fue necesaria la obtención del consentimiento informado de los pacientes.

La no participación en el estudio no conllevó ningún perjuicio ni cambio en la atención o seguimiento para los pacientes.

5. RESULTADOS

RESULTADOS

RESULTADOS

5.1 Estadística descriptiva de las variables clínicas e histológicas

5.1.2 Estadística descriptiva de toda la muestra

Se incluyeron un total de 146 pacientes con lesiones tumorales cutáneas, de los cuales 97 (66,4%) eran varones y 49 (33,6%) eran mujeres. Las cifras de edad de los pacientes estaban en el rango entre 42 y 102 años, con una edad media de 79 +/- 11 años.

En cuanto al tipo de lesión tumoral, 72 pacientes (49,3%) presentaban un CEC, 38 pacientes (26%) un queratoacantoma y 36 pacientes (24,7%) una queratosis actínica. El diámetro tumoral mínimo fue de 3 mm y el máximo de 54 mm, con una media de 14,48 +/- 9,55 mm. En total, 105 pacientes (71,9%) presentaban un diámetro tumoral menor de 2 cm, mientras que 40 pacientes (27,4%) tenían una lesión mayor o igual a 2 cm.

La localización tumoral se clasificó en dos grupos: 91 pacientes (62,3%) presentaban lesiones en áreas de no alto riesgo, mientras que 55 pacientes (37,7%) presentaban la lesión tumoral en áreas de alto riesgo para CEC (explicado en materiales y métodos).

En 132 casos (90,4%) no se evidenció infiltración tumoral en los márgenes quirúrgicos tras la resección completa de la pieza, mientras que en 14 pacientes (9,6%) sí que existía afectación de márgenes quirúrgicos.

Las variables que se detallan a continuación solo se recogieron para el subgrupo de CEC:

Para pacientes con CEC, en cuanto al espesor tumoral, el valor mínimo fue de 0,2 mm y el valor máximo de 15 mm, con una media de 5,29 +/- 3,29 mm. El grado de diferenciación de los diferentes CEC se codificó en dos subgrupos: 41 pacientes (56,9%) tenían un CEC bien diferenciado o moderadamente diferenciado y 31 pacientes (43,1%) presentaban un CEC escasamente diferenciado. De todos los pacientes con CEC, 37 no presentaron metástasis ganglionares y/o a distancia (51,4%) mientras que 35 casos sí desarrollaron metástasis (48,6%). La invasión perineural o perivascular solo apareció en 6 casos (8,3% del total de CEC) mientras que 66 casos (91,7) no la presentaban. En 33 casos (45,8% de los CEC) existía invasión más allá del nivel dermoepidérmico, mientras que en 39 casos (54,2%) no había infiltración de la grasa. Finalmente, 35 de los 72 casos de CEC (48,6%) cumplieron criterios para considerarse CECAR, mientras que los 37 restantes (51,4%) no se consideraron de alto riesgo.

RESULTADOS

Variable	Valores posibles	Resultados (%)
Sexo	Varón	97 (66,4%)
	Mujer	49 (33,6%)
Edad (años)	Media	79
Tipo lesión	CEC	72 (49,3%)
	Queratoacantoma	38 (26%)
	Queratosis actínica	36 (24,7%)
Tamaño (mm)	Media	14,48
Localización	Áreas no alto riesgo	91 (62,3%)
	Áreas alto riesgo	55 (37,7%)
Márgenes	Libres	132 (90,4%)
	Afectos	14 (9,6%)

Tabla 14. Análisis descriptivo de toda la muestra

Variable	Valores posibles	Resultados (%)
Espesor tumoral (mm)	Media	5,29
Grado diferenciación	Bien diferenciado o	41 (56,9%)
	Moderadamente dif.	
	Escasamente dif.	31 (43,1%)
Metástasis gg o a distancia	Sí	35 (48,6%)
	No	37 (54,1%)
Invasión perineural y/o perivascular	Si	6(8,3%)
	No	66 (91,7%)
Invasión dermoepidérmica	Si	33 (45,8%)
	No	39 (54,2%)
CECAR	Sí	35 (48,6%)
	No	37 (51,4%)

Tabla 15. Análisis descriptivo para el subgrupo de CEC.

RESULTADOS

5.1.3 Estadística descriptiva diferenciando según CEC metastásico o no metastásico

De entre todos los pacientes con CEC metastásico, 27 eran varones (77,1%) mientras que 8 eran mujeres (22,9%). La edad media al diagnóstico fue de 80 +/- 10 años, con un valor mínimo de 50 años y un máximo de 101 años.

El diámetro medio de los CEC metastásicos fue de 23,06 +/- 10,06 mm, con un valor mínimo de 5 mm y un valor máximo de 54 mm. La localización del primario fue en 8 casos (22,9%) en áreas de no alto riesgo, mientras que 27 pacientes (77,1%) las presentaban en áreas de alto riesgo.

En cuanto a la afectación de márgenes quirúrgicos, en el caso de los CEC metastásicos, en 28 pacientes (80%), los márgenes estaban libres, mientras que en 7 casos (20%) existían márgenes afectados.

El valor medio del espesor tumoral en mm fue de 6,74 +/-3,29, con un valor mínimo de 2 mm y un valor máximo de 15 mm. En cuanto al grado de diferenciación, en 9 casos (25,7%) se trataba de un tumor bien diferenciado, en 13 casos (37,1%) se trataba de una lesión moderadamente diferenciada y en 13 pacientes (37,1%) era un CEC escasamente diferenciado.

En 30 casos (85,7%) no existía invasión perineural ni perivascular, mientras que en 5 casos (14,3%) sí se halló esta infiltración. Con respecto a la invasión más allá de la dermis, en 5 casos no existía (14,3%), mientras que en 30 casos sí (85,7%).

De todos los CEC metastásicos, 28 (80%) reunían criterios para ser etiquetados como CECAR, mientras que los otros 7 (20%) CEC metastásicos no reunían criterios para ser etiquetados como tal.

De entre los pacientes con CEC que no metastatizaron, 28 eran varones (75,7%) mientras que 9 eran mujeres (24,3%). La edad media al diagnóstico fue de 86 +/- 10 años, con un valor mínimo de 49 años y un máximo de 102 años.

El diámetro medio de los CEC no metastásicos fue de 15,18 +/- 9,11 mm, con un valor mínimo de 3 mm y un valor máximo de 45 mm. Los tumores se encontraban en un 67,5% en áreas de no alto riesgo y en un 32,4% en áreas de alto riesgo.

RESULTADOS

En cuanto a la afectación de márgenes quirúrgicos, en el caso de los CEC no metastásicos, en 32 pacientes (86,5%), los márgenes estaban libres, mientras que en 5 casos (13,5%) existían márgenes afectados.

El valor medio del espesor tumoral para los CEC no metastásicos, en mm, fue de 3,91 +/-2,68 con un valor mínimo de 0,2 mm y un valor máximo de 12 mm. En cuanto al grado de diferenciación, en 18 casos (48,6%) se trataba de un tumor bien diferenciado, en 1 caso (2,7%) se trataba de una lesión moderadamente diferenciada y en 18 pacientes (48,6%) era un CEC escasamente diferenciado.

En 36 casos (97,3%) no existía invasión perineural ni perivascular, mientras que en 1 caso (2,7%) sí se halló esta infiltración. Con respecto a la invasión más allá de la dermis, en 28 casos no existía (75,7%), mientras que en 9 casos sí (24,3%).

De entre todos los CEC no metastásicos, 9 (24,3%) sí reunían criterios para ser etiquetados como CECAR, mientras que 28 CEC no metastásicos (75,7%) no reunían criterios para ser etiquetados como CECAR.

5.1.4 Estadística descriptiva diferenciando según el tipo de lesión tumoral (CEC, queratoacantoma, queratosis actínicas)

En el caso de CEC, 55 de los pacientes (76,4%) eran varones, mientras que 17 pacientes (23,6%) eran mujeres. La edad media fue de 83 +/- 10 años, con un valor mínimo de 49 y un máximo de 102. En cuanto al diámetro de la lesión, la media fue de 18,96 +/- 10,3 mm, con un mínimo de 3 mm y un máximo de 54 mm. Con respecto a la localización, en 33 casos (45,8%) el CEC se encontraba en áreas de no alto riesgo y en 39 casos (54,2%) en zonas de alto riesgo. Finalmente, en lo que respecta a los márgenes quirúrgicos, en 60 casos (83,3%) estaban libres de tumor, mientras que en 12 casos (16,7%) sí estaban infiltrados.

En el caso de queratoacantoma, 25 de los pacientes (65,8%) eran varones, mientras que 13 pacientes (34,2%) eran mujeres. La edad media fue de 73 +/- 12 años, con un valor mínimo de 42 y un máximo de 98. En cuanto al diámetro de la lesión, la media fue de 12,47 +/- 7,15 mm, con un mínimo de 4 mm y un máximo de 35 mm. Con respecto a la

RESULTADOS

localización, en 30 casos (78,9%), el queratoacantoma se encontraba en áreas de no alto riesgo y en 8 casos (21,1%) en zonas de alto riesgo. Finalmente, en lo que respecta a los márgenes quirúrgicos, en 36 casos (94,7%) estaban libres de tumor, mientras que en 2 casos (5,3%) sí estaban infiltrados.

Por último, en el caso de queratosis actínicas, 17 de los pacientes (47,2 %) eran varones, mientras que 19 pacientes (52,8 %) eran mujeres. La edad media fue de 79 +/- 10 años, con un valor mínimo de 51 y un máximo de 98. En cuanto al diámetro de la lesión, la media fue de 7,78 +/- 4,27 mm, con un mínimo de 3 mm y un máximo de 20 mm. Con respecto a la localización, en 28 pacientes (77,8%), la lesión se encontraba en áreas de no alto riesgo y en 8 casos (22,2%) en zonas de alto riesgo. Finalmente, en lo que respecta a los márgenes quirúrgicos, en 36 casos (100%) estaban libres de tumor.

5.2 Estadística analítica univariante de las variables clínicas e histológicas

5.2.1 Análisis univariante comparando CEC con metástasis y sin metástasis

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al sexo de los pacientes entre aquellos con CEC metastásico y no metastásico ($p=0,884$). En lo que respecta a la edad, sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas, de manera que los pacientes con metástasis tenían una edad media de 86 años y los pacientes con lesiones no metastásicas, una edad media de 80 años. El p-valor fue de 0,01.

El tamaño de los CEC era diferente según si estos no metastatizaban (media 15,18 mm) o si lo hacían (media 23,06 mm). El p-valor para esta diferencia fue de 0,001.

También se encontraron diferencias estadísticamente significativas según la localización de la lesión: el p-valor fue $< 0,001$. De entre los pacientes con CEC metastásicos, 8 (22,9%) presentaban las lesiones en áreas de no alto riesgo, mientras que 27 (77,1%) las presentaban en áreas de alto riesgo. Por el contrario, aquellos CEC no metastásicos se encontraban en un 67,5% en áreas de no alto riesgo y en un 32,4% en áreas de alto riesgo.

RESULTADOS

No existieron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo CEC metastásico y no metastásico en función de la presencia de márgenes quirúrgicos afectados. En el caso de los CEC metastásicos en 28 pacientes (80%) los márgenes estaban libres, mientras que en 7 casos (20%) existían márgenes afectados. En el caso de los CEC no metastásicos, en 32 pacientes (86,5%), los márgenes estaban libres, mientras que en 5 casos (13,5%) existían márgenes afectados. El p-valor para esta diferencia fue de 0,46.

Para la variable espesor tumoral, sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p < 0,001$). El valor medio del espesor tumoral de los CEC metastásicos, en mm, fue de $6,74 \pm 3,29$, mientras que el valor medio para CEC no metastásicos fue de $3,91 \pm 2,68$ mm.

En cuanto al grado de diferenciación, no existían diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p = 0,32$). En el caso de CEC metastásicos, en 22 casos (62,8%) se trataba de un tumor bien o moderadamente diferenciado, mientras que en 13 casos (37,1%) se trataba de una lesión escasamente diferenciada. En el caso de CEC no metastásicos, en 19 casos (51,3%) se trataba de un tumor bien o moderadamente diferenciado, mientras que en 18 pacientes (48,6%) era un CEC escasamente diferenciado.

La infiltración perineural y/o linfática en el grupo de CEC metastásicos apareció en 5 casos (14,3%) y en el grupo no metastásico solo apareció en 1 caso (2,7%). No obstante, estas diferencias no alcanzaron significación estadística ($p = 0,07$).

Con respecto a la invasión más allá de la dermis, en el grupo de CEC metastásicos se evidenció esta invasión en 30 casos (85,7%) y en el grupo de CEC no metastásicos, en 9 casos (24,3%). Las diferencias entre ambos grupos sí fueron significativas, con $p < 0,001$.

En cuanto a la tipificación en CECAR, en el caso de los CEC metastásicos, el 28 (80%) de estos reunían criterios para ser etiquetados como CECAR, mientras que tan solo 9 (24,3%) de los CEC no metastásicos los reunían también. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,001$).

RESULTADOS

Variable	Valores Posibles	Metástasis	No metástasis	p-valor univariante (o residuo tipificado)
Sexo	Varón	27 (77,1%)	28 (75,7%)	0,884
	Mujer	8 (22,9%)	9 (24,3%)	
Edad	Años	86 +/- 10	80 +/- 10	0,01*
Diámetro	Mm	23,06 +/- 10,06	15,18 +/- 9,11	0,001*
Localización	No Alto Riesgo	8 (22,9%)	25(67,5%)	< 0,001*
	Alto Riesgo	27 (77,1%)	12(32,4%)	
Márgenes afectos	Sí	7 (20%)	5 (13,5%)	0,46
	No	28 (80%)	32 (86,5%)	
Espesor tumoral	Mm	6,74 +/- 3,29	3,91 +/- 2,68	< 0,001*
Grado diferenciación	Bien diferenciado	22 (62,8%)	19 (51,3%)	0,32
	Moderadamente diferenciado			
	Escasamente diferenciado	13 (37,1%)	18 (48,6%)	
Invasión perineural, perivascular	Sí	30 (85,7%)	1 (2,7%)	0,07
	No	5 (14,3%)	36 (97,3%)	
Invasión más allá de la dermis	Sí	30 (85,7%)	9 (24,3%)	< 0,001*
	No	5 (14,3%)	28 (75,7%)	
CECAR	Sí	28 (80%)	9 (24,3%)	< 0,001*
	No	7 (20%)	28 (75,7%)	

Tabla 16. Análisis univariante comparando CEC metastásicos y no metastásicos según las diferentes variables estudiadas.

RESULTADOS

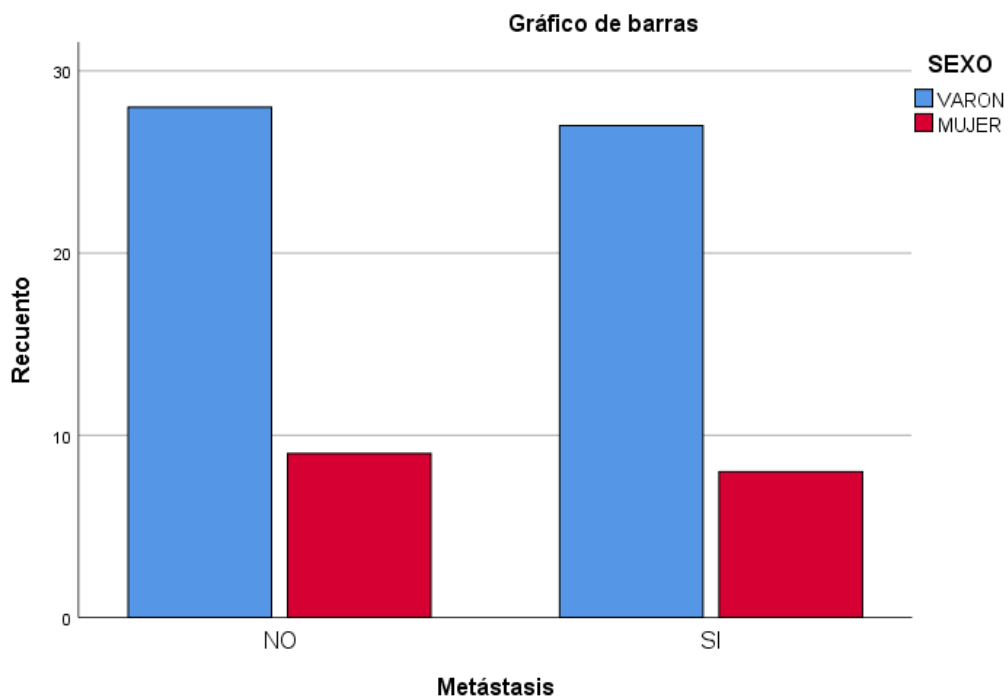


Figura 28. Gráfico de barras que representa la distribución del sexo en CEC metastásicos y no metastásicos.

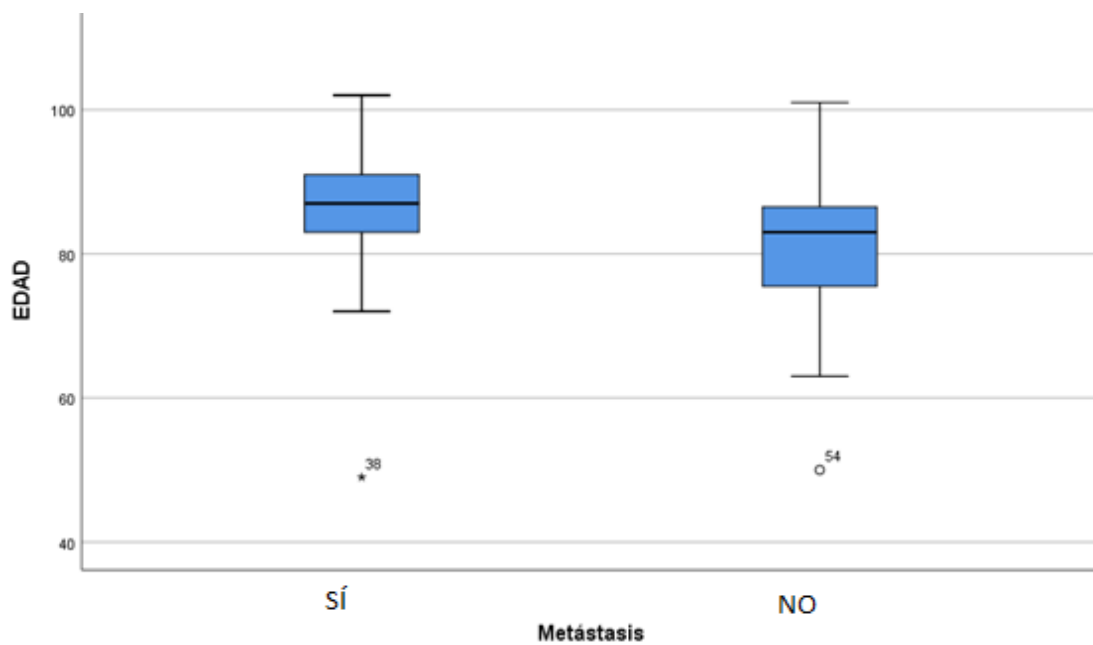


Figura 29. Diagrama de cajas que representa la distribución de las edades CEC metastásicos y no metastásicos.

RESULTADOS

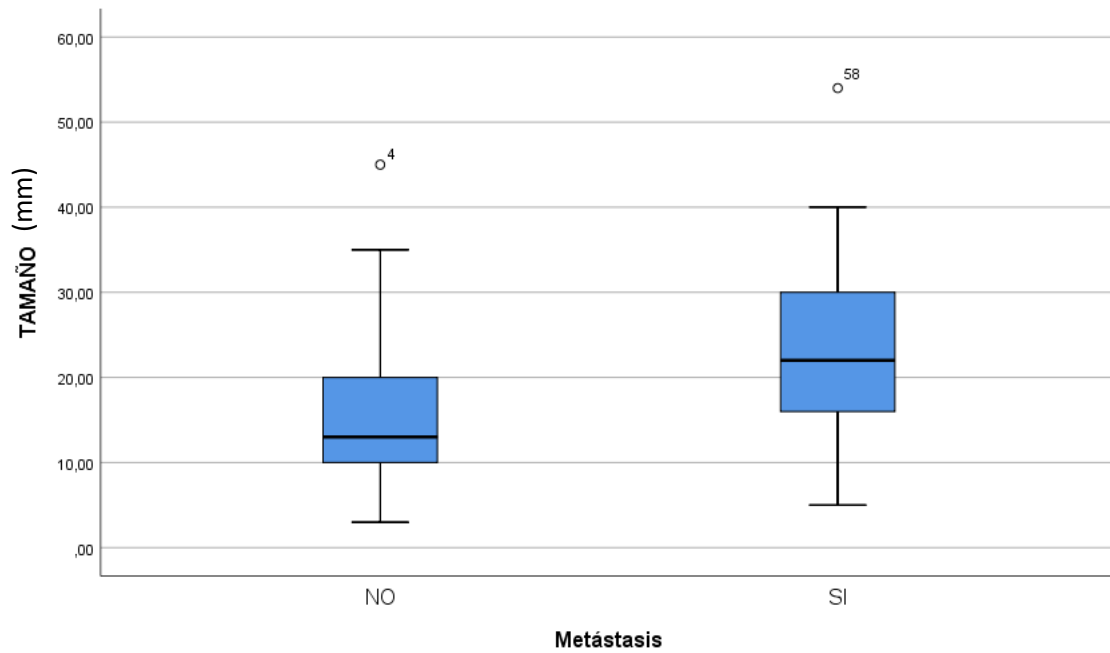


Figura 30. Diagrama de cajas que representa la distribución del tamaño tumoral para CEC metastásicos y no metastásicos.

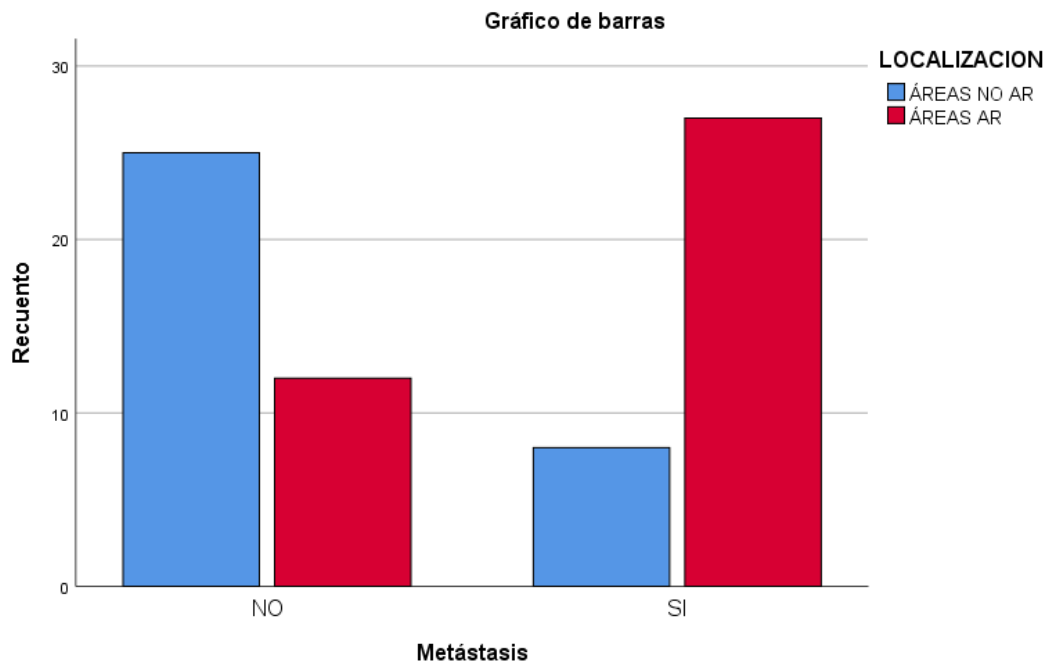


Figura 31. Gráfico de barras que representa la distribución de la localización tumoral en CEC metastásicos y no metastásicos.

RESULTADOS

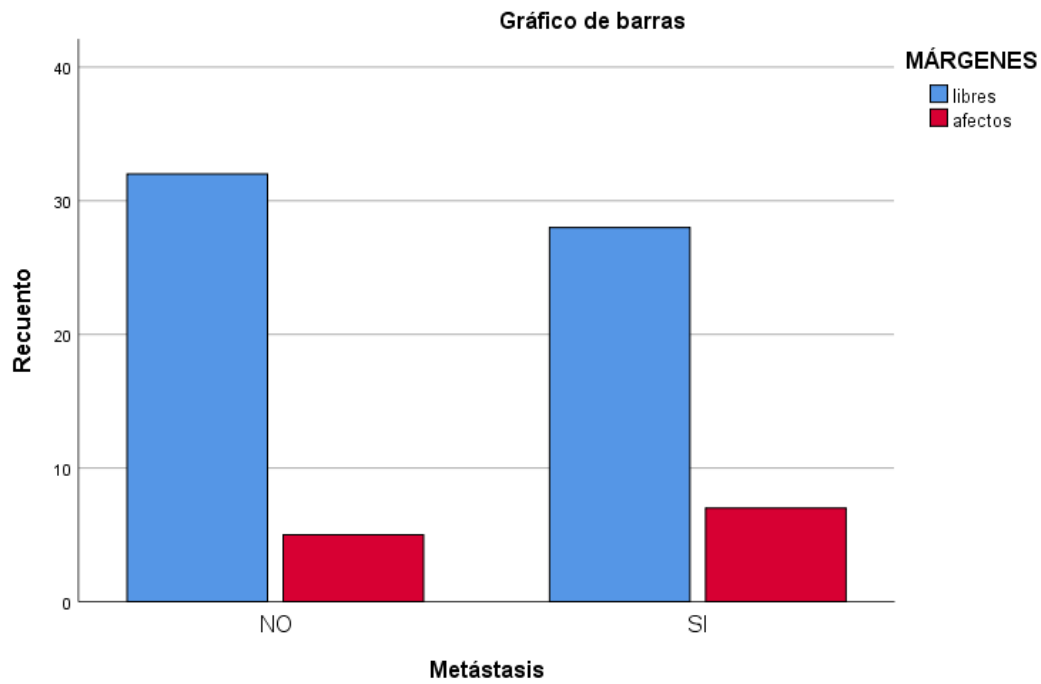


Figura 32. Gráfico de barras que representa la distribución de la afectación de márgenes en CEC metastásicos y no metastásicos.

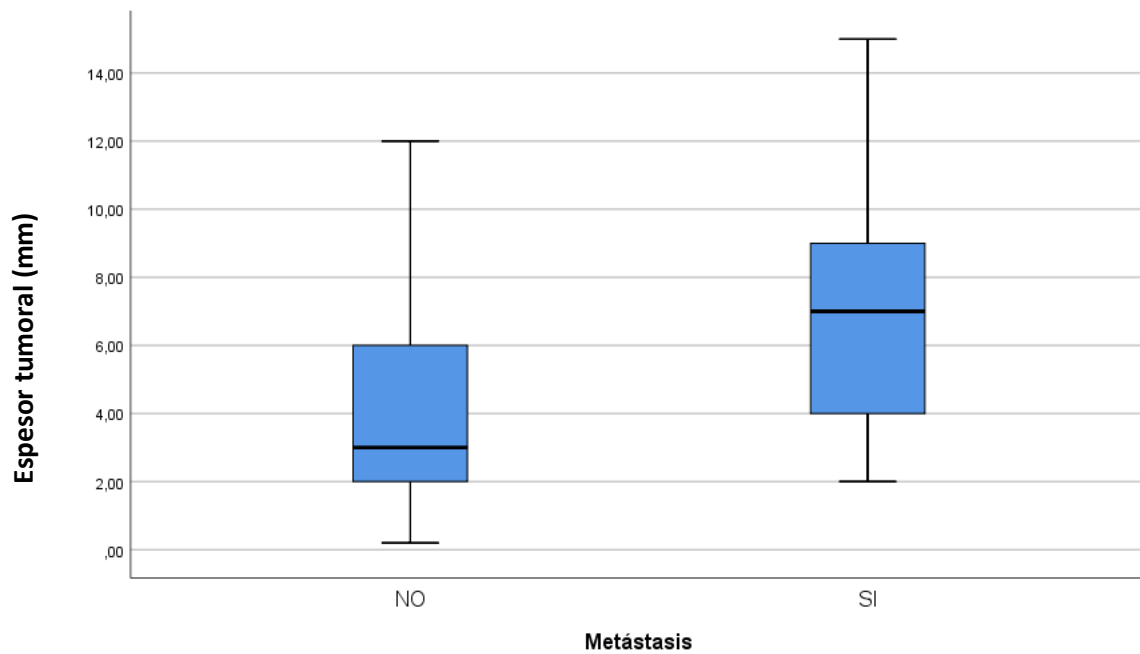


Figura 33. Diagrama de cajas que representa la distribución de CEC metastásicos y no metastásicos.

RESULTADOS

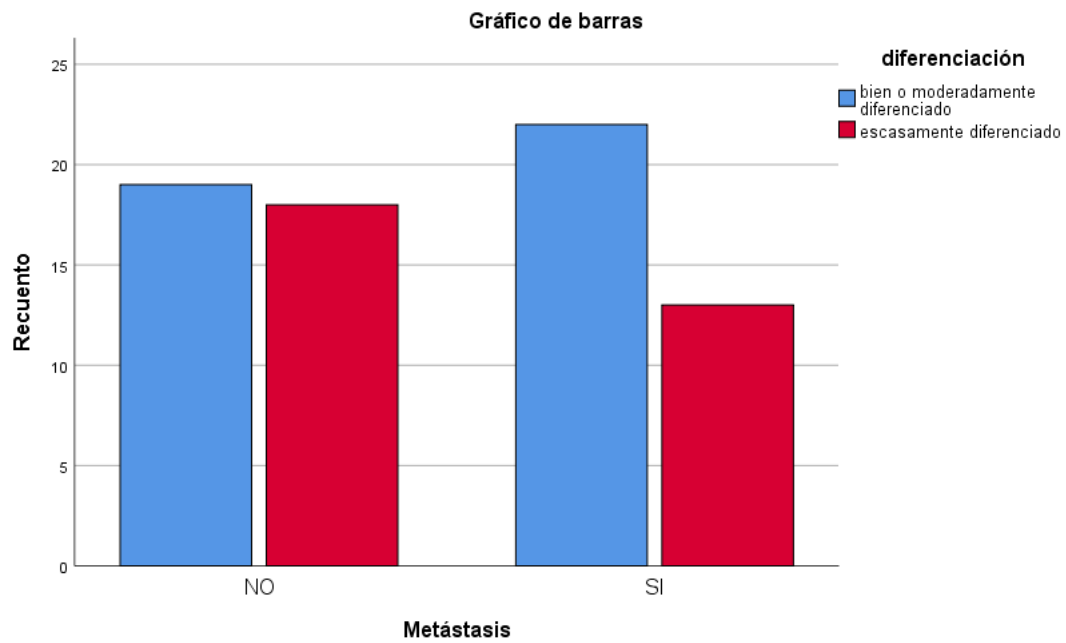


Figura 34. Gráfico de barras que representa la distribución del grado de diferenciación CEC metastásicos y no metastásicos.

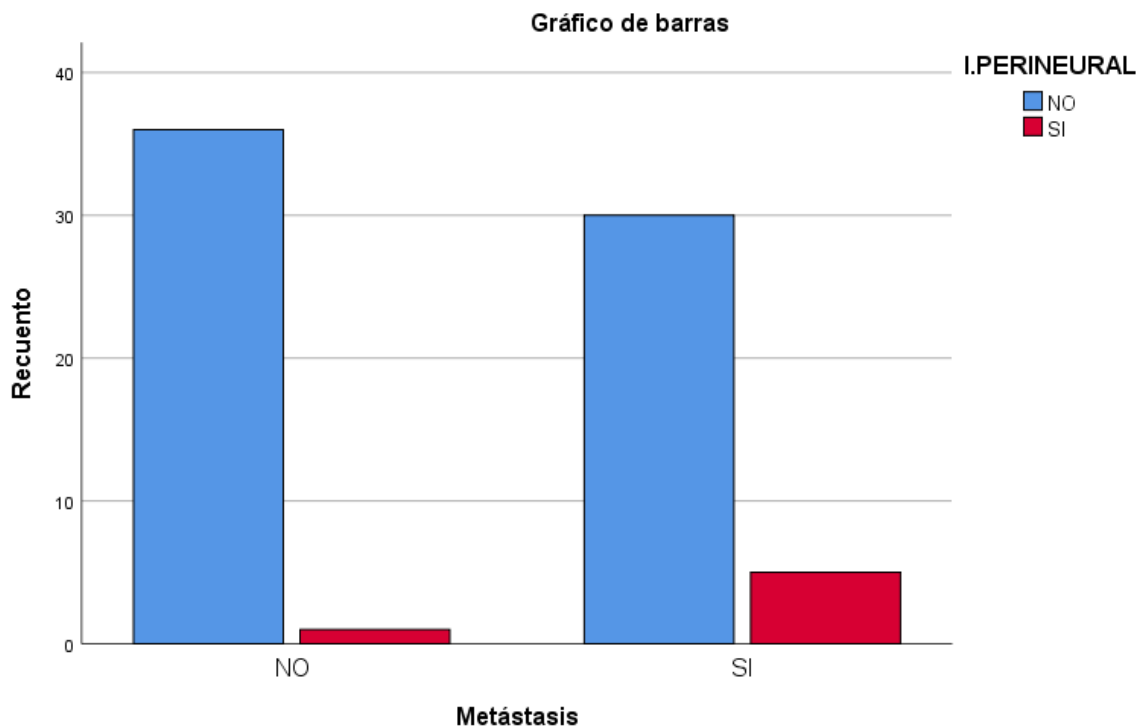


Figura 35. Gráfico de barras que representa la distribución de tumores con invasión perineural entre CEC metastásicos y no metastásicos.

RESULTADOS

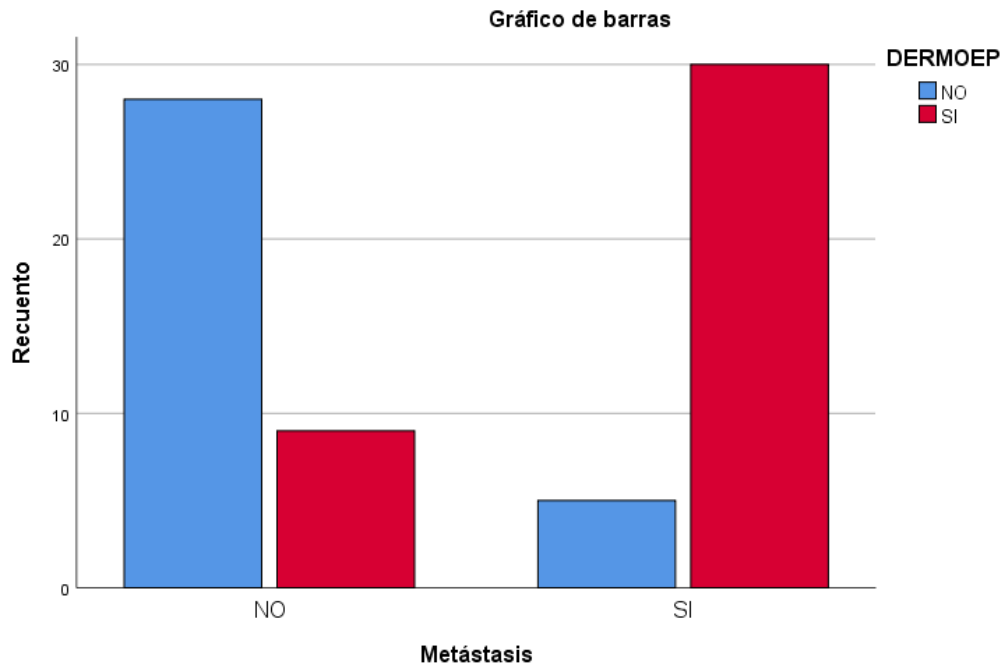


Figura 36. Gráfico de barras que representa la distribución de la invasión dermoepidérmica en CEC metastásicos y no metastásicos.

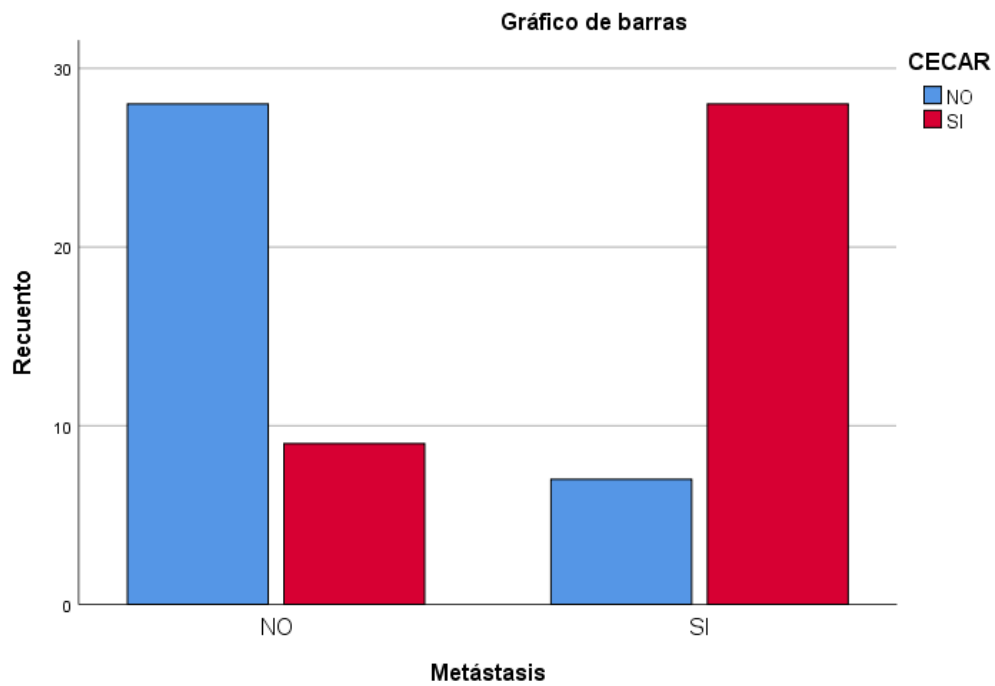


Figura 37. Gráfico de barras que representa la distribución de CECAR entre CEC metastásicos y no metastásicos.

RESULTADOS

5.2.2 Análisis univariante comparando CEC, QA y AK

En cuanto al sexo de los diferentes grupos, el caso de CEC, 55 de los pacientes (76,4%) eran varones, mientras que 17 pacientes (23,6%) eran mujeres. Para los queratoacantomas, 25 de los pacientes (65,8%) eran varones, y 13 pacientes (34,2%) eran mujeres. Por último, en el caso de queratosis actínicas, 17 de los pacientes (47,2 %) eran varones, mientras que 19 pacientes (52,8 %) eran mujeres. El p-valor global según el test ANOVA fue de 0,01. En las pruebas post hoc (Bonferroni) se evidenció que no existían diferencias estadísticamente significativas entre CEC y queratoacantoma (p-valor: 0,76), tampoco entre queratoacantomas y queratosis actínicas (p-valor: 0,10) pero sí las hubo entre CEC y queratosis actínica (p-valor: 0,007).

La edad media fue de 83 +/- 10 años, en el grupo de pacientes con CEC, de 73 +/- 12 años para queratoacantomas y de 79 +/- 10 años en las queratosis actínicas. Las diferencias entre los diferentes grupos sí fueron estadísticamente significativas (p-valor 0,00). En las pruebas post hoc (Bonferroni) se evidenció que sí existían diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la edad entre CEC y Queratoacantoma (p-valor: 0,00), también entre queratoacantoma y queratosis actínica (p-valor: 0,02) pero no las hubo entre CEC y queratosis actínica (p-valor 0,29).

En referencia al diámetro de la lesión, la media fue de 18,96 +/- 10,3 mm para CEC, 12,47 +/- 7,15 mm para queratoacantoma y 7,78 +/- 4,27 mm en queratosis actínicas. Las diferencias entre los diferentes grupos sí fueron estadísticamente significativas ($p < 0,001$). Subdividiendo según grupos, sí existían diferencias entre todos ellos: el p-valor entre CEC y queratoacantoma fue 0,001, entre CEC y queratosis actínica $< 0,001$ y entre queratoacantoma y queratosis actínica 0,05.

Con respecto a la localización, en 33 casos (45,8%) el CEC se encontraba en áreas de no alto riesgo, mientras que 39 casos (54,2%) estaba en zonas de alto riesgo. Para el grupo de los queratoacantomas, en 30 casos (78,9%), el queratoacantoma se encontraba en áreas de no alto riesgo y en 8 casos (21,1%) en zonas de alto riesgo. Para las queratosis actínicas, en 28 casos (77,8%) la lesión se encontraba en áreas de no alto riesgo y en 8 casos (22,2%) en zonas de alto riesgo, con un valor de $p < 0,001$. Sí se encontraron diferencias en cuanto a localización entre CEC y queratoacantoma (p-valor: 0,001), entre CEC y queratosis actínica (p-valor: 0,003). Pero no se encontraron diferencias

RESULTADOS

estadísticamente significativas entre queratoacantoma y queratosis actínica (p-valor: 1,00).

Finalmente, en lo que respecta a los márgenes quirúrgicos, en los CEC, en 60 casos (83,3%) estaban libres de tumor, mientras que en 12 casos (16,7%) sí estaban infiltrados. Para el queratoacantoma, en 36 casos (94,7%) estaban libres de tumor, mientras que en 2 casos (5,3%) sí estaban infiltrados y para la queratosis actínica, en 36 casos (100%) los márgenes sí estaban libres de tumor. El p-valor global para diferencias entre grupos según la afectación de márgenes fue de 0,01. Subdividiendo, las diferencias entre CEC y queratoacantoma no fueron estadísticamente significativas (p-valor: 0,06), tampoco lo fueron entre queratoacantoma y queratosis actínicas (p-valor 1,00), pero sí lo fueron entre CEC y queratosis actínicas (p-valor: 0,001).

Variable	Valores Posibles	CEC	Queratoacantoma	Queratosis actínica	p-valor univariante
Sexo	Varón	55 (76,4%)	25 (65,8%)	17 (47,2 %)	0,01*
	Mujer	17 (23,6%)	13 (34,2%)	19 (52,8 %)	
Edad	Años	83 +/- 10	73 +/- 12	79 +/- 10	<0,001*
Diámetro	Mm	18,96 +/- 10,3	12,47 +/- 7,15	7,78 +/- 4,27	<0,001*
Localización	No alto riesgo	33 (45,8%)	30 (78,9%)	28 (77,8%)	<0,001*
	Alto Riesgo	39 (54,2%)	8 (21,1%)	8 (22,2%)	
Márgenes afectados	Sí	12 (16,7%)	2 (5,3%)	0	0,01*
	No	60 (83,3%)	36 (94,7%)	36 (100%)	

Tabla 17. Análisis univariante comparando CEC, queratoacantomas y queratosis actínicas según las diferentes variables estudiadas

RESULTADOS

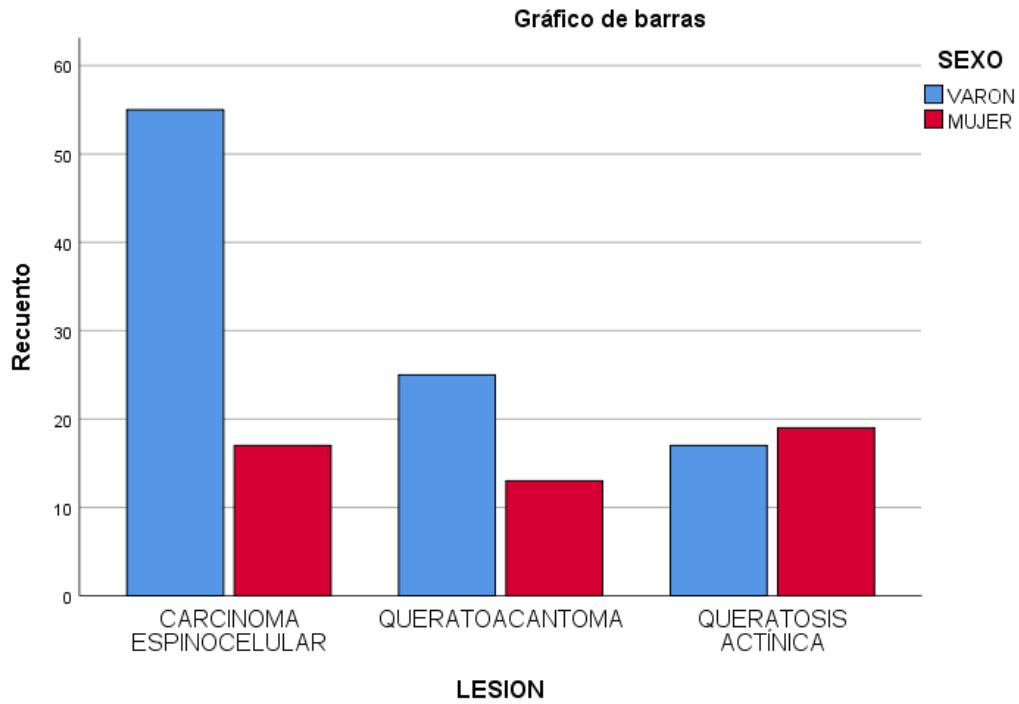


Figura 38. Gráfico de barras que representa la distribución del sexo entre CEC, queratoacantomas y queratosis actínicas.

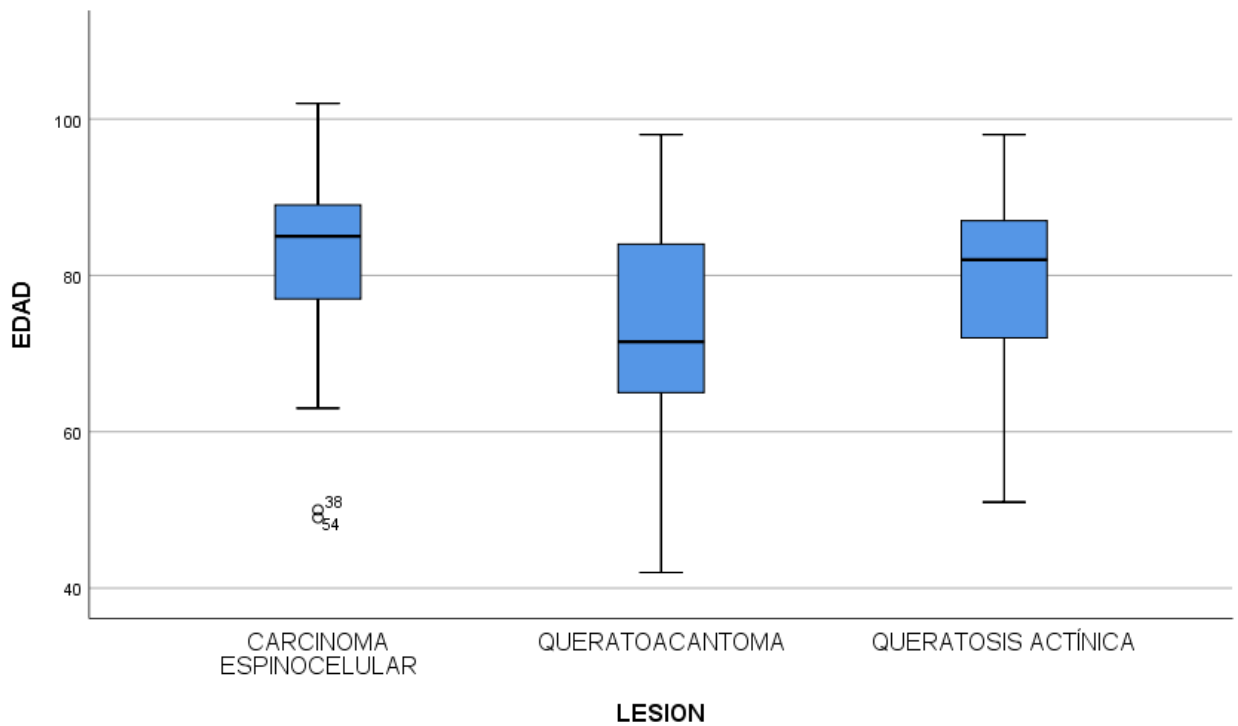


Figura 39. Diagrama de cajas que representa la distribución de la edad entre CEC, queratoacantomas y queratosis actínicas.

RESULTADOS

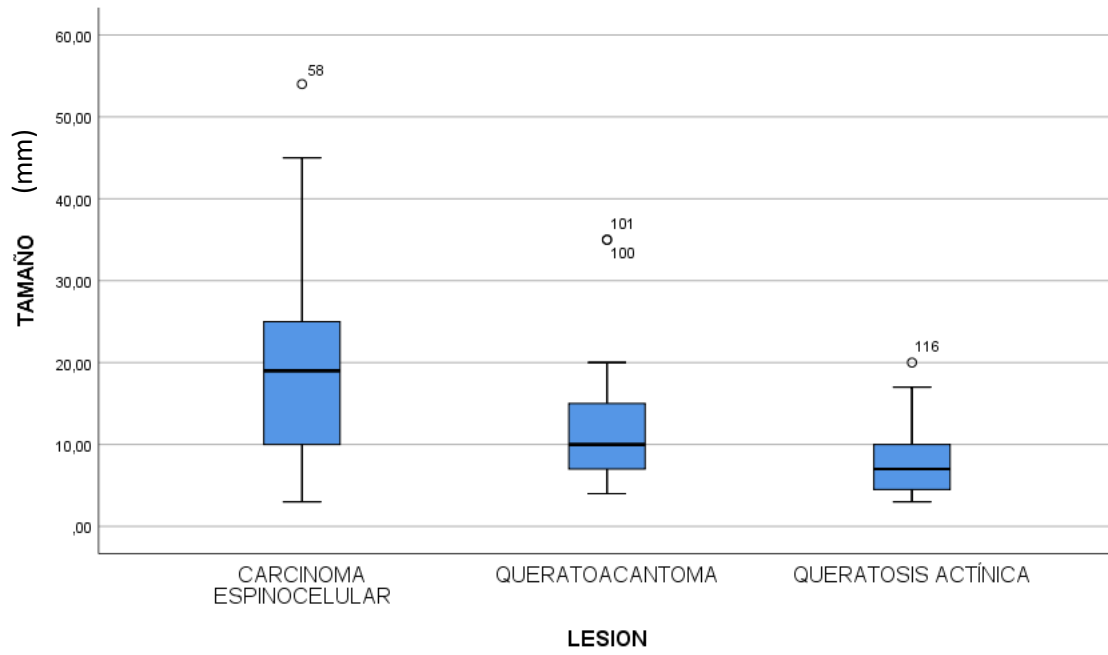


Figura 40. Diagrama de cajas que representa la distribución del tamaño de la lesión entre CEC, queratoacantomas y queratosis actínicas.

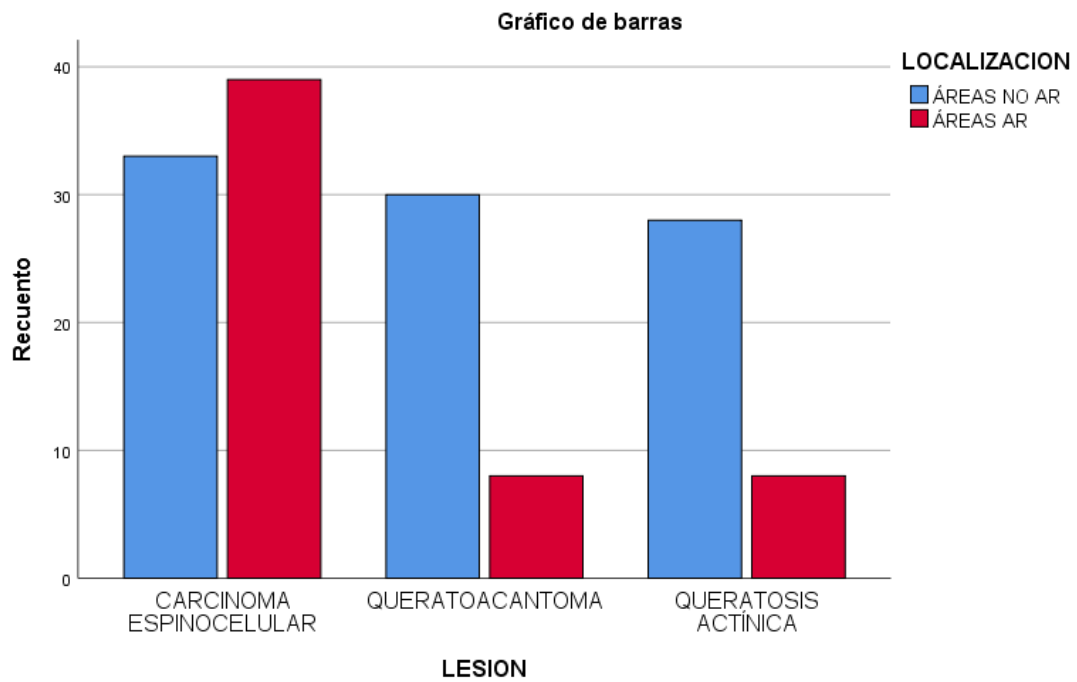


Figura 41. Gráfico de barras que representa la distribución de la localización tumoral entre CEC, queratoacantomas y queratosis actínicas.

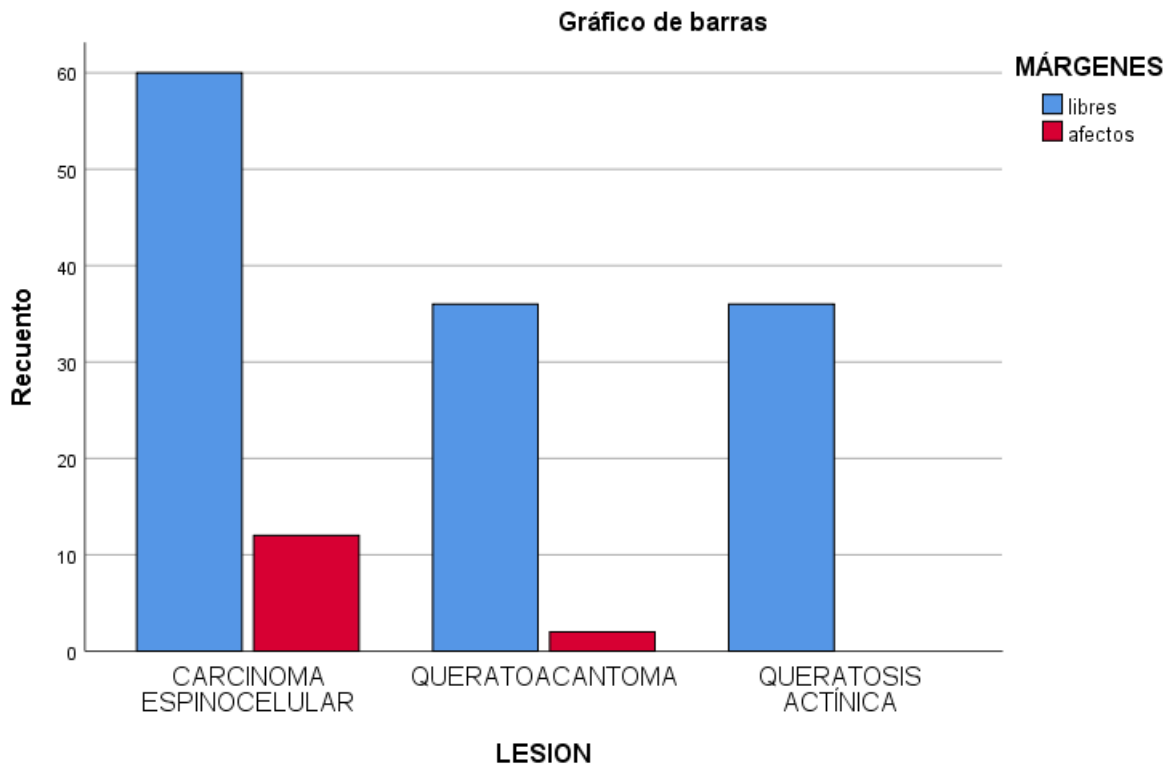


Figura 42. Gráfico de barras que representa la distribución de la afectación de márgenes quirúrgicos entre CEC, queratoacantomas y queratosis actínicas.

5.3 Estadística descriptiva del infiltrado inflamatorio asociado al tumor

Con el objetivo de conocer las poblaciones linfocitarias circundantes a los diferentes tipos de tumores, hemos utilizado una serie de marcadores inmunohistoquímicos: CD8, CD57, CD163 y FOXP3-CD25. La expresión de los diferentes marcadores inmunohistoquímicos se categorizó con un número, del 1 al 100 (porcentaje).

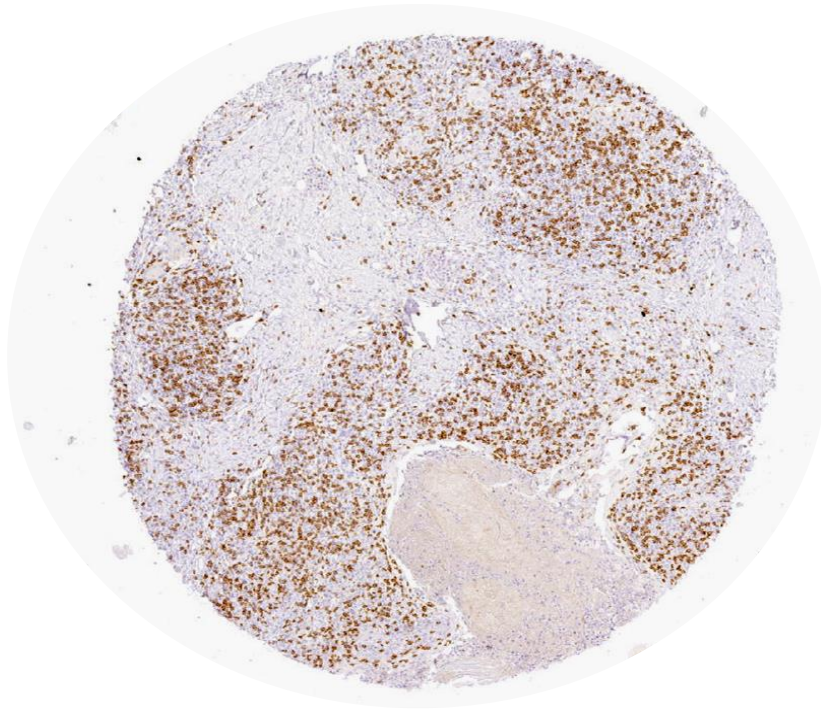


Figura 43. Uno de los focos incluidos en el estudio con intensa infiltración de células CD8 positivas.

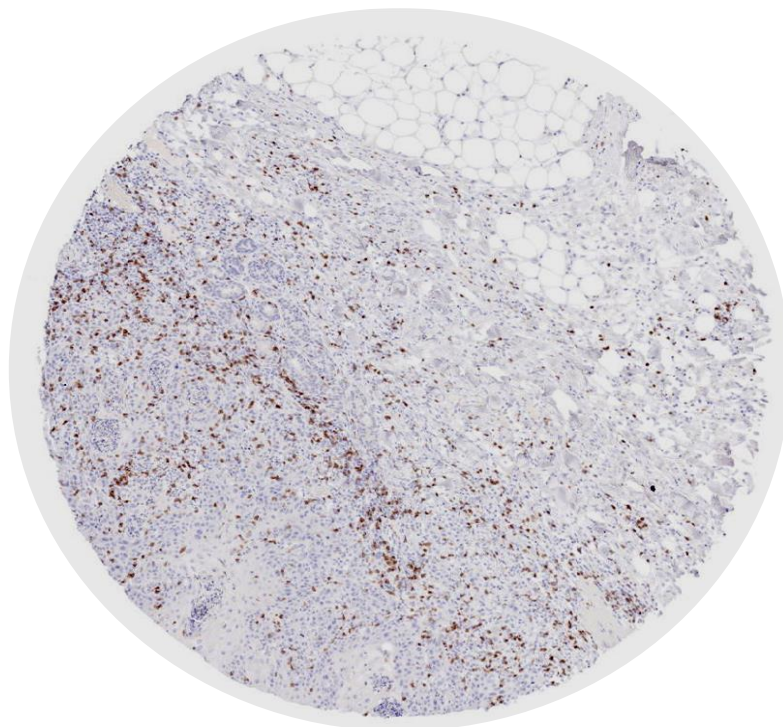


Figura 44. Uno de los focos incluidos en el estudio con moderada infiltración de células CD8 positivas.

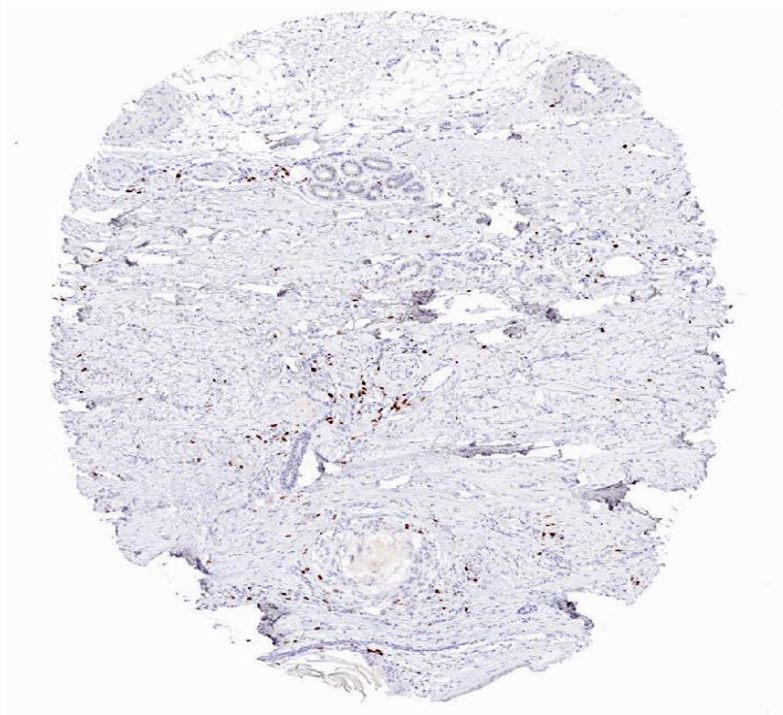


Figura 45. Uno de los focos incluidos en el estudio con escasa infiltración de células CD8 positivas.

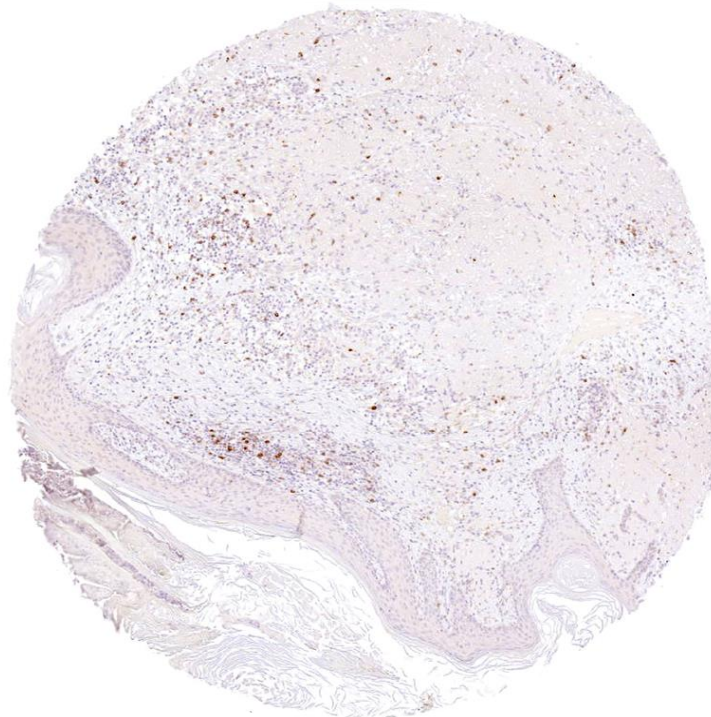


Figura 46. Uno de los focos incluidos en el estudio con moderada infiltración de células CD57 positivas.

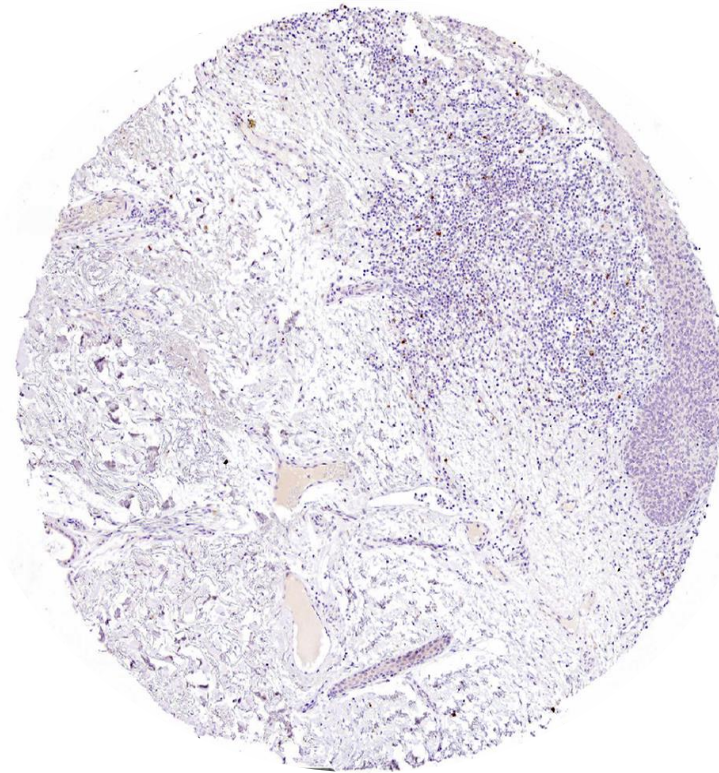


Figura 47. Uno de los focos incluidos en el estudio con escasa infiltración de células CD57 positivas.

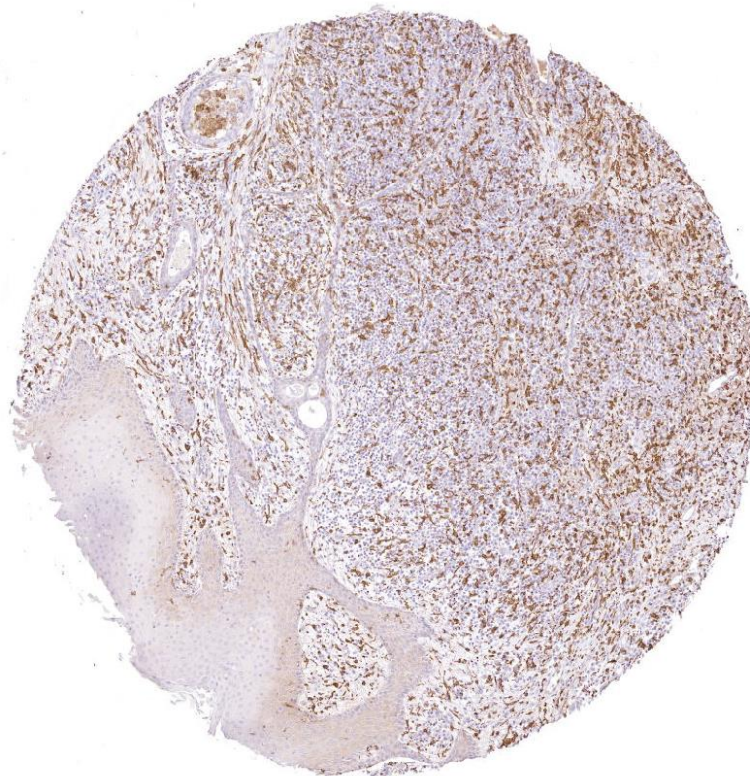


Figura 48. Uno de los focos incluidos en el estudio con intensa infiltración de células CD163 positivas.

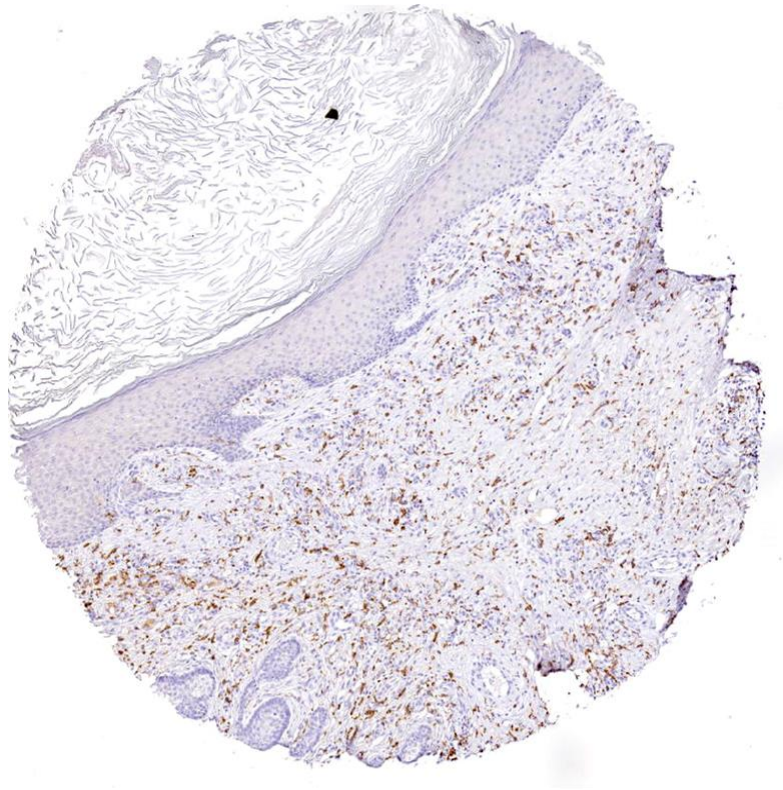


Figura 49. Uno de los focos incluidos en el estudio con moderada infiltración de células CD163 positivas.

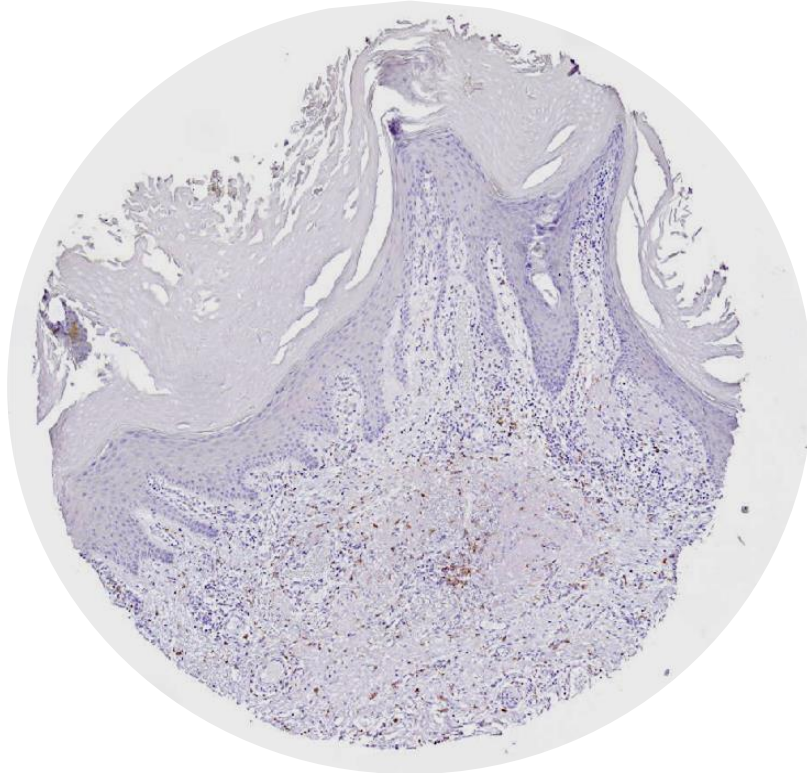


Figura 50. Uno de los focos incluidos en el estudio con escasa infiltración de células CD163 positivas.

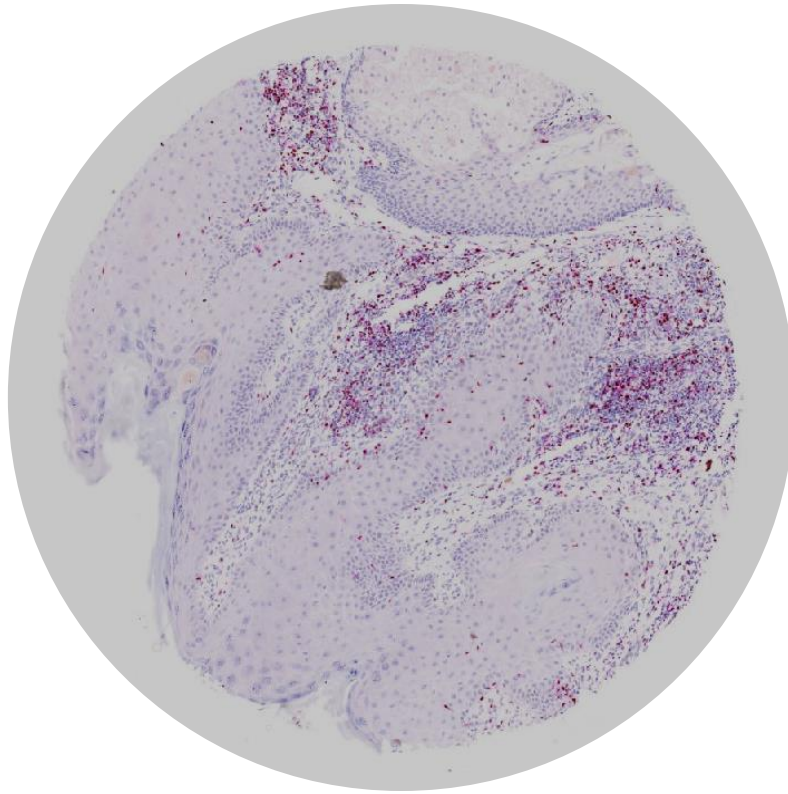


Figura 51. Uno de los focos incluidos en el estudio con intensa infiltración de células CD25-FOXP3 positivas.

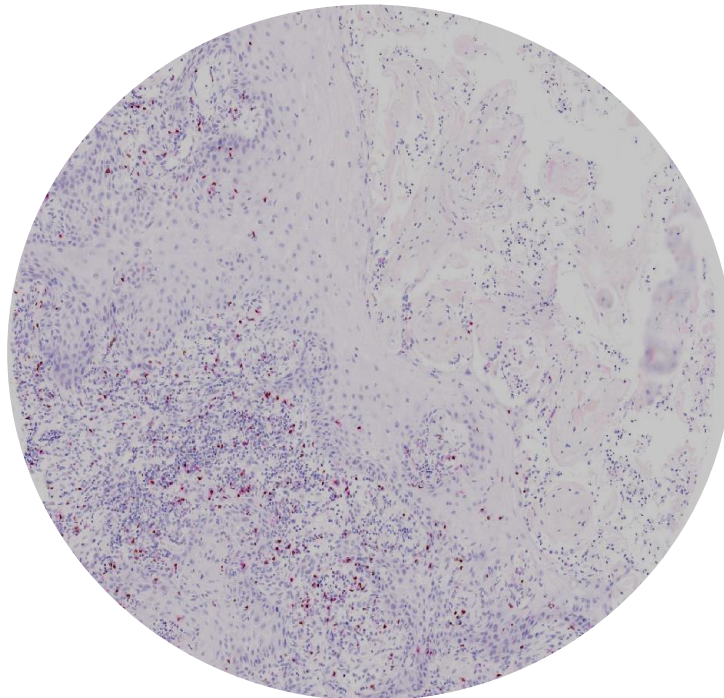


Figura 52. Uno de los focos incluidos en el estudio con moderada infiltración de células CD25-FOXP3 positivas

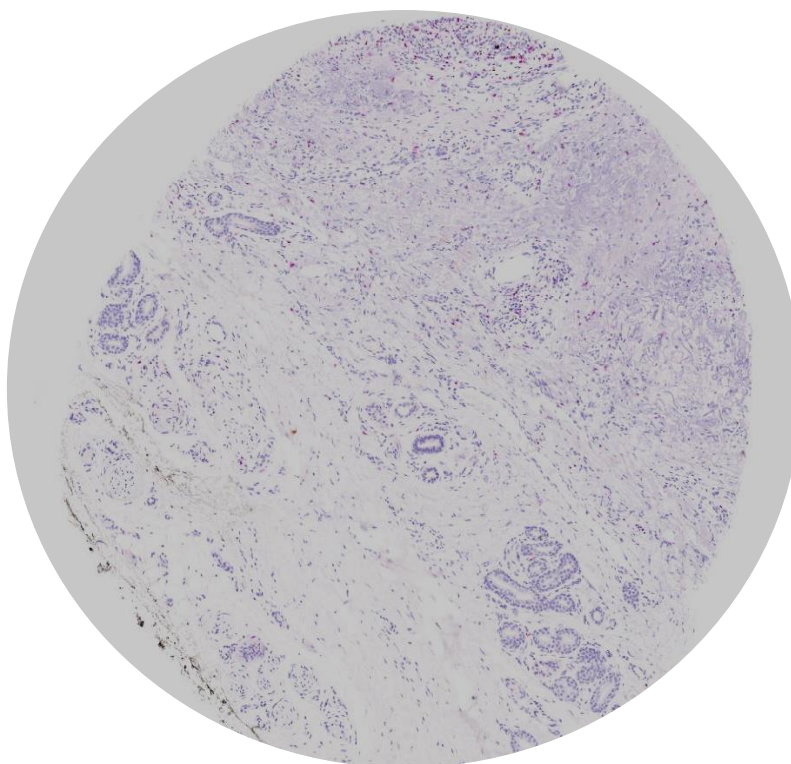


Figura 53. Uno de los focos incluidos en el estudio con escasa infiltración de células CD25-FOXP3 positivas

El infiltrado inflamatorio de toda la muestra estudiada se designó en forma de porcentaje del 1 al 100 para cada uno de los marcadores inmunohistoquímicos y como medida de tendencia central se evaluó la media +/- la desviación estándar.

En cuanto a los linfocitos CD8+, la media de expresión en toda la muestra fue de 40,28+/-27,01 %. En lo que respecta a CD163+, la media de expresión de este marcador en zona perilesional fue de 49,32+/-58,65%. Para CD57, la media de % de expresión del mismo fue de 9,48+/-8,59%. Por último, para FOXP3 y CD25+ la media de expresión en el infiltrado inflamatorio perilesional fue de 25,26+/-19,25%.

Marcador IHQ	Media % Expresión en toda la muestra
CD8	41,28+/-27,02
CD163	49,32+/-58,65
CD57	9,48+/-8,59
FOXP3+CD25	25,26+/-19,25

Tabla 18. Media del porcentaje de expresión de los diferentes marcadores en toda la muestra.

RESULTADOS

5.4 Estadística analítica univariante del infiltrado inflamatorio asociado al tumor

5.4.1 Estadística analítica univariante del infiltrado inflamatorio comparando CEC metastásicos y no metastásicos

Si comparamos el grupo de CEC metastásicos y no metastásicos, en cuanto a la expresión de CD8, vemos que la media de expresión de este marcador en CEC no metastásicos fue de 41,33 \pm 28,01% mientras que en CEC metastásicos fue de 24,33 \pm 18,63. Las diferencias entre ambos grupos sí fueron estadísticamente significativas (p-valor: 0,005).

En cuanto a la expresión de CD163, en el caso de pacientes con CEC no metastásico, la media en el porcentaje de expresión de este marcador fue 39,12 \pm 22,56% y en pacientes con CEC metastásico, de 74,14 \pm 112,22%. Las diferencias entre ambos grupos no fueron estadísticamente significativas (p-valor 0,071).

La expresión media de CD57 en pacientes con CEC no metastásico fue de 6,84 \pm 4,02% mientras que en pacientes con CEC metastásico, de 16,68 \pm 11,82%. Las diferencias entre ambos grupos sí fueron estadísticamente significativas (p< 0,001).

Finalmente, para células con co-expresión de CD25 y FOXP3, en el caso de CEC no metastásico, la media del porcentaje de células teñidas fue de 18,37 \pm 17,18% mientras que en CEC no metastásicos, la media fue de 41,19 \pm 20,77%. Las diferencias entre ambos grupos sí fueron estadísticamente significativas (p< 0,001).

Marcador IHQ	% Expresión en CEC no metastásicos	% Expresión en CEC metastásicos	p-valor univariante
CD8	41,33 \pm 28,01	24,33 \pm 18,63	0,005*
CD163	39,12 \pm 22,26	74,14 \pm 112,22	0,07
CD57	6,84 \pm 4,02	16,68 \pm 11,82	<0,001*
FOXP3+CD25	18,37 \pm 17,38	41,19 \pm 20,77	<0,001*

Tabla 19. Media del porcentaje de expresión de los marcadores IHQ en CEC metastásicos y no metastásicos, así como análisis univariante.

RESULTADOS

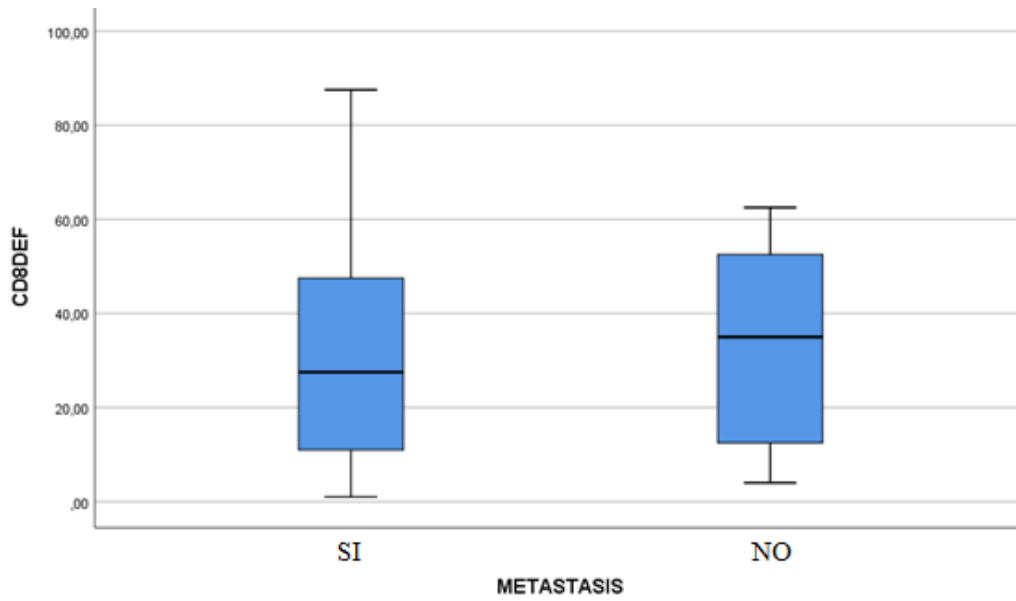


Figura 54. Diagrama de cajas que representa la expresión de CD8 en el infiltrado inflamatorio peritumoral entre CEC metastásicos y no metastásicos.

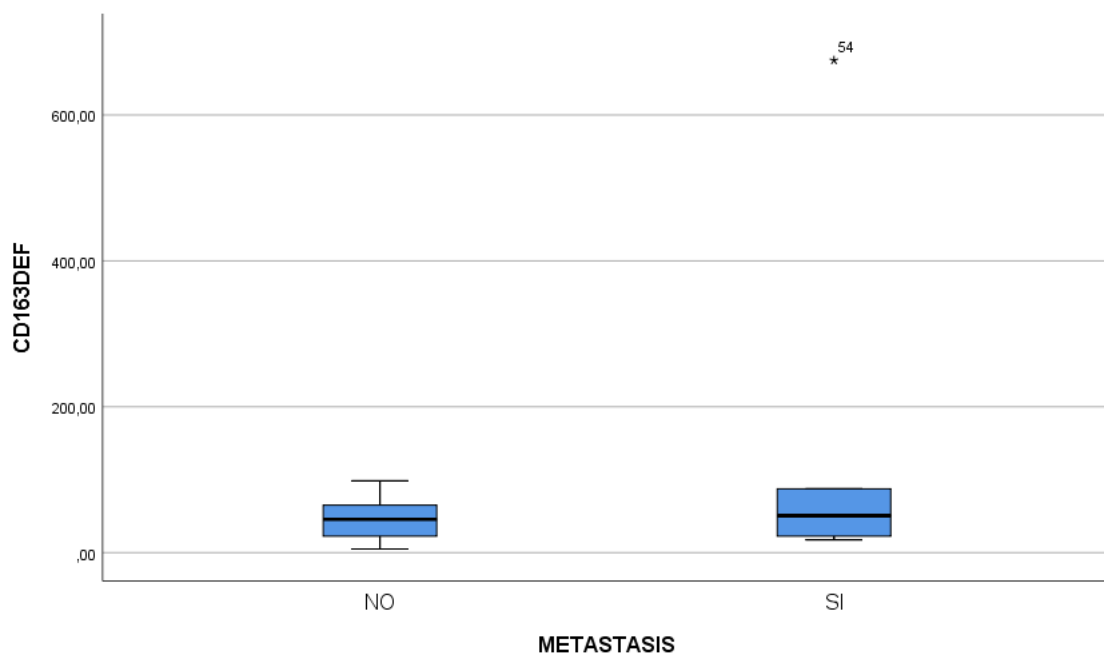


Figura 55. Diagrama de cajas que representa la expresión de CD163 en el infiltrado inflamatorio peritumoral entre CEC metastásicos y no metastásicos.

RESULTADOS

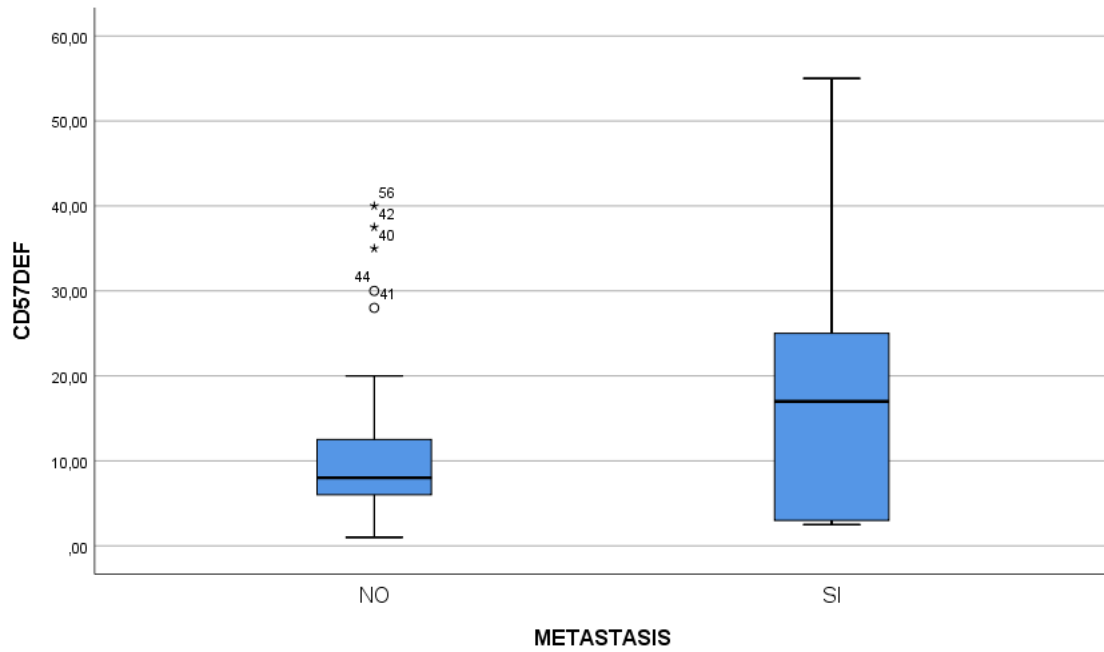


Figura 56. Diagrama de cajas que representa la expresión de CD57 en el infiltrado inflamatorio peritumoral entre CEC metastásicos y no metastásicos.

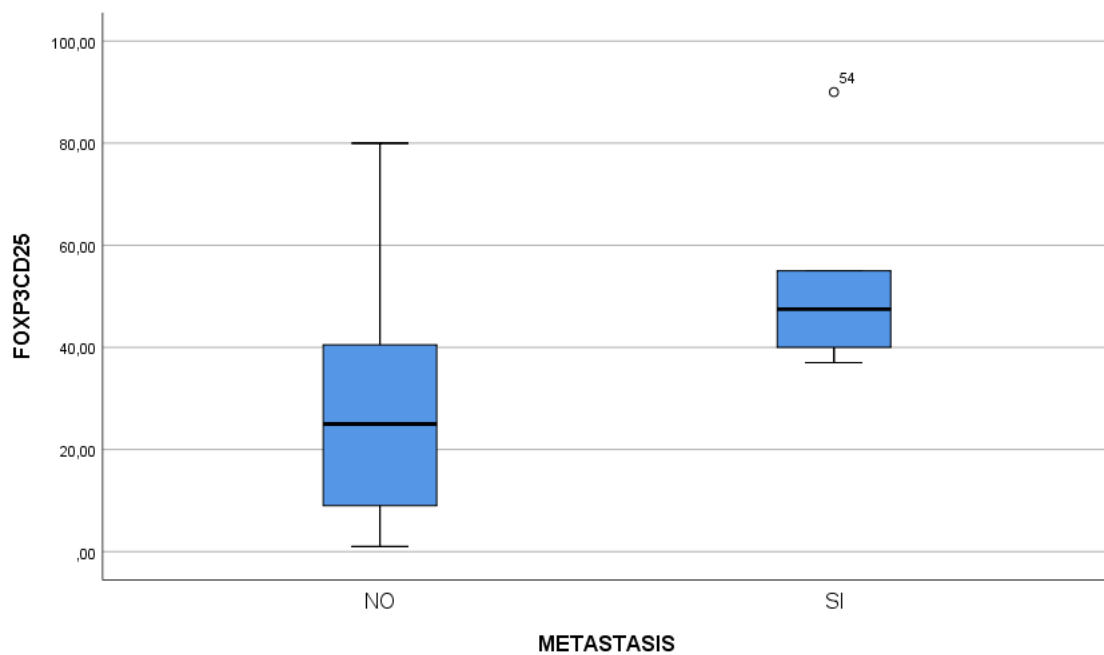


Figura 57. Diagrama de cajas que representa la expresión de FOXP3 y CD25 en el infiltrado inflamatorio peritumoral entre CEC metastásicos y no metastásicos.

RESULTADOS

5.4.2 Estadística analítica univariante del infiltrado inflamatorio comparando los tres tipos de lesiones (CEC, queratoacantoma y queratosis actínica)

Si comparamos los grupos de diferentes lesiones en cuanto a la expresión de CD8, vemos que la media de expresión de este marcador en CEC fue de 33,08%, en queratoacantomas fue de 44,53% mientras que en queratosis actínicas fue de 49,93%. Las diferencias entre grupos de lesiones dependiendo de la expresión de CD8 fueron estadísticamente significativas (p-valor 0,006). Concretamente, las diferencias entre CEC y queratosis actínicas (p-valor 0,008) si fueron estadísticamente significativas. No obstante, las diferencias entre CEC y queratoacantoma (p-valor: 0,098) y entre queratoacantomas y queratosis actínicas (p-valor 1,00) no fueron significativas.

En cuanto a la expresión de CD163, la media de expresión de este marcador en CEC fue de 55,61%, en queratoacantomas fue de 50,21%, mientras que en queratosis actínicas fue de 33,97%. Las diferencias entre grupos de lesiones dependiendo de la expresión de CD163 no fueron estadísticamente significativas (p-valor 0,243).

La expresión media de CD57 en pacientes con CEC fue de 11,62% en queratoacantomas fue de 5,92% mientras que en queratosis actínicas fue de 9,15%. Las diferencias entre grupos de lesiones dependiendo de la expresión de CD57 fueron estadísticamente significativas (p-valor 0,004). Concretamente, las diferencias entre CEC y queratoacantoma (p-valor: 0,003) fueron estadísticamente significativas. Las diferencias entre CEC y queratosis actínicas (p-valor 0,53) no fueron estadísticamente significativas y tampoco lo fueron las diferencias entre queratoacantomas y queratosis actínicas (p-valor 0,34).

Finalmente, para células con co-expresión de CD25 y FOXP3, en el caso de CEC, la media del porcentaje de células teñidas fue de 29,95%, en queratoacantomas fue de 21,79% mientras que en queratosis actínicas fue de 21,4%. Las diferencias entre grupos de lesiones dependiendo de la expresión de CD25 y FOXP3 no fueron estadísticamente significativas (p-valor 0,08).

RESULTADOS

	CEC	Queratoacantoma	Q. Actínica	P-valor
CD8	33,08	44,53	49,93	0,006*
CD163	55,61	50,21	33,97	0,243
CD57	11,62	5,92	9,15	0,004*
FOXP3CD25	29,95	21,79	21,4	0,08

Tabla 20. Media del porcentaje de expresión en de los diferentes marcadores IHQ entre CEC, queratoacantomas y queratosis actínicas, así como análisis univariante

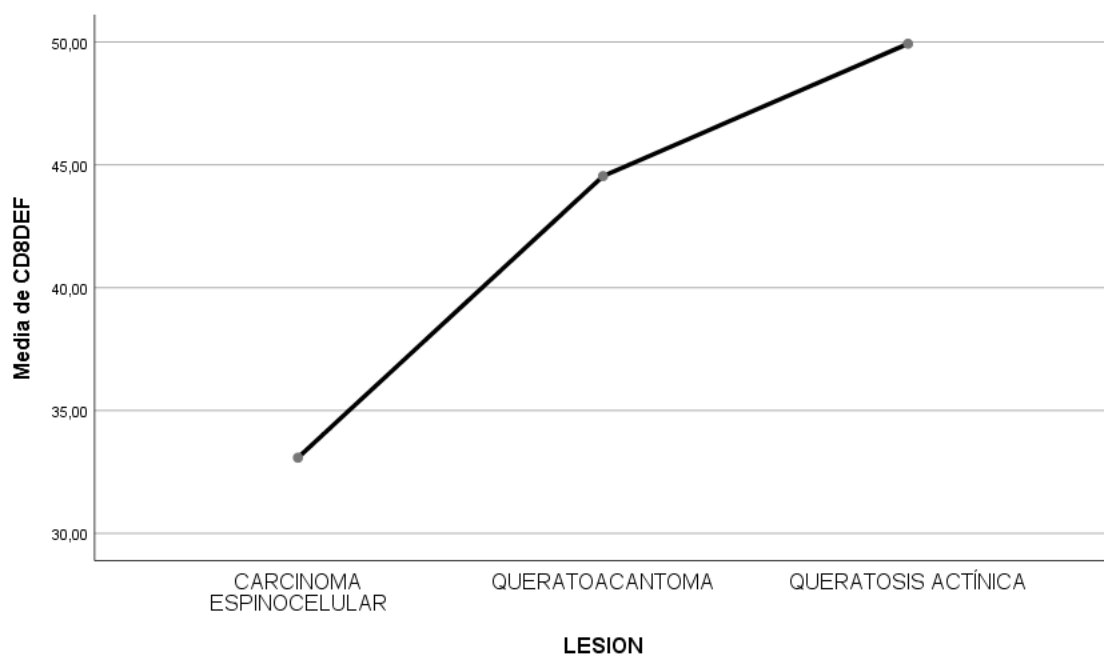


Figura 58. Gráfico de medias que representa la expresión de CD8 en el infiltrado inflamatorio peritumoral entre CEC, queratoacantomas y queratosis actínicas.

RESULTADOS

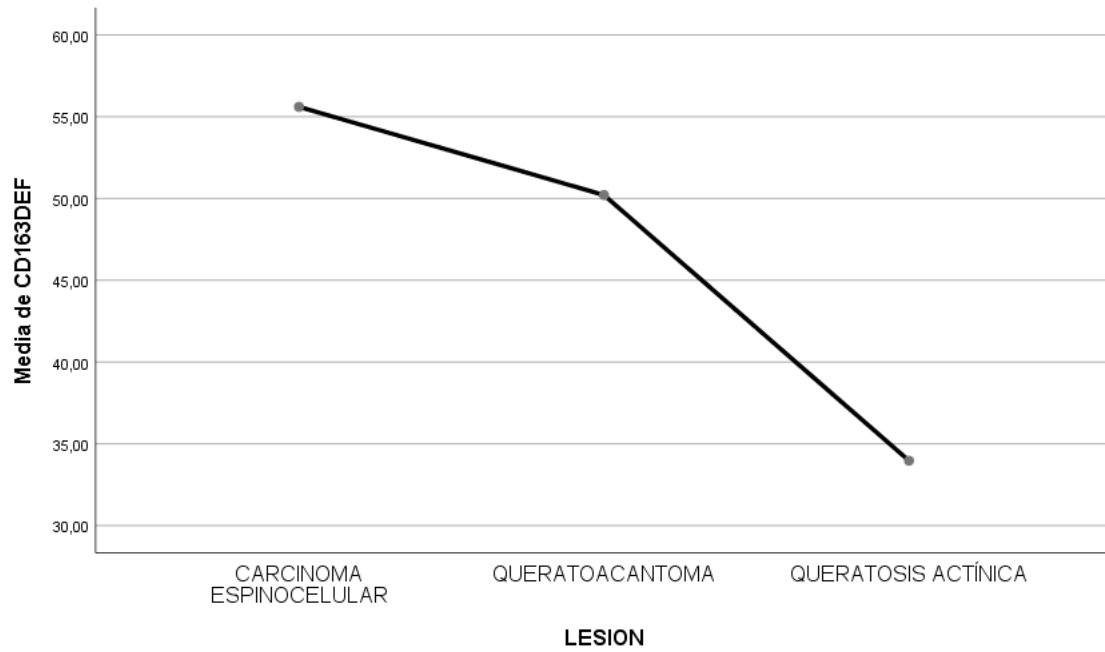


Figura 59. Gráfico de medias que representa la expresión de CD163 en el infiltrado inflamatorio peritumoral entre CEC, queratoacantomas y queratosis actínicas.

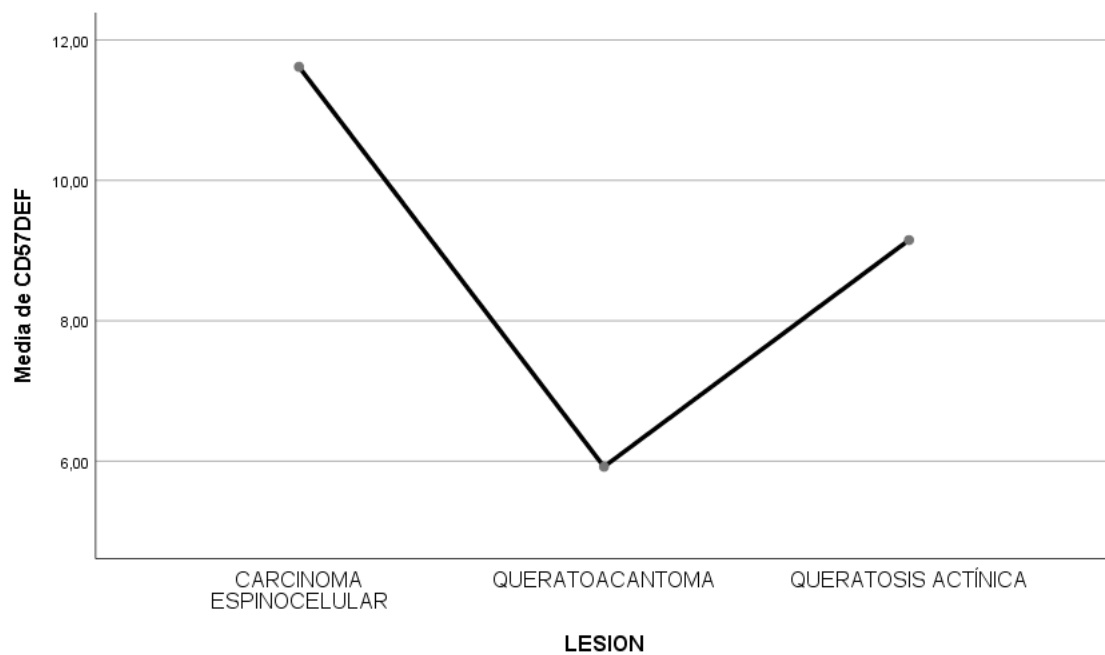


Figura 60. Gráfico de medias que representa la expresión de CD57 en el infiltrado inflamatorio peritumoral entre CEC, queratoacantomas y queratosis actínicas.

RESULTADOS

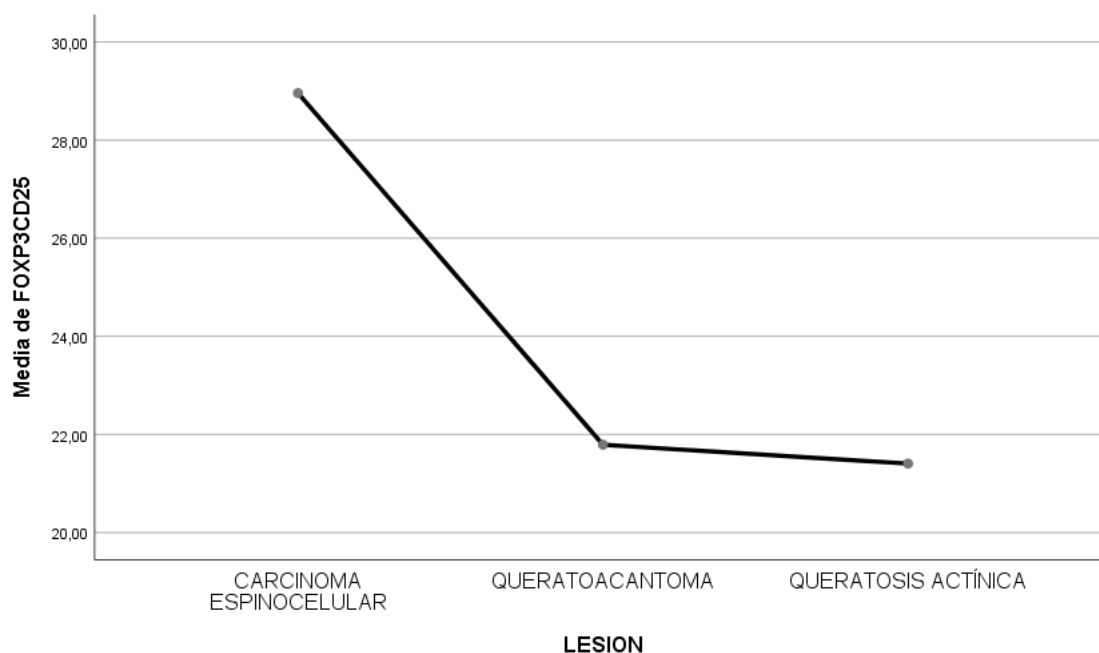


Figura 61. Gráfico de medias que representa la expresión de FOXP3 y CD25 en el infiltrado inflamatorio peritumoral entre CEC, queratoacantomas y queratosis actínicas.

5.5 Estadística multivariante

5.5.1 Estadística multivariante comparando CEC metastásico y no metastásico

Realizamos un análisis de regresión logística binaria incluyendo solo aquellas variables que tenían diferencias estadísticamente significativas en el análisis univariante.

Tal y como se aprecia en la tabla 21, no existieron diferencias estadísticamente significativas para pacientes con CEC metastásico y no metastásico para ninguna de las variables (todos los p-valores son superiores a 0,05).

Esto es así debido al escaso tamaño muestral de aquellos pacientes con CEC (n=72) y al gran número de variables incluidas en el análisis multivariante (9 variables). Teóricamente, por cada 15-25 pacientes se puede introducir una variable en el análisis multivariante, de manera que en nuestro análisis multifactorial solo se hubieran podido incluir 2-4 variables independientes.

RESULTADOS

	P-valor multivariante	OR	Intervalo confianza inferior	Intervalo confianza superior
Edad	0,193	0,645	0,334	1,248
Tamaño	0,306	1,371	0,750	2,508
Localización	0,583	0,198	0,001	64,362
Espesor	0,863	1,174	0,188	7,320
Invasión dermoepidérmica	0,738	0,096	0,000	87538,043
CECAR	0,557	0,018	0,000	11709,827
CD8	0,111	0,705	0,458	1,084
CD57	0,073	2,987	0,903	9,875
FOXP3 CD25	0,125	1,194	0,952	1,498

Tabla 21. Análisis multivariante comparando CEC metastásicos y no metastásicos en función de aquellas variables que fueron estadísticamente significativas en el análisis univariante.

5.5.2 Estadística multivariante comparando CEC, queratoacantoma y queratosis actínicas

En este análisis multivariante, la n fue de 146 (es decir, el total de pacientes de la muestra), por lo que sí se pudo realizar de manera efectiva el análisis de las seis variables que fueron estadísticamente significativas en el análisis univariante (sexo, edad, localización, tamaño y % de expresión de CD8, CD57).

En cuanto al sexo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre CEC y queratoacantoma y tampoco entre CEC y queratosis actínica ni entre queratoacantoma y queratosis actínica.

No obstante, sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la edad entre pacientes con CEC y queratoacantomas, de manera que mayor edad era factor protector para CEC en comparación con queratoacantoma (OR: 0,89). También se encontraron diferencias entre queratoacantoma y queratosis actínicas, con mayor edad como factor protector para queratoacantoma respecto a queratosis actínica (OR: 0,9).

RESULTADOS

La localización sí presentaba diferencias estadísticamente significativas entre queratoacantoma y CEC, con localización en zonas de alto riesgo como factor de riesgo para CEC en comparación con queratoacantoma (OR: 3,67). Del mismo modo, la localización en zonas de alto riesgo resultó ser factor de riesgo para CEC en comparación con queratosis actínicas (OR: 8,28). No existieron diferencias estadísticamente significativas en la localización de queratoacantomas vs queratosis actínicas.

No existieron diferencias en cuanto a tamaño entre CEC y queratoacantomas. Sí existieron diferencias en cuanto a este parámetro entre queratosis actínicas y CEC, con un OR de 0.18 como factor protector para CEC respecto a queratosis actínica. Del mismo modo, existieron diferencias entre queratoacantomas y queratosis actínicas, con un OR de 1,2, de manera que mayor tamaño resultaba factor de riesgo para queratoacantoma.

En cuanto a marcadores IHQ, para CD8 no existieron diferencias entre queratoacantoma y CEC, tampoco entre queratosis actínica y CEC ni entre queratoacantoma y queratosis actínicas.

Para CD57, sí existieron diferencias estadísticamente significativas entre algunos los grupos, de manera que una mayor expresión de este marcador se consideró factor protector para queratoacantoma respecto a CEC (OR: 0,85), del mismo modo que también se consideró factor protector para queratoacantoma respecto a queratosis actínicas (OR: 0,8). No existieron diferencias según este parámetro entre CEC y queratosis actínicas.

Variables	p-valor	OR	IC Inferior	IC superior
Sexo	0,14	2,4	0,75	7,7
Edad	<0,001*	0,891	0,840	0,946
Localización	0,035*	3,660	1,094	12,246
Tamaño	0,583	0,981	0,917	1,050
CD8	0,231	1,015	0,991	1,039
CD57	0,024*	0,853	0,743	0,979

Tabla 22. Análisis multivariante comparando queratoacantomas con CEC en función de aquellas variables que fueron estadísticamente significativas en el análisis univariante.

RESULTADOS

Variab les	p-valor	OR	IC Inferior	IC superior
Sexo	0,074	3,306	0,892	12,252
Edad	0,282	0,965	0,904	1,030
Localización	0,006*	8,279	1,817	37,720
Tamaño	0,001*	0,814	0,722	0,919
CD8	0,261	1,016	0,989	1,044
CD57	0,278	1,062	0,953	1,183

Tabla 23. Análisis multivariante comparando queratosis actínicas con CEC en función de aquellas variables que fueron estadísticamente significativas en el análisis univariante.

Variab les	p-valor	OR	IC Inferior	IC superior
Sexo	0,621	0,726	0,205	2,576
Edad	0,011*	0,924	0,869	0,982
Localización	0,316	0,442	0,090	2,183
Tamaño	0,003*	1,205	1,064	1,365
CD8	0,939	0,999	0,971	1,027
CD57	0,006*	0,804	0,687	0,940

Tabla 24. Análisis multivariante comparando queratoacantomas con queratosis actínicas en función de aquellas variables que fueron estadísticamente significativas en el análisis univariante.

5.6 Asociación entre marcadores IHQ y otras variables clínico-histológicas

5.6.1 Comparación poblaciones linfocitarias según la edad

Para evaluar si la edad modificaba la expresión de los diferentes marcadores inmunohistoquímicos de células inflamatorias, realizamos un estudio de correlación entre las distintas variables, sin encontrar diferencias que alcanzaran significación estadística para ninguno de los marcadores, excepto en el caso de CD163 (P-valor de 0,02), con un coeficiente de correlación de Pearson de -0,19, lo cual indica que se trata de una relación negativa y que el grado de relación entre ambas variables es escaso.

RESULTADOS

	p-valor	Pearson
CD8	0,27	-0,09
CD163	0,02*	-0.19
CD57	0,54	0,05
FOXP3CD25	0,45	-0,06

Tabla 25. Comparación de los diferentes marcadores IHQ según la edad

5.6.2 Comparación poblaciones linfocitarias según el espesor tumoral

Otro objetivo era comprobar si existía correlación entre el espesor tumoral y la expresión de los marcadores inmunohistoquímicos. Para el caso de CD8 y de FOXP3+CD25, no existía correlación entre estos factores y el espesor tumoral. No obstante, en el caso de CD163 sí, (con un coeficiente de Pearson de 0,25) y en el caso de CD57 el grado de asociación era todavía mayor (coeficiente de Pearson de 0,41), con una relación positiva. En la figura 62 expresamos la asociación estas dos últimas variables cuantitativas en forma de gráfico.

	p-valor	Pearson
CD8	0,33	-0,12
CD163	0,04*	0.25
CD57	<0,001*	0,41
FOXP3CD25	0,14	0,17

Tabla 26. Comparación de los diferentes marcadores IHQ según el espesor tumoral.

RESULTADOS

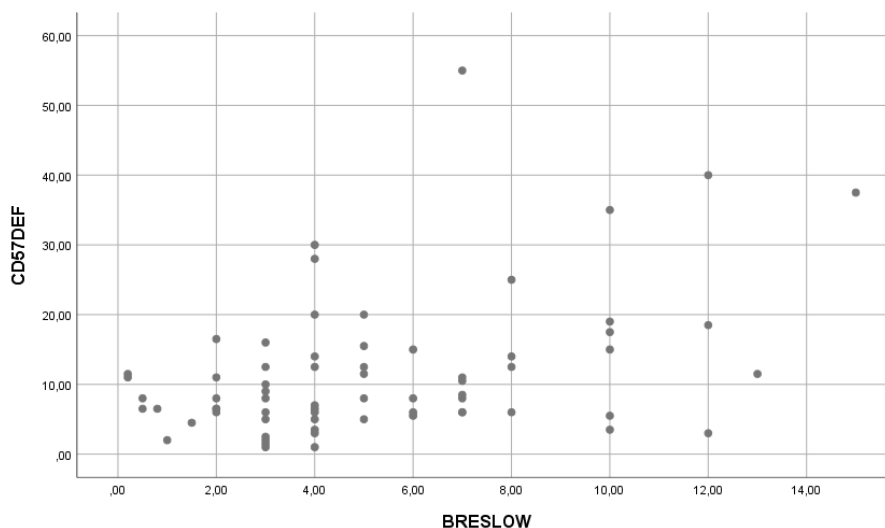


Figura 62. Diagrama de dispersión que representa la expresión de CD57 en función del espesor tumoral.

5.6.3 Comparación poblaciones linfocitarias según la presencia de invasión perineural/linfovascular

No existieron diferencias en cuanto a la variable invasión perineural/linfovascular para ninguno de los marcadores inmunohistoquímicos exceptuando el caso de CD163 (p-valor 0,001).

	Media % en invasión perineural/linfovascular sí	Media % en invasión perineural/linfovascular No	p-valor
CD8	20,20+/-14,95	34,10+/-25,69	0,24
CD163	166+/-285,25	46,84+/-24,67	0,001*
CD57	14,7+/-5,74	11,37+/-10,23	0,48
FOXP3CD25	28,8+/-37,16	28,97+/-20,86	0,98

Tabla 27. Comparación de los diferentes marcadores IHQ según la invasión perineural.

RESULTADOS

5.6.4 Comparación poblaciones linfocitarias según si se trata de CECAR o no

Para los marcadores inmunohistoquímicos CD8 y CD163 no existieron diferencias entre CEC de Alto Riesgo y los que no lo eran. Sin embargo, para CD57 y FOXP3+CD25 sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

	Media % en CECAR sí	Media % en CECAR no	p-valor
CD8	27,56+/-20,03	38,60+/-28,81	0,07
CD163	67,53+/-110,53	43,68+/-22,12	0,22
CD57	14,84+/-12,26	8,39+/-5,50	0,01*
FOXP3CD25	36+/-21,29	22,11+/-20,75	0,01*

Tabla 28. Comparación de los diferentes marcadores IHQ según si se trata de CECAR o no.

6. DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

6.1 Variables epidemiológicas recogidas

6.1.1 Sexo

Según la Sociedad Americana de Cáncer, existe al menos el doble de incidencia de cáncer cutáneo no melanoma en varones que en mujeres¹⁷⁴. Se cree que estas diferencias se pueden deber a que los primeros suelen estar más fotoexpuestos de manera crónica, entre otros factores.

En nuestro estudio la distribución en cuanto al sexo no se especificó previo a la selección de los pacientes, de manera que tenemos una distribución asimétrica, con predominancia de varones (97 varones y 49 mujeres).

También se han encontrado diferencias según el género con respecto a la localización del CEC, de manera que una cohorte finlandesa encontró que el 93% de CEC en pabellón auricular se encontraban en varones, lo que posiblemente se deba a la diferente distribución del pelo entre sexos¹⁷⁵. Kim *et al.*¹⁷⁶ encontraron que las mujeres tenían más probabilidades de desarrollar CEC en extremidades inferiores, de manera que casi la mitad de CEC en mujeres mayores (47.7%) se encontraban en extremidades inferiores, mientras que más de la mitad de CEC en varones se encontraban en cabeza y cuello.

En el estudio de Duran y cols.¹⁷⁷ se evaluaron las diferencias en cuanto a pronóstico de CEC según el sexo de los individuos. En su serie de pacientes, existían diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la recurrencia local (hombres 27%, mujeres 4%) aunque el riesgo de muerte específica por enfermedad fue tres veces mayor en hombres que en mujeres, esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

Algunos reportes han mostrado diferencias entre géneros en cuanto a la respuesta a la exposición UVB, de manera que los ratones machos desarrollaban CEC antes y en mayor cantidad que las hembras, tras exposiciones similares a UVB¹⁷⁸. No obstante, estas diferencias en la respuesta no explicarían que tumores del mismo estadio tengan mayor predisposición a peores desenlaces en varones que en mujeres.

En nuestro estudio no se han encontrado diferencias en cuanto a pronóstico (medido en forma de desarrollo de metástasis nodales y/o a distancia) en pacientes con CEC según su género.

6. DISCUSIÓN

6.1.2 Edad

En este estudio también incluimos la edad al diagnóstico de la lesión tumoral primaria. Esto es así ya que algunas revisiones, como la de Sahovaler y cols.¹⁷⁹ han objetivado que la edad es un factor de riesgo para el aumento de mortalidad específico debido a CEC (con un coeficiente de riesgo de 1,03). Green también se postula a favor de que la incidencia de CEC aumenta con la edad¹⁸⁰.

La edad media de nuestros pacientes con CEC fue de 83+/- 10 años. Los pacientes con CEC metastásico tenían una edad media de 86 años, mientras que aquellos sin enfermedad metastásica tenían una edad media de 80 años. Sí existieron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (p-valor: 0,01). Se cree que el declive del sistema inmunitario relacionado con el aumento de la edad está relacionado con el aumento de incidencia de CEC y con su peor pronóstico en edades más avanzadas.

No obstante, otros reportes no han encontrado diferencias estadísticamente significativas según la edad en cuanto al pronóstico de CEC, tales como el de Smith *et al.*¹⁸¹. Estos autores analizaron 418 pacientes inmunocompetentes con metástasis de CEC, cuya edad media fue de 73 años, comparando con un grupo control que incluía 24 pacientes con CEC metastásico e inmunosupresión (edad media de 51 años). Según estos autores, el aumento de la edad no se asoció con peores tasas de supervivencia libre de enfermedad o específica de la enfermedad. Al contrario, aquellos pacientes pertenecientes a grupos de mayor edad (70 años o más) tuvieron mejores resultados específicos de la enfermedad que los pacientes con inmunosupresión a largo plazo. Concluyen, por tanto, que en el contexto de CEC metastásico, la edad no debe considerarse como un marcador de mal pronóstico, más bien se trata un marcador subrogado del estado inmunitario.

Además, debido a que la edad puede condicionar el estado inmunitario, también se realizó un subanálisis, incluido en apartados posteriores, sobre la relación entre los diferentes marcadores inflamatorios peritumorales y la edad.

6. DISCUSIÓN

6.1.3 Diámetro de la lesión

Múltiples estudios han demostrado que un mayor diámetro clínico del CEC se correlaciona con peor pronóstico. De hecho, en todos los sistemas de estadificación actuales se incluye el diámetro tumoral como uno de los principales factores a tener en cuenta. Además, hay que considerar que el diámetro del CEC se ha correlacionado positivamente con el espesor tumoral, el cual es también otro factor pronóstico clave.

La clasificación de CEC de la American Joint Committee on Cancer's (AJCC) más reciente, el AJCC-857, en el apartado T, utiliza el diámetro del tumor mayor o igual a 2 cm como factor distintivo entre tumores T1 y T2. Para T3 incluye aquellos que tienen un diámetro mayor o igual a 4 cm. El sistema de estadificación de Brigham and Women's Hospital (BWH), ofrece una clasificación de T alternativa e incluye como factores de riesgo un diámetro tumoral mayor o igual a 2 cm.

El factor de riesgo con mayor asociación con la mortalidad específica por enfermedad es el diámetro tumoral > 2 cm, duplicando el riesgo de recidiva local y triplicando el riesgo de metástasis, en comparación con lesiones de menor tamaño⁸².

El estudio de cohortes retrospectivo de Schmults y cols.⁶⁹, que incluyó un total de 1832 CEC, consideró que un diámetro tumoral mayor o igual a 2 cm se trataba de un factor de riesgo independiente para el desarrollo de metástasis ganglionares (OR 7), así como para la mortalidad relacionada con la enfermedad (OR 15.9).

En el metaanálisis de Thompson *et al.*⁶⁶ se comprobó que un diámetro tumoral ≥ 20 mm era el factor con mayor asociación a mortalidad específica por enfermedad, con un aumento de 19 veces más de muerte específica por enfermedad que aquellos tumores de menos de 2 cm. También se trataba de un factor de riesgo asociado a recurrencia local así como a enfermedad metastásica.

En otro metaanálisis, realizado por Zeng y cols.¹⁸² el diámetro mayor de 2 cm se asoció a un aumento del riesgo de recurrencia local de 4.62 veces respecto a aquellos CEC de menor tamaño. También aumentaba 5 veces el riesgo de aparición de metástasis. No obstante, no se encontró que el diámetro tumoral se asociara con un mayor riesgo de mortalidad específica por enfermedad.

6. DISCUSIÓN

En línea con los trabajos anteriores, en nuestro estudio sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre CEC metastásicos y no metastásicos según el diámetro tumoral, de manera que los metastásicos tenían un tamaño medio de 23,06 mm y los no metastásicos de 15,15 mm ($p < 0,001$).

6.1.4 Localización

Desde hace años es conocido que la localización del CEC es un factor pronóstico independiente para la evolución del mismo. Ya en 1992, Rowe y cols.⁸², realizaron una revisión sistemática para evaluar los factores de riesgo asociados a la recidiva y a la aparición de metástasis en CEC, destacando la localización tumoral como uno de estos factores. Encontraron diferencias significativas en cuanto a estos parámetros en CEC localizados en zonas fotoexpuestas (7.9% tuvieron recurrencia local y 5.2% tuvieron metástasis) con respecto a aquellos localizados en el pabellón auricular (18.7% recurrencia local y 11% metástasis) y en labios (10.5% recurrencia local y 13.7% metástasis).

En 2008, Brantsch y cols.⁷³, reportaron un aumento en 3.61 veces de riesgo de metástasis en CEC sobre pabellón auricular respecto a CEC en otras localizaciones anatómicas. No obstante, no encontraron diferencias entre localización en labios respecto al resto de localizaciones.

Brougham y cols.¹⁸³ comprobaron que aquellos CEC en mejillas, labios o pabellones auriculares y área retroauricular también eran de alto riesgo metastásico. De hecho, postularon que la localización en alguna de estas zonas sería suficiente para que un tumor pasara a clasificarse dentro del estadio T2.

En 2013 Schmults y cols.⁶⁹ describieron que la localización en sienes y orejas se asociaba con mayor riesgo de recurrencia local y de metástasis para CEC (la localización en sien tenía 3.8 veces más de riesgo de metástasis y la localización en pabellón auricular, 5.9 veces más). Tres años más tarde, Thompson⁶⁶, en su metaanálisis, reportó que la localización en sienes era la única que se asociaba estadísticamente con un aumento del riesgo de recidiva local (RR: 3.2). En su estudio también contempló que la localización en sienes (RR: 2.82), en orejas (RR: 2.33) y en labios (RR: 2.28) aumentaban el riesgo de metástasis del CEC.

6. DISCUSIÓN

Es decir, de manera general, aquellos CEC localizados en cabeza y cuello tienen mayor riesgo de recurrencia que los que se encuentran en tronco y extremidades. Aquellos localizados en mucosas, genitales y pabellones auriculares también son de mayor riesgo⁷⁷.

Según las guías NCCN⁷⁶, aquellos CEC localizados en cabeza y cuello tienen mayor riesgo de recurrencia que aquellos localizados en tronco y extremidades. Asimismo, estratifican todas las posibles áreas de aparición de CEC según el riesgo de recurrencia y metástasis en:

- Área H (de alto riesgo): zona de la “máscara” de la cara, compuesta por zona central, cejas, párpados, nariz, labios, barbilla, mandíbula, preauricular, postauricular y pabellón auricular. También incluye genitales, manos y pies.
- Área M (de moderado riesgo): mejillas, frente, cuero cabelludo, cuello y región pretibial.
- Área L (de bajo riesgo): tronco y extremidades, excluyendo manos, uñas, región pretibial y pies.

Además, las guías NCCN van más allá y subdividen a los pacientes según el área en la que les aparece el CEC anterior y el tamaño del mismo en diferentes grupos de riesgo de recidiva. Esto lo hacen así ya que se basan en datos extrapolados de carcinomas basocelulares, para los cuales existen estudios retrospectivos de hasta 27 años que han determinado que para este tumor las recurrencias tras extirpación estándar fueron mucho más frecuentes en localizaciones de alto riesgo para aquellos con un diámetro mayor o igual a 6 mm y en localizaciones de moderado riesgo para aquellos tumores con un diámetro de al menos 10 mm¹⁸⁴. De este modo, según las guías NCCN, para CEC, las siguientes lesiones serían consideradas de alto riesgo (por tanto, subsidiarias de cirugía micrográfica de Mohs):

- a. Tumores en área L (bajo riesgo) que midan al menos 20 mm.
- b. Tumores en área M (moderado riesgo) que midan al menos 10 mm.
- c. Tumores en área H (alto riesgo) de cualquier tamaño.

En nuestra muestra, los pacientes con CEC metastásico presentaban las lesiones en un 77,1% de las ocasiones en áreas de alto riesgo y en un 22,9% en otras áreas. Mientras

6. DISCUSIÓN

que aquellos con CEC no metastásico presentaban las lesiones en un 32,4% en áreas de alto riesgo y en un 67,5% en el resto de localizaciones. Las diferencias entre ambos grupos fueron estadísticamente significativas, con una clara tendencia del CEC metastásico a desarrollarse en áreas de alto riesgo.

6.1.5 Márgenes afectos

En nuestro estudio, todos los tumores con márgenes afectos en la primera intervención fueron resecados completamente a continuación, por lo que finalmente este parámetro no se ha considerado un marcador fiable ni útil para el estudio.

De esta manera, aunque en algunos apartados fue estadísticamente significativa la diferencia, decidimos eliminar este factor del análisis multivariante.

6.1.6 Grado de diferenciación

Clásicamente se había subdividido el CEC según su grado de diferenciación en tres subtipos: bien diferenciado, moderadamente diferenciado y escasamente diferenciado. Incluso en 1920 se estratificó en 4 subtipos según el grado de diferenciación. Actualmente, la tendencia es a una gradación en dos grupos: los bien diferenciados junto con los moderadamente diferenciados y por otra parte aquellos escasamente diferenciados⁷⁶. Es de este modo como se incluye en la mayoría de guías de práctica clínica.

Rowe y cols.⁸² determinaron en su metaanálisis sobre los factores de riesgo para recurrencia local y metástasis de CEC, que aquellos pacientes con tumores bien diferenciados tenían mejor pronóstico que aquellos con lesiones pobremente diferenciadas. En 1993 un análisis retrospectivo de 1039 CEC concluyó que el grado histopatológico era un factor de riesgo para la aparición de enfermedad locorregional recurrente¹⁸⁵.

Otro estudio de cohortes de 2010 con 315 pacientes determinó que el grado de diferenciación era un factor de riesgo para recidiva local y también modificaba la supervivencia específica por enfermedad¹⁸⁶.

6. DISCUSIÓN

En 2013 Jambusaria propuso una clasificación TNM alternativa a la AJCC del 2010 para el CEC tras evaluar 2056 pacientes con CEC extirpados previamente y sus recurrencias o metástasis. Asimismo, encontraron que una escasa diferenciación se asocia con mayor riesgo de recurrencias y de metástasis⁶⁵.

Aunque el bajo grado de diferenciación sí que fue reconocido por la AJCC 8 como un factor de riesgo, no se incluyó todavía en el estadificación.

Un estudio de 2017 con 459 pacientes determinó que de entre todos los pacientes clasificados como T1 y T2, según esta clasificación de la AJCC, los únicos que tuvieron mal pronóstico fueron aquellos con escasa diferenciación histológica, remarcando la importancia pronóstica de este factor¹⁷⁷.

La revisión sistemática de Thompson del año 2016 encontró, entre otros hallazgos, que aquellos pacientes con CEC mal diferenciado tenían 4.98 veces más riesgo de metástasis y 2.66 veces más de riesgo de recurrencia local⁶⁶.

Actualmente, el grado de diferenciación sí está incluido en los diferentes sistemas de estadificación ya que todos los estudios referidos previamente, entre otros, han demostrado que influye en el pronóstico.

En nuestro estudio sí existen diferencias entre CEC metastásico y no metastásico, aunque no fueron estadísticamente significativas. En el caso de CEC metastásico, el 62,8% eran bien diferenciados o moderadamente diferenciados, mientras que el 37,1% eran escasamente diferenciados. Por el contrario, en CEC no metastásicos el 51,3% eran bien diferenciados o moderadamente diferenciados, mientras que el 48,6% eran escasamente diferenciados.

Si subdividimos la muestra en los tres subgrupos de diferenciación, vemos que en CEC metastásicos el 25,8% eran bien diferenciados, el 37,1% eran moderadamente diferenciados y el 37,1% eran escasamente diferenciados. Sin embargo, en el grupo de CEC no metastásicos, el 48,6% eran bien diferenciados, el 2,8% moderadamente diferenciados y el 48,6% eran escasamente diferenciados. Creemos que los resultados en nuestro estudio no han sido estadísticamente significativos debido a que la mayor parte de diferencias en nuestra muestra se encontraban en lesiones moderadamente diferenciadas (mucho más frecuentes en pacientes con CEC metastásico que en el

6. DISCUSIÓN

resto), pero al agrupar bien diferenciados y moderadamente diferenciados estas diferencias no son perceptibles.

6.1.8 Invasión perineural y/o perivascular

En las guías de práctica clínica de la actualidad sí se incluye la invasión perineural de nervios mayores de 0.1 mm como factor de mal pronóstico para CEC. También se incluye la invasión linfovascular⁷⁷. El hecho de presentar alguno de estos dos factores de riesgo, aumenta el grado T del tumor y también influye en el manejo terapéutico. La AJCC para CEC en su octava versión, así como la clasificación de BWH, incluyen la invasión perineural de nervios mayores de 0.1 mm para la estadificación, sin incluir la invasión linfovascular.

Ya en 1992, una revisión sistemática encontró que la presencia de invasión perineural en CEC se asociaba a mayor riesgo de recidiva local y de metástasis⁸². Según sus hallazgos, lesiones con invasión perineural (no definían el diámetro del nervio) tenían una tasa de recurrencia del 47.2% y una tasa de metástasis del 47.3%.

Jambusaria y cols. encontraron que tanto la invasión perineural como la afectación linfovascular eran factores de mal pronóstico para el CEC⁷⁵. En cuanto a la invasión perineural, en este estudio solo existieron diferencias estadísticamente significativas con aquellos que no la presentaban para nervios mayores de 0.1 mm en cuanto a mayor riesgo de recidiva y de metástasis.

En una cohorte de 315 pacientes, se observó que la invasión perineural es un factor de riesgo independiente en pacientes con CEC para una disminución de la supervivencia global y para recurrencias del mismo (RR: 11.4)¹⁸⁶.

En otro estudio de cohortes, aquellos pacientes con invasión perineural tenían peor pronóstico que los que no la presentaban⁶⁹. En cuanto a la invasión linfovascular, los autores no encontraron que este factor aumentara el riesgo de metástasis, aunque sí se asociaba a mayor riesgo de recidiva local.

La revisión sistemática de Thompson y cols.⁶⁶ determinó que en pacientes con CEC, la invasión perineural era un factor de riesgo para recidiva local (RR:7.61), para metástasis

6. DISCUSIÓN

(RR: 11.21) y para mortalidad específica de enfermedad (RR 4.49). No incluyeron la invasión linfovascular.

Un estudio de cohortes de 11 años de duración, con 114 casos de CEC mostró que la invasión perineural se asociaba con otros factores de mal pronóstico. Además, la invasión de nervios de más de 0.1 mm aumentaba el riesgo de metástasis (HR: 5.6) y de mortalidad específica de enfermedad (HR: 4.5). Asimismo, la invasión linfovascular aumentaba también el riesgo de mortalidad específica de enfermedad (HR: 15.3)¹⁸⁷.

En nuestro estudio el 14,3% de los pacientes con CEC metastásico tenía invasión linfovascular y/o perineural, mientras que solo el 2,7% de pacientes con CEC no metastásico la presentaba. Aunque sí que existían diferencias entre ambos grupos, éstas no fueron estadísticamente significativas, probablemente debido al escaso tamaño muestral de pacientes con invasión linfovascular y perineural.

6.1.9 Espesor tumoral

Existen bastantes estudios a favor de que el riesgo de metástasis en CEC aumenta con el espesor tumoral del mismo^{75,77,177}. El espesor tumoral puede expresarse según el nivel histológico afecto (epidermis, dermis, hipodermis) o bien de manera continua mediante el índice de Breslow que, según el Colegio de Patólogos Americanos (CAP), se debe medir desde la capa granulosa hasta la célula más profunda, sin tener en cuenta la hiperqueratosis.

Un estudio de 615 pacientes con CEC encontró que, tras 43 meses de seguimiento, en aquellos tumores con un Breslow menor o igual a 2 mm tuvieron un 0% de metástasis, aquellos con Breslow de 2 a 6 mm metastatizaron en un 4% de los casos y aquellos mayores de 6 mm, metastatizaron en un 16% de los casos⁷³.

Efectivamente, algunos metaanálisis han demostrado que los valores de corte para mayor riesgo de metástasis son 4 mm y 6 mm, en cuanto al Breslow⁶⁶.

De esta manera, el espesor tumoral está incluido en todos los sistemas de estadificación y guías de práctica clínica.

En nuestro estudio sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre CEC metastásicos y no metastásicos según el espesor tumoral, de manera que el valor

6. DISCUSIÓN

medio del espesor tumoral de los CEC metastásicos fue de 6,74 mm, mientras que el valor medio para CEC no metastásicos fue de 3,91 mm.

6.1.10 Invasión dermoepidérmica

La invasión más allá de la grasa subcutánea es un factor de mal pronóstico para CEC conocido, que está incluido en la práctica totalidad de sistemas de estadificación y de guías de práctica clínica.

La revisión sistemática de Thompson y cols.⁶⁶ determinó que en pacientes con CEC, la invasión más allá del tejido celular subcutáneo era un factor de riesgo para recidiva local (RR:3.22), para metástasis (RR: 2.95) y para mortalidad específica de enfermedad (RR 4.06). No incluyeron la invasión linfovascular.

Otros estudios han encontrado hallazgos similares, como el estudio de cohortes de 10 años de Schmults⁶⁹, en el cual se determinó que la invasión más allá de la grasa subcutánea era un factor de riesgo para la aparición de metástasis (HR: 9.3) y la mortalidad específica por enfermedad (HR:13.0).

En la misma línea, Jambusaria⁶⁵ encontró en su estudio de cohortes retrospectivo con 256 CEC que la invasión grasa era un factor de riesgo para el mismo, de manera que la invasión más allá de TCSC, automáticamente estadificaría a un paciente en T3.

El estudio de cohortes retrospectivo de Karia y cols.¹⁸⁸ determinó que la invasión más allá de la dermis era un factor de mal pronóstico para CEC.

En nuestro estudio, en el caso de CEC metastásicos el 85,7% tenía invasión más allá de la dermis, mientras que solo el 24,3% de CEC no metastásicos alcanzaba esa profundidad. Las diferencias entre ambos grupos sí fueron estadísticamente significativas.

6. DISCUSIÓN

6.1.11 CECAR

En este estudio hemos utilizado el sistema de estadificación diseñado en 2013 de la Brigham and Women's Hospital (BWH), que ofrece una clasificación de T alternativa. Los factores de riesgo incluidos en este sistema son:

- Diámetro tumoral mayor o igual a 2 cm.
- Invasión más allá de la grasa subcutánea.
- Invasión perineural de nervios de diámetro mayor o igual a 0.1 mm.
- Escasa diferenciación histológica.

Cuando un tumor reúne al menos dos de estos factores de riesgo, se denomina CECAR.

Según algunos autores, esta última clasificación estratifica mejor a los pacientes en cuanto al riesgo de eventos adversos tras el tratamiento y también diferencia mejor aquellos pacientes T2 de los T3. Además, también se puede utilizar para estratificar los CEC fuera del área de la cabeza y cuello. Es por estos últimos dos motivos por los que hemos utilizado esta clasificación en el estudio.

Efectivamente, en nuestro estudio, los hallazgos concuerdan con la literatura, ya que en el grupo de los CEC metastásicos, el 80% eran CECAR, mientras que en el grupo de los no metastásicos solo era un 24,3% CECAR. Las diferencias entre ambos grupos sí fueron estadísticamente significativas.

6.2 Marcadores de inflamación

6.2.1 Marcadores de células inflamatorias comparando CEC metastásico y no metastásico

a. Linfocitos T CD8+:

Los linfocitos T CD8+ son capaces de destruir células tumorales a través de la unión al CMH-I. Según esto, aquellos tumores con mayor infiltrado inflamatorio linfocitario CD8+ teóricamente tendrían mejor pronóstico. No obstante, existen receptores

6. DISCUSIÓN

inhibidores en superficie, como CTLA-4 y PD-1, que inhiben la actividad antitumoral de los linfocitos CD8+, hecho que podría explicar que en algunos estudios no se encuentren diferencias en el pronóstico en muestras de CEC, a pesar de que sí reporten diferencias en el recuento de linfocitos T CD8+.

Efectivamente, diversos estudios y metaanálisis han demostrado que la mayor expresión de células CD8+ se asocia a mejor pronóstico en CEC de cabeza y cuello^{158,159,160}. En el estudio de Chester Lai *et al.*¹⁶¹, realizado en CEC de piel, se observó que una mayor expresión de células CD8+ en el microambiente tumoral se asociaba a un mejor pronóstico (concretamente observaron que existía menor expresión de CD8 en aquellas muestras tumorales que desarrollaban metástasis ganglionares o a distancia que en aquellas que no).

Shimizu *et al.*⁵⁸ únicamente encontraron asociación con mayor supervivencia entre los linfocitos CD8+ localizados en la periferia tumoral, y no los centrales, en pacientes con CEC oral.

En nuestro estudio, en línea con los previos, la media de expresión de este marcador en CEC no metastásicos fue de 41,33% mientras que en CEC metastásicos fue de 24,33%. Las diferencias entre ambos grupos sí fueron estadísticamente significativas (p-valor: 0,005), de manera que aquellos CEC que desarrollaron metástasis tenían menor porcentaje de infiltración de linfocitos T CD8 en su infiltrado inflamatorio periférico asociado al tumor.

b. Macrófagos M2 CD163+

Los macrófagos, una de las poblaciones celulares más frecuentes en el infiltrado tumoral leucocitario, tienen una actividad citolítica para varias líneas tumorales¹⁴⁰. No obstante, para algunos tipos de tumores se ha asociado la presencia de mayor infiltrado macrofágico peritumoral con peor pronóstico¹¹³.

Esta paradoja podría explicarse por el hecho de que los macrófagos infiltrantes tumorales son influidos por señales paracrinas, de manera que se pueden diferenciar en dos tipos: macrófagos M2, con un perfil inmunosupresor protumoral y macrófagos M1,

6. DISCUSIÓN

con un perfil fagocítico antitumoral. La polarización hacia tipo M2 ocurre ante la presencia de citoquinas como TGF β e IL-4, IL-10, IL-13. La polarización hacia M1 está guiada fundamentalmente por el IFN- γ ¹⁴¹.

De esta manera, CD163 es un marcador inmunohistoquímico (IHQ) de macrófagos tipo M2, es decir, de aquellos macrófagos con un perfil inmunosupresor, que promueven el desarrollo tumoral.

Los macrófagos tipo M2 promueven la angiogénesis, el desarrollo de las células tumorales y favorecen la aparición de metástasis¹⁴².

En el metaanálisis realizado por Troiano *et al.*¹⁴³ se observó que una mayor expresión de células CD163+ entre las células del estroma tumoral de CEC se correlacionaba con una menor tasa de supervivencia, aumentando el riesgo de mortalidad 2.26 veces. No obstante, no se asoció con un mayor riesgo de metástasis ni con el estadio tumoral. En otro estudio llevado a cabo en pacientes con CEC oral¹⁴⁵, también se reportó una menor tasa de supervivencia global en pacientes con mayor expresión de células CD163+ en el microambiente tumoral.

Yamagata *et al.*¹⁴⁴ sí encontraron que una mayor presencia de células CD163+ en el estroma tumoral se asociaba con mayor tasa de aparición de metástasis ganglionares en pacientes con CEC oral.

En nuestra muestra, en el caso de pacientes con CEC no metastásico, la media en el porcentaje de expresión del marcador CD163 fue de 39,12+/-22,56% y en pacientes con CEC metastásico, de 74,14+/-112,22%. Aunque sí se observa una tendencia de mayor expresión de este marcador en CEC metastásico, las diferencias entre ambos grupos no fueron estadísticamente significativas (p-valor 0,071).

6. DISCUSIÓN

c. Células Natural Killer CD57+

Las células Natural Killer (NK) son células citolíticas que pertenecen a la inmunidad innata, las cuales comparten algunas características con los linfocitos T citotóxicos pero, a diferencia de éstos, son capaces de destruir células sin mediación del CMH-I.

Estas células expresan CD16 y CD56 como marcadores de superficie, pero cuando se diferencian también expresan CD57. Estas variantes diferenciadas tienen mayor actividad citolítica (39). El marcador CD56 se ha utilizado en algunos estudios de CEC como marcador de células NK, pero la tendencia actual es a utilizar el marcador CD57, ya que se ha descrito como un marcador fenotípicamente estable que representa aquellas células con mayor actividad citotóxica.

En modelos murinos se ha observado que estas células tienen un papel fundamental en la supresión del desarrollo del CEC cutáneo¹⁵⁰, de modo que una depleción de esta estirpe tumoral se ha asociado con el acúmulo de daño en el ADN y con un aumento en la velocidad de crecimiento tumoral.

El microambiente tumoral puede disminuir la capacidad citotóxica de los linfocitos NK, mediante la modulación a la baja de sus receptores activadores¹³⁰. Esto ocurre debido a que un aumento de la expresión de aquellos componentes que forman parte del eje IL-33/ST2 inhiben la actividad citotóxica de las células NK, según Ghinelli y cols.¹³⁰. TGF- β también puede reducir la producción de citoquinas por parte de las células NK, dando como resultado una inhibición de su función citotóxica¹⁵².

Se ha estudiado en múltiples neoplasias humanas la expresión de CD57 en el microambiente tumoral, intentando relacionarla con el pronóstico de los pacientes. Su papel todavía no se conoce completamente, ya que para algunos tipos de cáncer se ha comprobado que confiere buen pronóstico una mayor expresión (mama, pulmón y esófago, entre otros) mientras que para otros tipos de neoplasias se asocia a mal pronóstico (carcinoma renal, melanoma o mieloma)¹⁵³.

Para CEC de piel y mucosas, dependiendo de las series consultadas, una mayor expresión de este marcador confiere mejor o peor pronóstico.

En diversos estudios se ha determinado que una mayor expresión de células CD57+ en el microambiente tumoral se asociaba a un aumento de la supervivencia. El estudio de

6. DISCUSIÓN

Taghavi *et al.*¹⁵¹, también realizado en pacientes con CEC de mucosa oral, comprobó que una mayor expresión de células CD57+ en el microambiente tumoral aumentaba la supervivencia con un HR de 17. De manera análoga, en el reciente metaanálisis realizado por Bisheshar *et al.*¹⁵⁴, se observó que mayor expresión de células NK CD56+ y CD57+ se asociaba a mejor pronóstico en pacientes con CEC de cabeza y cuello.

Sin embargo, existen estudios en los que se observó que una mayor expresión de células CD57+ se asociaba a peor pronóstico en CEC, como por ejemplo el estudio de Carvalho *et al.*¹⁵⁵, donde se observó que una mayor expresión de CD57+ se correlacionaba con la aparición de metástasis linfáticas en CEC de cabeza y cuello y con tumores de mayor tamaño.

Nuestro estudio va en la línea de estas últimas investigaciones, debido a que la expresión media de CD57 en pacientes con CEC no metastásico fue de 6,84+/-4,02% mientras que en pacientes con CEC metastásico, de 16,68+/-11,82%. Las diferencias entre ambos grupos sí fueron estadísticamente significativas ($p < 0,001$). De este modo, aquellos pacientes que desarrollaban metástasis, tenían mayores porcentajes de células NK CD57 positivas en su infiltrado inflamatorio peritumoral que los que no las desarrollaban.

Esto podría ser explicado debido a que en algunos estudios se ha observado que en pacientes oncológicos la actividad citotóxica de los linfocitos CD8 y CD4 era prácticamente llevada a cabo de manera exclusiva por parte del subtipo CD57 positivo. A pesar de la aparente preservación de funciones efectoras, estas células CD57 positivas parecían incapaces de inhibir el crecimiento de las células tumorales y podían incluso disminuir las respuestas antitumorales inmunitarias contra antígenos asociados a tumores, quizás al competir por nutrientes o citoquinas.⁹⁸ Además, también podrían influir los receptores activadores e inhibidores de las células CD57+.

6. DISCUSIÓN

d. Linfocitos T Reguladores FOXP3+CD25+

Los linfocitos T reguladores (TReg) son células que se encuentran en el microambiente tumoral, capaces de inhibir la respuesta inmunitaria antitumoral, de manera que promueven la inmunotolerancia. FOXP3 es un marcador muy específico de la presencia de este tipo celular¹⁶⁴.

De esta manera, una mayor cantidad de células FOXP3+ en el infiltrado tumoral se asocia clásicamente con mal pronóstico en diversos tipos tumorales, incluyendo el CEC.

Sin embargo, otros estudios han observado que una mayor presencia de células FOXP3 en el infiltrado tumoral puede correlacionarse con mayor supervivencia en determinados tipos tumorales, incluyendo CEC de cabeza y cuello¹⁶⁵. En el metaanálisis de Koike *et al.*¹⁶⁶ también se asoció una mayor expresión de FOXP3 con mayor supervivencia en pacientes con CEC oral. Posibles hipótesis que expliquen estos hallazgos serían que existen algunas células FOXP3+ que no son linfocitos TReg, a pesar de que sea un marcador muy específico para éstas. Ejemplo de estas células serían los linfocitos T citotóxicos CD8+, cuyas funciones son antitumorales. En esta misma línea, el estudio de Ruitter¹⁵⁸ evidenció que aquellos pacientes con CEC que presentaban mayor expresión de FOXP3 en el microambiente tumoral, tenían mejor pronóstico. Otros estudios sugieren que para discriminar aquellos linfocitos TReg con perfil inmunosupresor se necesitarían marcadores adicionales: FOXP3+, CD25+ y CD127-¹⁶⁷.

No obstante, el trabajo de Stravodimou y cols.¹⁶³ demostró que existen mayor cantidad de células FOXP3 en CEC más agresivos y de mayor grado según la clasificación TNM, en comparación con aquellos de menor grado. De la misma forma, otros estudios correlacionaron mayor expresión de FOXP3 en CEC con peor pronóstico^{161,168}.

En nuestro estudio también utilizamos la coexpresión de CD25 y FOXP3 como marcador de linfocitos T Reg. Nuestros resultados fueron en la misma línea que estos últimos estudios, de manera el caso de CEC no metastásico, la media del porcentaje de células teñidas fue de 18,37% mientras que en CEC metastásicos, la media fue de 41,19%. Las diferencias entre ambos grupos sí fueron estadísticamente significativas. En definitiva, aquellos CEC que desarrollaron metástasis tenían mayor expresión de células teñidas por estos dos marcadores.

6. DISCUSIÓN

6.2.2 Marcadores de células inflamatorias comparando CEC, queratoacantomas y queratosis actínicas.

a. Linfocitos T CD8+:

En diferentes estudios no se han encontrado diferencias en cuanto al infiltrado inflamatorio peritumoral entre CEC y queratoacantomas^{148,156}. No obstante, en un estudio sí observaron diferencias entre queratoacantomas y CEC con respecto a las células CD8+, de manera que el CEC tenía mayor número de éstas que el queratoacantoma¹⁸.

Por el contrario, en nuestro estudio la media de expresión de este marcador en CEC fue menor que en queratoacantoma (33,08% y 44,53% respectivamente). Según el análisis multivariante no existían diferencias estadísticamente significativas entre queratoacantoma y CEC en cuanto al porcentaje de expresión de CD8.

Estudios previos también han comparado el nivel de infiltración de CD8 en queilitis actínica y en CEC cutáneo, encontrando mayor infiltración por ese tipo celular en queilitis actínica que en CEC¹⁶². Por el contrario, otros estudios, han analizado la presencia de células CD8+ en queratosis actínicas vs CEC cutáneo, con menor expresión de las mismas en queratosis actínicas¹⁸.

En nuestro estudio, la media de expresión de este marcador en queratosis actínicas fue mayor que en CEC (49,93% y 33,08% respectivamente). El análisis univariante las diferencias entre CEC y queratosis actínicas (p-valor 0,008) si fueron estadísticamente significativas, de manera que las primeras tenían mayor infiltrado inflamatorio rico en CD8+ que los CEC. Si bien es cierto que la tendencia era hacia una mayor expresión del marcador en queratosis actínicas, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas según el análisis multivariante.

En el análisis multivariante tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre queratoacantoma y queratosis actínicas.

6. DISCUSIÓN

b. Macrófagos M2 CD163+

En un trabajo se observó que la expresión de células CD163 positivas en el infiltrado inflamatorio peritumoral era mayor en CEC que en queratoacantoma¹⁴⁸.

En nuestro estudio sí se apreció una tendencia al alza de la expresión de CD163 en CEC respecto a queratoacantomas, de manera que la media del % de expresión de CD163 en CEC fue de 55,61%, en queratoacantomas fue de 50,21%. No obstante, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Existen escasos estudios que evalúen el papel de los macrófagos en el desarrollo de las queratosis actínicas. Heise *et al*¹⁰. comprobaron, mediante tinciones IHQ, la mayor presencia de este factor en queratosis actínicas y en CEC, en comparación con piel normal.

En nuestro estudio, la expresión en queratosis actínicas fue de 33,97%. Las diferencias entre grupos de lesiones en el análisis univariante, dependiendo de la expresión de CD163, no fueron estadísticamente significativas (p-valor 0,243).

c. Células Natural Killer CD57+

En un estudio previo se analizó la presencia de CD57 en CEC, y se comparó con queratoacantomas, encontrando que existía mayor expresión de este marcador en queratoacantoma que en CEC cutáneo¹⁵⁶.

En nuestro estudio, por el contrario, la expresión media de CD57 en el infiltrado inflamatorio asociado al tumor fue mayor en pacientes con CEC que en queratoacantomas (1,62% y 5,92% respectivamente). En el análisis univariante, las diferencias fueron estadísticamente significativas (p-valor: 0,003). Asimismo, en el análisis multivariante, se evidenció que una mayor expresión de CD57 se consideró factor protector para queratoacantoma respecto a CEC (OR: 0,85).

No se ha encontrado según nuestros criterios de búsqueda ningún estudio que analice la presencia de CD57 en queratosis actínicas, aunque en un estudio de 2005 se analizó la expresión de CD57 en displasia oral en comparación con CEC oral, y se observó que el

6. DISCUSIÓN

número de células CD57+ aumentaba progresivamente según el grado de displasia, pero disminuía cuando se trataba de CEC invasivo¹⁵⁷. En nuestro estudio, las diferencias entre CEC y queratosis actínicas no fueron estadísticamente significativas (p-valor 0,53). Las diferencias entre queratoacantomas y queratosis actínicas tampoco lo fueron (p-valor 0,34).

d. Linfocitos T Reguladores FOXP3+CD25+

En diferentes estudios se ha comparado la expresión de FOXP3 en el microambiente tumoral entre queratoacantoma y CEC, evidenciándose que existía mayor expresión de este marcador en CEC que en queratoacantoma¹⁴⁸. Sin embargo, otro estudio objetivó una mayor cantidad de células FOXP3 positivas en queratoacantomas que en CEC¹⁸.

En nuestro grupo, en el caso de CEC, la media del porcentaje de células teñidas por FOXP3 y CD25 fue de 29,95%, mayor que en queratoacantomas, que fue de 21,79%. Estos hallazgos van en línea con el primer estudio mencionado. No obstante, las diferencias entre grupos no fueron estadísticamente significativas.

En cuanto a queratosis actínicas, dos estudios observaron que éstas expresaban mayor porcentaje de células FOXP3 que el CEC^{162,146}. Sin embargo, Jang y cols.¹⁶⁹ encontraron hallazgos contrarios, con una prevalencia de linfocitos Treg FOXP3+ significativamente mayor en CEC que en queratosis actínicas.

En nuestro grupo los hallazgos fueron similares a los del último estudio mencionado. De modo que la media del porcentaje de células teñidas con FOXP3+CD25 en CEC fue mayor que en queratosis actínicas (29,95% y 21,4%). Las diferencias entre grupos no fueron estadísticamente significativas.

6. DISCUSIÓN

6.2.3 Otros subanálisis

a. Comparación poblaciones linfocitarias según la edad

Diversos estudios han evaluado las alteraciones en el microambiente tumoral relacionadas con la edad, de manera que se ha comprobado que una edad más avanzada puede suponer un microambiente tumoral con poblaciones senescentes, que potencialmente contribuyen a la progresión tumoral y metástasis¹⁸⁹. Es decir, el microambiente tumoral de pacientes más añosos sería más permisivo para el crecimiento de células malignas. De hecho, existen diversos estudios que han encontrado cambios relacionados con la edad en el microambiente tumoral.

En ancianos se ha evidenciado un aumento sistémico de macrófagos inmunosupresores M2 así como neutrófilos N2, los cuales contribuyen a un estado de inmunosupresión. También se ha visto que existe una disminución de la actividad de las células T efectoras, de los linfocitos NK y de las células dendríticas, debido a su inmunosenescencia, lo cual disminuye su actividad citotóxica¹⁹⁰.

En nuestro estudio se evidenció lo contrario, ya que en el caso de CD163 existía menor infiltración de estas células (macrófagos M2) a mayor edad (P-valor de 0,02), con un escaso grado de correlación entre ambas variables (índice de Pearson de 0.19).

b. Comparación poblaciones linfocitarias según el espesor tumoral

En algunos estudios sobre melanoma se ha evaluado la correlación entre el espesor tumoral y la expresión de algunos marcadores inmunohistoquímicos en el microambiente tumoral, como CD8. Se ha evidenciado que, efectivamente, un mayor espesor de Breslow se correlaciona con menor infiltración de linfocitos CD8 en el infiltrado peritumoral¹⁹¹.

En nuestro estudio también se evaluó si existía correlación entre el espesor tumoral y la expresión de los diferentes marcadores inmunohistoquímicos. Para el caso de CD8 y de FOXP3+CD25, no existía correlación entre estos factores y el espesor tumoral. No

6. DISCUSIÓN

obstante, en el caso de CD163 sí la existía, con un coeficiente de Pearson de 0,25, de manera que a mayor espesor del CEC, mayor expresión de macrófagos M2 CD163+.

En el caso de CD57 el grado de asociación era todavía mayor (coeficiente de Pearson de 0,41), con una relación positiva entre ambas variables.

c. Comparación poblaciones linfocitarias según la presencia de invasión perineural/linfovascular

En diversos estudios se ha documentado la importancia vital de los nervios en la tumorogénesis y progresión tumoral. Los nervios infiltran el microambiente tumoral promoviendo el crecimiento tumoral y la formación de metástasis, ya que la invasión perineural aporta una nueva potencial ruta para las células tumorales para metastatizar¹⁹².

A parte de modular la proliferación tumoral y las metástasis, el sistema nervioso también regula otros aspectos de los tumores como la inflamación y la angiogénesis. El receptor nicotínico de acetilcolina se expresa en muchos linfocitos asociados al tumor, lo cual parece indicar que el nervio vago pueda estar envuelto en la regulación de las respuestas inmunitarias del microambiente tumoral¹⁹².

Yang y cols. evaluaron el infiltrado inflamatorio en adenocarcinoma ductal pancreático y encontraron una asociación entre invasión perineural y disminución de linfocitos CD8+ y células Th1, así como un aumento de células Th2⁵².

Otro estudio en CEC determinó que el área de invasión perineural contenía una mezcla de células inmunitarias, con predominancia de células T CD8 en el infiltrado¹⁹³.

En nuestro estudio, no existieron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la variable invasión perineural/linfovascular para ninguno de los marcadores inmunohistoquímicos exceptuando el caso de CD163, para el cual había una mayor expresión en CEC con invasión perineural/linfovascular que para aquellos que no la presentaban.

6. DISCUSIÓN

d. Comparación poblaciones linfocitarias según si se trata de CECAR o no

En nuestro estudio, para los marcadores de células inmunitarias CD8 y CD163 no existen diferencias entre CEC de Alto Riesgo y los que no lo eran.

Sin embargo, para CD57 y FOXP3+CD25 sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas, de manera que los de alto riesgo tenían mayor expresión de ambos marcadores inflamatorios.

7. PERSPECTIVAS DE FUTURO

7. PERSPECTIVAS DE FUTURO

7. PERSPECTIVAS DE FUTURO

Durante la realización de este estudio se han puesto en evidencia nuevas líneas de investigación tales como:

1. Realizar una revisión sistemática y metaanálisis de todos los datos relevantes publicados sobre el infiltrado inflamatorio peritumoral en CEC cutáneo.
2. Incluir un mayor número de pacientes con CEC para que el análisis multivariante se pueda realizar de manera más fiable.
3. Incluir la selección de al menos dos focos de estudio inmunohistoquímico para cada una de las muestras tumorales.
4. Estudio de las diferentes variantes histológicas de CEC.
5. Realizar estudios genéticos de nuestra serie de lesiones tumorales y relacionar la expresión de los diferentes genes con el desarrollo o no de metástasis.
6. Ampliar el número de marcadores IHQ de células inflamatorias del microambiente tumoral.
7. Estudiar también el infiltrado inflamatorio intratumoral y compararlo con nuestros datos sobre el peritumoral.

8. RELEVANCIA Y LIMITACIONES

8. RELEVANCIA Y LIMITACIONES

8. RELEVANCIA Y LIMITACIONES

Desde nuestro punto de vista, la relevancia de este estudio radica en el hecho de que existen escasos estudios que evalúen la expresión de marcadores de células inflamatorias peritumorales a nivel de CEC cutáneo y que, además, comparen éstas en función del desarrollo de metástasis o no. Además, muchos de los estudios previos han obtenido datos dispares. Asimismo, también hemos encontrado escasos estudios sobre el infiltrado inflamatorio en queratosis actínicas y queratoacantomas.

En cuanto a nuestro trabajo, las principales limitaciones que hemos vislumbrado son las siguientes:

- Sesgo en la selección de los pacientes: esto es así ya que no utilizamos un muestreo probabilístico, sino una serie consecutiva de casos de la cual disponíamos en nuestros registros.
- Escaso tamaño muestral para aquellos CEC metastásicos, lo cual nos limitó la potencia estadística y no permitió hacer un adecuado análisis multivariante con diversas variables que habían sido significativas en el análisis univariante.
- La selección de un solo foco para cada laminilla teñida de cada lesión supuso una limitación, ya que en algunas ocasiones los focos se plegaron, lo cual obligó a repetir las diferentes tinciones en diversas ocasiones.
- La naturaleza del estudio, retrospectivo, y la utilización de muestras de anatomía patológica.
- La inclusión de la variable “márgenes quirúrgicos” para el análisis inicial, que finalmente no tuvo relevancia pronóstica ya que todos los pacientes con márgenes afectos eran reintervenidos.
- La propia limitación de la técnica de microarrays, que reduce a un punch de 1,5 mm una pieza tumoral entera, de manera que puede no ser completamente representativo de la misma. La principal limitación de esta técnica es que un área de 1.5 mm puede presentar menor o mayor infiltrado inflamatorio para las células que estamos evaluando de lo que realmente contiene la pieza tumoral a evaluar. Para evitar esta variabilidad incluimos en las muestras del microarray las áreas de mayor infiltrado inflamatorio. No obstante, el objetivo de los microarrays tisulares no es evaluar cada caso individualmente si no que trata de ver una tendencia poblacional o la implicación pronóstica de una serie de marcadores. Además, hay que tener en cuenta que los TMAs no se construyen aleatoriamente, si no que selecciona cuidadosamente la zona donante de cada

8. RELEVANCIA Y LIMITACIONES

pieza tumoral, de manera que aumenta la precisión y la representatividad del total de la pieza. Asimismo, la técnica de los TMAs es más rápida y económica que el procesado habitual de las muestras. El análisis simultáneo de los tumores en un mismo bloque es una garantía de que los resultados obtenidos se han determinado en la mismas condiciones de temperatura, concentración de los reactivos y demás parámetros que varían en la realización de la técnica.

- La ausencia de controles positivos en los microarrays para las diferentes tinciones inmunohistoquímicas. No obstante, utilizamos controles internos de las propias muestras (ya que en todos los arrays hubo tinción de alguno de los focos).

9. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La edad, el tamaño tumoral y el espesor tumoral, descritos previamente como factores pronósticos para CEC, en nuestro estudio también pueden representar factores pronósticos ya que aquellos pacientes con CEC metastásico tenían mayor edad, tamaño tumoral y espesor tumoral.
2. La localización tumoral también puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de metástasis ya que aquellos CEC metastásicos estaban localizados con mayor frecuencia en áreas de alto riesgo.
3. En nuestro estudio se evidenció que la clasificación de la BWH en CECAR sí tenía validez pronóstica, ya que aquellos pacientes con CEC metastásico eran con más frecuencia CECAR.
4. Aquellos CEC que metastatizaron presentaban un infiltrado inflamatorio asociado al tumor (TIL) diferente a aquellos CEC que no metastatizaron, de manera que expresaron menor cantidad de células CD8+ y mayor cantidad de células CD57 positivas y de células FOXP3-CD25 positivas.
5. Existen diferencias significativas entre algunas de las células inmunitarias estudiadas que infiltraban queratosis actínicas, queratoacantomas y CEC invasivo. Las queratosis actínicas presentaban mayor porcentaje de células CD8 positivas que el CEC. Las muestras con CEC, por su parte, presentaban mayor expresión de células CD57 positivas que los queratoacantomas.
6. No existen diferencias significativas en cuanto a las células inmunitarias del infiltrado inflamatorio estudiadas entre edades, excepto para CD163, que a mayor edad presentaban menor expresión, contrariamente a lo descrito en estudios previos.
7. Existe mayor cantidad de células CD163 positivas y CD57 positivas en aquellos CEC invasores con mayor espesor tumoral.

10. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Corchado-Cobos R, García-Sancha N, González-Sarmiento R, Pérez-Losada J, Cañueto J. Cutaneous squamous cell carcinoma: From biology to therapy. *Int J Mol Sci*. 2020;21(8). doi:10.3390/ijms21082956
2. Blank CU, Haanen JB, Ribas A, Schumacher TN. The “cancer immunogram” Visualizing the state of cancer–immune system interactions may spur personalized therapy. *Science (80-)*. 2016;352(6286):658-660.
3. <https://www.rcpath.org/uploads/assets/9c1d8f71-5d3b-4508-8e6200f11e1f4a39/Dataset-for-histopathological-reporting-of-primary-invasive-cutaneous-squamous-cell-carcinoma-and-regional-lymph-nodes.pdf>
4. Bologna JL, Schaffer JF CL. Anatomía y fisiología. In: *Cuarta Edición Dermatología.* ; 2019:44-55.
5. Byrd AL, Belkaid Y, Segre JA. The human skin microbiome. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(3):143-155. doi:10.1038/nrmicro.2017.157
6. Kabashima K, Honda T, Ginhoux F, Egawa G. The immunological anatomy of the skin. *Nat Rev Immunol*. 2019;19(1):19-30. doi:10.1038/s41577-018-0084-5
7. Eyerich S, Eyerich K, Traidl-Hoffmann C, Biedermann T. Cutaneous Barriers and Skin Immunity: Differentiating A Connected Network. *Trends Immunol*. 2018;39(4):315-327. doi:10.1016/j.it.2018.02.004
8. Yazdi AS, Röcken M, Ghoreschi K. Cutaneous immunology: basics and new concepts. *Semin Immunopathol*. 2016;38(1):3-10. doi:10.1007/s00281-015-0545-x
9. Carmi-Levy I, Homey B, Soumelis V. A modular view of cytokine networks in atopic dermatitis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2011;41(3):245-253. doi:10.1007/s12016-010-8239-6
10. Heise R, Vetter-Kauczok CS, Skazik C, et al. Expression and function of macrophage migration inhibitory factor in the pathogenesis of UV-induced cutaneous nonmelanoma skin cancer. *Photochem Photobiol*. 2012;88(5):1157-

BIBLIOGRAFÍA

1164. doi:10.1111/j.1751-1097.2012.01108.x
11. Soehnlein O, Steffens S, Hidalgo A, Weber C. Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(4):248-261. doi:10.1038/nri.2017.10
 12. Otsuka A, Nonomura Y, Kabashima K. Roles of basophils and mast cells in cutaneous inflammation. *Semin Immunopathol.* 2016;38(5):563-570. doi:10.1007/s00281-016-0570-4
 13. Hoeffel G, Wang Y, Greter M, et al. Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J Exp Med.* 2012;209(6):1167-1181. doi:10.1084/jem.20120340
 14. Dudeck J, Medyukhina A, Fröbel J, et al. Mast cells acquire MHC II from dendritic cells during skin inflammation. *J Exp Med.* 2017;214(12):3791-3811. doi:10.1084/jem.20160783
 15. Wolff MJ, Leung JM, Davenport M, Poles MA, Cho I, Loke P. TH17, TH22 and TReg cells are enriched in the healthy human cecum. *PLoS One.* 2012;7(7). doi:10.1371/journal.pone.0041373
 16. Ali N, Rosenblum MD. Regulatory T cells in skin. *Immunology.* 2017;152(3):372-381. doi:10.1111/imm.12791
 17. Hartevelt MM, Bouwes Bavinck JN, Kootte AMM, Vermeer BJ, Vandenbroucke JP. Incidence of skin cancer after renal transplantation in the netherlands. *Transplantation.* 1990;49(3):506-509. doi:10.1097/00007890-199003000-00006
 18. Bauer C, Abdul Pari AA, Umansky V, et al. T-lymphocyte profiles differ between keratoacanthomas and invasive squamous cell carcinomas of the human skin. *Cancer Immunol Immunother.* 2018;67(7):1147-1157. doi:10.1007/s00262-018-2171-7
 19. Siegel JA, Korgavkar K, Weinstock MA. Current perspective on actinic keratosis: a review. *Br J Dermatol.* 2017;177(2):350-358. doi:10.1111/bjd.14852
 20. Bickers DR, Lim HW, Margolis D, et al. The burden of skin diseases: 2004. A joint project of the American Academy of Dermatology Association and the

- Society for Investigative Dermatology. *J Am Acad Dermatol*. 2006;55(3):490-500. doi:10.1016/j.jaad.2006.05.048
21. Criscione VD, Weinstock MA, Naylor MF, Luque C, Eide MJ, Bingham SF. Actinic keratoses: Natural history and risk of malignant transformation in the veterans affairs topical tretinoin chemoprevention trial. *Cancer*. 2009;115(11):2523-2530. doi:10.1002/cncr.24284
 22. Mittelbronn MA, Mullins DL, Ramos-Caro FA, Flowers FP. Frequency of pre-existing actinic keratosis in cutaneous squamous cell carcinoma. *Int J Dermatol*. 1998;37(9):677-681. doi:10.1046/j.1365-4362.1998.00467.x
 23. Weinstock MA, Bingham SF, Cole GW et al. Reliability of counting actinic keratoses before and after brief consensus discussion: the VA Topical Tretinoin Chemoprevention (VATTC) trial. *Arch Dermatol* 2001; 137:1055–8.
 24. Olsen EA, Lisa Abernethy M, Kulp-Shorten C, et al. A double-blind, vehicle-controlled study evaluating masoprocol cream in the treatment of actinic keratoses on the head and neck. *J Am Acad Dermatol*. 1991;24(5):738-743. doi:10.1016/0190-9622(91)70113-G
 25. Röwert-Huber J, Patel MJ, Forschner T, et al. Erratum: Actinic keratosis is an early in situ squamous cell carcinoma: A proposal for reclassification (British Journal of Dermatology (2007) 156, SUPPL., (S13-S17)). *Br J Dermatol*. 2007;157(2):431. doi:10.1111/j.1365-2133.2007.08104.x
 26. Schmitz L, Kahl P, Majores M, Bierhoff E, Stockfleth E, Dirschka T. Actinic keratosis: correlation between clinical and histological classification systems. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2016;30(8):1303-1307. doi:10.1111/jdv.13626
 27. Gupta AK, Paquet M. Network meta-analysis of the outcome “participant complete clearance” in nonimmunosuppressed participants of eight interventions for actinic keratosis: A follow-up on a Cochrane review. *Br J Dermatol*. 2013;169(2):250-259. doi:10.1111/bjd.12343
 28. Werner RN, Sammain A, Erdmann R, Hartmann V, Stockfleth E, Nast A. The natural history of actinic keratosis: A systematic review. *Br J Dermatol*. 2013;169(3):502-518. doi:10.1111/bjd.12420

BIBLIOGRAFÍA

29. Hutchinson J. Morbid growths and tumors: 1: the “crateriform ulcer of the face” a form of acute epithelial cancer. *Trans Pathol Soc London*. 1889;40:275-281.
30. Sullivan JJ. Keratoacanthoma: the Australian experience. *Australas J Dermatol*. 1997;38 Suppl 1:S36-S39. doi:10.1111/j.1440-0960.1997.tb01007.x
31. Kwiek B, Schwartz RA. Keratoacanthoma (KA): An update and review. *J Am Acad Dermatol*. 2016;74(6):1220-1233. doi:10.1016/j.jaad.2015.11.033
32. Ramselaar CG, Ruitenber EJ, Kruizinga W. Regression of Induced Keratoacanthomas in Anagen (Hair Growth Phase) Skin Grafts in Mice. *Cancer Res*. 1980;40(5):1668-1673.
33. Waring AJ, Takata M, Rehman I, Rees JL. Loss of heterozygosity analysis of keratoacanthoma reveals multiple differences from cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 1996;73(5):649-653. doi:10.1038/bjc.1996.113
34. Weedon D, Malo J, Brooks D, Williamson R. Keratoacanthoma: Is it really a variant of squamous cell carcinoma? *ANZ J Surg*. 2010;80(3):129-130. doi:10.1111/j.1445-2197.2010.05219.x
35. Hodak E, Jones RE, Ackerman AB. Solitary Keratoacanthoma Is a Squamous-Cell Carcinoma. *Am J Dermatopathol*. 1993;15(4):332-342. doi:10.1097/00000372-199308000-00007
36. Beham A, Regauer S, Soyer HP, Beham-Schmid C. Keratoacanthoma: a clinically distinct variant of well differentiated squamous cell carcinoma. *Adv Anat Pathol*. 1998;5(5):269-280.
37. Bologna JL, Schaffer JF CL. Queratosis actínica, carcinoma basocelular y carcinoma epidermoide. In: *Cuarta Edición Dermatología*. ; 2019:1872-1893.
38. Griffiths RW. Keratoacanthoma observed. *Br J Plast Surg*. 2004;57(6):485-501. doi:10.1016/j.bjps.2004.05.007
39. Savage JA, Maize JC. Keratoacanthoma clinical behavior: A systematic review. *Am J Dermatopathol*. 2014;36(5):422-429. doi:10.1097/DAD.0000000000000031

BIBLIOGRAFÍA

40. Ko CJ. Keratoacanthoma: Facts and controversies. *Clin Dermatol*. 2010;28(3):254-261. doi:10.1016/j.clindermatol.2009.06.010
41. Staples MP, Elwood M, Burton RC, Williams JL, Marks R, Giles GG. S U N , S H A D O W A N D S K I N C A N C E R — R E S E A R C H the 2002 national survey and trends since 1985 S U N , S H A D O W A N D S K I N C A N C E R — R E S E A R C H. 2006;184(1).
42. Karia PS, Han J, Schmults CD. Cutaneous squamous cell carcinoma: Estimated incidence of disease, nodal metastasis, and deaths from disease in the United States, 2012. *J Am Acad Dermatol*. 2013;68(6):957-966. doi:10.1016/j.jaad.2012.11.037
43. Stang A, Khil L, Kajüter H, et al. Incidence and mortality for cutaneous squamous cell carcinoma: comparison across three continents. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2019;33(S8):6-10. doi:10.1111/jdv.15967
44. 6. Venables ZC, Nijsten T, Wong KF et al. E of basal and cutaneous squamous cell carcinoma in the UK 2013-15: a cohort study. *BJD* 2019;181(3):474-482. doi:10. 1111/bjd. 1787. No Title.
45. Tejera-Vaquerizo A, Descalzo-Gallego MA, Otero-Rivas MM, et al. Cancer Incidence and Mortality in Spain: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Actas Dermosifiliogr*. 2016;107(4):318-328. doi:10.1016/j.ad.2015.12.008
46. Lomas A, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall F. A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol*. 2012;166(5):1069-1080. doi:10.1111/j.1365-2133.2012.10830.x
47. Gray DT, Suman VJ, Su WP, Clay RP, Harmsen WS RRT in the population-based incidence of squamous cell carcinoma of the skin first diagnosed between 1984 and 1992. *AD* 1997;133(6):735-740. No Title.
48. Stratigos AJ, Garbe C, Dessinioti C, et al. European interdisciplinary guideline on invasive squamous cell carcinoma of the skin: Part 2. Treatment. *Eur J Cancer*. 2020;128(xxxx):83-102. doi:10.1016/j.ejca.2020.01.008
49. Eigentler TK, Leiter U, Häfner HM, Garbe C, Röcken M, Breuninger H. Survival of Patients with Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: Results of a Prospective

BIBLIOGRAFÍA

- Cohort Study. *J Invest Dermatol*. 2017;137(11):2309-2315.
doi:10.1016/j.jid.2017.06.025
50. Gloster HM, Neal K. Skin cancer in skin of color. *J Am Acad Dermatol*. 2006;55(5):741-760. doi:10.1016/j.jaad.2005.08.063
51. Armstrong BK, Kricger A. The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2001;63(1-3):8-18. doi:10.1016/S1011-1344(01)00198-1
52. Yang TC, Shu KH, Cheng CH, Wu MJ, Lian JD. Malignancy following renal transplantation. *Chinese Med J*. 1998;61(5):281-288. doi:10.5772/26185
53. Cutaneous squamous cell carcinoma: Epidemiology, risk factors, and molecular pathogenesis UPTODATE.
54. Pickering CR, Zhou JH, Lee JJ, et al. Mutational landscape of aggressive cutaneous squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2014;20(24):6582-6592. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1768
55. Brash DE, Rudolph JA, Simon JA, et al. A Role for Sunlight in Skin Cancer : UV-Induced p53 Mutations in Squamous Cell Carcinoma Source : Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America , Vol . Published by : National Academy of Sciences Stable URL : [http://www.j.1991;88\(22\):10124-10128](http://www.j.1991;88(22):10124-10128).
56. Yoshiaki Kubo Yoshio Urano Katsuhiko Yoshimoto. p53 Gene mutations in human skin cancers and precancerous lesions: comparison with immunohistochemical analysis. Published online 1994.
57. Demehri S, Turkoz A, Kopan R. Epidermal Notch1 Loss Promotes Skin Tumorigenesis by Impacting the Stromal Microenvironment. *Cancer Cell*. 2009;16(1):55-66. doi:10.1016/j.ccr.2009.05.016
58. Shimizu S, Hiratsuka H, Koike K, et al. Tumor-infiltrating CD8+ T-cell density is an independent prognostic marker for oral squamous cell carcinoma. *Cancer Med*. 2019;8(1):80-93. doi:10.1002/cam4.1889
59. Oda K, Matsuoka Y, Funahashi A, Kitano H. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Syst Biol*. 2005;1.

BIBLIOGRAFÍA

- doi:10.1038/msb4100014
60. Kallini JR, Hamed N, Khachemoune A. Squamous cell carcinoma of the skin: Epidemiology, classification, management, and novel trends. *Int J Dermatol*. 2015;54(2):130-140. doi:10.1111/ijd.12553
 61. Copcu E. Marjolin's ulcer: A preventable complication of burns? *Plast Reconstr Surg*. 2009;124(1):156-164. doi:10.1097/PRS.0b013e3181a8082e
 62. Que SKT, Zwald FO, Schmults CD. Cutaneous squamous cell carcinoma: Incidence, risk factors, diagnosis, and staging. *J Am Acad Dermatol*. 2018;78(2):237-247. doi:10.1016/j.jaad.2017.08.059
 63. Genois A, Maari C, Bouffard D. Atypical presentation of adenosquamous carcinoma: A case report. *SAGE Open Med Case Reports*. 2018;6:2050313X1880121. doi:10.1177/2050313x18801217
 64. Amin MB, Edge S, Greene F, et Al, Eds. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th Ed. New York, NY: Springer; 2017.
 65. Karia PS, Jambusaria-Pahlajani A, Harrington DP, Murphy GF, Qureshi AA, Schmults CD. Evaluation of American Joint Committee on Cancer, International Union Against Cancer, and Brigham and Women's Hospital tumor staging for cutaneous squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2014;32(4):327-334. doi:10.1200/JCO.2012.48.5326
 66. Thompson AK, Kelley BF, Prokop LJ, Murad MH, Baum CL. Risk factors for cutaneous squamous cell carcinoma recurrence, metastasis, and disease-specific death: A systematic review and meta-analysis. *JAMA Dermatology*. 2016;152(4):419-428. doi:10.1001/jamadermatol.2015.4994
 67. Bowe CM, Houlton S, Walsh S. Comparison of the eighth edition of the TNM and Brigham Women's Hospital staging systems for cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck: a six-year review. *Br J Oral Maxillofac Surg*. Published online 2020:6-11. doi:10.1016/j.bjoms.2020.08.028
 68. Keohane SG, Botting J, Budny PG, et al. *British Association of Dermatologists Guidelines for the Management of People with Cutaneous Squamous Cell Carcinoma 2020**. Vol 184.; 2021. doi:10.1111/bjd.19621

BIBLIOGRAFÍA

69. Schmults CD, Karia PS, Carter JB, Han J, Qureshi AA. Factors predictive of recurrence and death from cutaneous squamous cell carcinoma: A 10-year, single-institution cohort study. *JAMA Dermatology*. 2013;149(5):541-547. doi:10.1001/jamadermatol.2013.2139
70. Varra V, Woody NM, Reddy C, et al. Suboptimal outcomes in cutaneous squamous cell cancer of the head and neck with nodal metastases. *Anticancer Res*. 2018;38(10):5825-5830. doi:10.21873/anticancer.12923
71. Burton KA, Ashack KA, Khachemoune A. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: A Review of High-Risk and Metastatic Disease. *Am J Clin Dermatol*. 2016;17(5):491-508. doi:10.1007/s40257-016-0207-3
72. 14. Que SKT, Zwald FO, Schmults CD. Cutaneous squamous cell carcinoma: Incidence, risk factors, diagnosis, and staging. *J Am Acad Dermatol*. 2018;78(2):237-247. doi:10.1016/j.jaad.2017.08.059.
73. Brantsch KD, Meisner C, Schönfisch B, et al. Analysis of risk factors determining prognosis of cutaneous squamous-cell carcinoma: a prospective study. *Lancet Oncol*. 2008;9(8):713-720. doi:10.1016/S1470-2045(08)70178-5
74. Eversman A, Tracey EH, Michalik D, Rodriguez M, Varra V, Briskin IN AM. Moderate differentiation is a risk factor for extensive subclinical spread of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol*. Published online 2021:126156. doi:10.1016/j.jaad.2020.12.004
75. Jambusaria-Pahlajani A, Kanetsky PA, Karia PS, et al. Evaluation of AJCC tumor staging for cutaneous squamous cell carcinoma and a proposed alternative tumor staging system. *JAMA Dermatology*. 2013;149(4):402-410. doi:10.1001/jamadermatol.2013.2456
76. Nccn. NCCN Guidelines Squamous cell skin cancer Version 2.2020. *Medlin Med Encycl*. Published online 2020. <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/000829.htm>
77. Farberg AS, Hall MA, Douglas L, et al. Integrating gene expression profiling into NCCN high-risk cutaneous squamous cell carcinoma management recommendations: impact on patient management. *Curr Med Res Opin*. 2020;36(8):1301-1307. doi:10.1080/03007995.2020.1763284

BIBLIOGRAFÍA

78. Wysong A, Newman JG, Covington KR, et al. Validation of a 40-gene expression profile test to predict metastatic risk in localized high-risk cutaneous squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol*. Published online 2020:1-9. doi:10.1016/j.jaad.2020.04.088
79. Mulvaney PM, Massey PR, Yu KK, Drinan JE, Schmults CD. Differential molecular expression patterns associated with metastasis in cutaneous squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *J Invest Dermatol*. Published online 2021:1-9. doi:10.1016/j.jid.2021.02.741
80. Lansbury L, Bath-Hextall F, Perkins W, Stanton W, Leonardi-Bee J. Interventions for non-metastatic squamous cell carcinoma of the skin: Systematic review and pooled analysis of observational studies. *BMJ*. 2013;347(November). doi:10.1136/bmj.f6153
81. Lichter MD, Karagas MR, Mott LA, Spencer SK, Stukel TA, Greenberg ER. Therapeutic ionizing radiation and the incidence of basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma. *Arch Dermatol*. 2000;136(8):1007-1011. doi:10.1001/archderm.136.8.1007
82. Rowe D, Carroll R, Day C. Prognostic factors for local recurrence, metastasis and survival rates in SCC of the skin, ear and lip. *JAMA Dermatology*. 1992;26(6):976-990.
83. Cognetta AB, Howard BM, Heaton HP, Stoddard ER, Hong HG, Green WH. Superficial x-ray in the treatment of basal and squamous cell carcinomas: A viable option in select patients. *J Am Acad Dermatol*. 2012;67(6):1235-1241. doi:10.1016/j.jaad.2012.06.001
84. Marur S, Forastiere AA. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc*. 2016;91(3):386-396. doi:10.1016/j.mayocp.2015.12.017
85. Zheng HC. The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. *Oncotarget*. 2017;8(35):59950-59964. doi:10.18632/oncotarget.19048
86. Wheeler DL, Dunn EF, Harari PM. Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010;7(9):493-507. doi:10.1038/nrclinonc.2010.97

BIBLIOGRAFÍA

87. Maubec E, Petrow P, Scheer-Senyearich I, et al. Phase II study of cetuximab as first-line single-drug therapy in patients with unresectable squamous cell carcinoma of the skin. *J Clin Oncol*. 2011;29(25):3419-3426.
doi:10.1200/JCO.2010.34.1735
88. Flies DB, Sandler BJ, Sznol M, Chen L. Blockade of the B7-H1/PD-1 pathway for cancer immunotherapy. *Yale J Biol Med*. 2011;84(4):409-421.
89. Migden MR, Rischin D, Schmults CD, et al. PD-1 Blockade with Cemiplimab in Advanced Cutaneous Squamous-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. Published online 2018:341-351. doi:10.1056/nejmoa1805131
90. Blum V, Müller B, Hofer S, et al. Nivolumab for recurrent cutaneous squamous cell carcinoma: three cases. *Eur J Dermatology*. 2018;28(1):78-81.
doi:10.1684/ejd.2017.3209
91. Cristescu R, Mogg R, Ayers M, et al. HHS Public Access. 2019;362(6411):1-27.
doi:10.1126/science.aar3593.Pan-tumor
92. Bhatia S, Thompson JA. PD-1 Blockade in Melanoma. *Jama*. 2016;315(15):1573. doi:10.1001/jama.2016.4012
93. Daud AI, Wolchok JD, Robert C, et al. Programmed death-ligand 1 expression and response to the anti-programmed death 1 antibody pembrolizumab in melanoma. *J Clin Oncol*. 2016;34(34):4102-4109.
doi:10.1200/JCO.2016.67.2477
94. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al. Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med*. 2019;381(16):1535-1546. doi:10.1056/nejmoa1910836
95. Mittrücker HW, Visekruna A, Huber M. Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8+ T Cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2014;62(6):449-458. doi:10.1007/s00005-014-0293-y
96. Jansen CS, Prokhnjevskaja N, Master VA, et al. HHS Public Access. 2020;576(7787):465-470. doi:10.1038/s41586-019-1836-5.An
97. Kared H, Martelli S, Ng TP, Pender SLF, Larbi A. CD57 in human natural killer cells and T-lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother*. 2016;65(4):441-452.

BIBLIOGRAFÍA

- doi:10.1007/s00262-016-1803-z
98. Van Den Hove LE, Vandenberghe P, Van Gool SW, et al. Peripheral blood lymphocyte subset shifts in patients with untreated hematological tumors: Evidence for systemic activation of the T cell compartment. *Leuk Res.* 1998;22(2):175-184. doi:10.1016/S0145-2126(97)00152-5
 99. Etzerodt A, Moestrup SK. CD163 and inflammation: Biological, diagnostic, and therapeutic aspects. *Antioxidants Redox Signal.* 2013;18(17):2352-2363. doi:10.1089/ars.2012.4834
 100. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *J Immunol.* 2000;164(12):6166-6173. doi:10.4049/jimmunol.164.12.6166
 101. Skytthe MK, Graversen JH, Moestrup SK. Targeting of cd163+ macrophages in inflammatory and malignant diseases. *Int J Mol Sci.* 2020;21(15):1-31. doi:10.3390/ijms21155497
 102. Kim CH. FOXP3 and its role in the immune system. *Adv Exp Med Biol.* 2009;665:17-29. doi:10.1007/978-1-4419-1599-3_2
 103. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol.* 2017;198(3):986-992. doi:10.1038/ni904
 104. Flynn MJ, Hartley JA. The emerging role of anti-CD25 directed therapies as both immune modulators and targeted agents in cancer. *Br J Haematol.* 2017;179(1):20-35. doi:10.1111/bjh.14770
 105. Malek TR. The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:453-479. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090357
 106. Waldmann T. Contrasting Roles of IL-2 and IL-15 in the Life and Death of Lymphocytes Implications for Immunotherapy. *Immunity.* 2001;14(2):105-110. doi:10.1016/s1074-7613(09)00091-0
 107. Herrmann F, Cannistra SA, Levine H GJ. Expression of interleukin 2 receptors and binding of interleukin 2 by gamma interferon- induced human leukemic and normal monocytic cells. *J Exp Med.* 1985;162(September):1111-1116.

BIBLIOGRAFÍA

108. Bottomley MJ, Thomson J, Harwood C, Leigh I. The role of the immune system in cutaneous squamous cell carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2019;20(8). doi:10.3390/ijms20082009
109. Borden ES, Kang P, Natri HM, et al. Neoantigen Fitness Model Predicts Lower Immune Recognition of Cutaneous Squamous Cell Carcinomas Than Actinic Keratoses. *Front Immunol.* 2019;10(November):1-11. doi:10.3389/fimmu.2019.02799
110. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 2010;140(6):883–899. 2011;140(6):883-899. doi:10.1016/j.cell.2010.01.025.Immunity
111. Thommen DS, Schumacher TN. T Cell Dysfunction in Cancer. *Cancer Cell.* 2018;33(4):547-562. doi:10.1016/j.ccell.2018.03.012
112. Bernat-Peguera A, Simón-Extremera P, da Silva-Diz V, et al. PDGFR-induced autocrine SDF-1 signaling in cancer cells promotes metastasis in advanced skin carcinoma. *Oncogene.* 2019;38(25):5021-5037. doi:10.1038/s41388-019-0773-y
113. Gentles AJ, Newman AM, Liu CL, et al. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat Med.* 2015;21(8):938-945. doi:10.1038/nm.3909
114. Teng MWL, Ngiow SF, Ribas A, Smyth MJ. Classifying cancers based on T-cell infiltration and PD-L1. *Cancer Res.* 2015;75(11):2139-2145. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-0255
115. Boxberg M, Leising L, Steiger K, et al. Composition and Clinical Impact of the Immunologic Tumor Microenvironment in Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Immunol.* 2019;202(1):278-291. doi:10.4049/jimmunol.1800242
116. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, et al. Polarization of TAN phenotype by TGFβ: “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell.* 2010;16(3):183-194. doi:10.1016/j.ccr.2009.06.017.Polarization
117. Soucek L, Lawlor ER, Soto D, Shchors K, Swigart LB, Evan GI. Mast cells are required for angiogenesis and macroscopic expansion of Myc-induced pancreatic islet tumors. *Nat Med.* 2007;13(10):1211-1218. doi:10.1038/nm1649

BIBLIOGRAFÍA

118. Georgescu SR, Tampa M, Mitran CI, et al. Tumour Microenvironment in Skin Carcinogenesis. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1226:123-142. doi:10.1007/978-3-030-36214-0_10
119. Spranger S. Mechanisms of tumor escape in the context of the T-cell-inflamed and the non-T-cell-inflamed tumor microenvironment. *Int Immunol*. 2016;28(8):383-391. doi:10.1093/intimm/dxw014
120. Liu S, Liu D, Li J, Zhang D, Chen Q. Regulatory T cells in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2016;45(9):635-639. doi:10.1111/jop.12445
121. Erdman SE, Sohn JJ, Rao VP, et al. CD4+CD25+ regulatory lymphocytes induce regression of intestinal tumors in ApcMin/+ mice. *Cancer Res*. 2005;65(10):3998-4004. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3104
122. Sarvaria A, Madrigal JA, Saudemont A. B cell regulation in cancer and anti-tumor immunity. *Cell Mol Immunol*. 2017;14(8):662-674. doi:10.1038/cmi.2017.35
123. DiLillo DJ, Yanaba K, Tedder TF. B Cells Are Required for Optimal CD4 + and CD8 + T Cell Tumor Immunity: Therapeutic B Cell Depletion Enhances B16 Melanoma Growth in Mice . *J Immunol*. 2010;184(7):4006-4016. doi:10.4049/jimmunol.0903009
124. Rodríguez-Pinto D. B cells as antigen presenting cells. *Cell Immunol*. 2005;238(2):67-75. doi:10.1016/j.cellimm.2006.02.005
125. Erez N, Truitt M, Olson P, Hanahan D. Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF- κ B-Dependent Manner. *Cancer Cell*. 2010;17(2):135-147. doi:10.1016/j.ccr.2009.12.041
126. Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor- β 1 induces α -smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol*. 1993;122(1):103-111. doi:10.1083/jcb.122.1.103
127. Plzák J, Bouček J, Bandúrová V, et al. The head and neck squamous cell carcinoma microenvironment as a potential target for cancer therapy. *Cancers*

- (Basel). 2019;11(4). doi:10.3390/cancers11040440
128. Li Y yin, Zhou CX, Gao Y. Interaction between oral squamous cell carcinoma cells and fibroblasts through TGF- β 1 mediated by podoplanin. *Exp Cell Res.* 2018;369(1):43-53. doi:10.1016/j.yexcr.2018.04.029
 129. Bob P, Raboch J, Maes M, et al. Depression, traumatic stress and interleukin-6. *J Affect Disord.* 2010;120(1-3):231-234. doi:10.1016/j.jad.2009.03.017
 130. Amôr NG, de Oliveira CE, Gasparoto TH, et al. ST2/IL-33 signaling promotes malignant development of experimental squamous cell carcinoma by decreasing NK cells cytotoxicity and modulating the intratumoral cell infiltrate. *Oncotarget.* 2018;9(56):30894-30904. doi:10.18632/oncotarget.25768
 131. Nissinen L, Farshchian M, Riihilä P, Kähäri VM. New perspectives on role of tumor microenvironment in progression of cutaneous squamous cell carcinoma. *Cell Tissue Res.* 2016;365(3):691-702. doi:10.1007/s00441-016-2457-z
 132. Karppinen SM, Honkanen HK, Heljasvaara R, et al. Collagens XV and XVIII show different expression and localisation in cutaneous squamous cell carcinoma: Type XV appears in tumor stroma, while XVIII becomes upregulated in tumor cells and lost from microvessels. *Exp Dermatol.* 2016;25(5):348-354. doi:10.1111/exd.12913
 133. Mittapalli VR, Madl J, Löffek S, et al. Injury-driven stiffening of the dermis expedites skin carcinoma progression. *Cancer Res.* 2016;76(4):940-951. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-1348
 134. Kerkelä E, Ala-Aho R, Jeskanen L, et al. Expression of human macrophage metalloelastase (MMP-12) by tumor cells in skin cancer. *J Invest Dermatol.* 2000;114(6):1113-1119. doi:10.1046/j.1523-1747.2000.00993.x
 135. Nissinen L, Kähäri VM. Matrix metalloproteinases in inflammation. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2014;1840(8):2571-2580. doi:10.1016/j.bbagen.2014.03.007
 136. Silverman GA, Whisstock JC, Askew DJ, et al. Human clade B serpins (ov-serpins) belong to a cohort of evolutionarily dispersed intracellular proteinase inhibitor clades that protect cells from promiscuous proteolysis. *Cell Mol Life*

BIBLIOGRAFÍA

- Sci.* 2004;61(3):301-325. doi:10.1007/s00018-003-3240-3
137. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):436-444. doi:10.1038/nature07205
138. Fedarko NS, Jain A, Karadag A, Fisher LW. Three small integrin binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs) bind and activate specific matrix metalloproteinases. *FASEB J.* 2004;18(6):734-736. doi:10.1096/fj.03-0966fje
139. Rozanov D V., Savinov AY, Golubkov VS, Tomlinson S, Strongin AY. Interference with the complement system by tumor cell membrane type-1 matrix metalloproteinase plays a significant role in promoting metastasis in mice. *Cancer Res.* 2006;66(12):6258-6263. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0539
140. Baron-Bodo V, Doceur P, Lefebvre ML, et al. Anti-tumor properties of human-activated macrophages produced in large scale for clinical application. *Immunobiology.* 2005;210(2-4):267-277. doi:10.1016/j.imbio.2005.05.021
141. Harries M, Hardman J, Chaudhry I, Poblet E, Paus R. Profiling the human hair follicle immune system in lichen planopilaris and frontal fibrosing alopecia: can macrophage polarization differentiate these two conditions microscopically? *Br J Dermatol.* 2020;183(3):537-547. doi:10.1111/bjd.18854
142. Alves AM, Diel LF LM. Macrophages and prognosis of oral squamous cell carcinoma: a systematic review. *J Oral Pathol Med.* 2018;47(5):460-467. doi:10.1111/jop.12643
143. Troiano G, Caponio VCA, Adipietro I, et al. Prognostic significance of CD68+ and CD163+ tumor associated macrophages in head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol.* 2019;93(March):66-75. doi:10.1016/j.oraloncology.2019.04.019
144. Yamagata Y, Tomioka H, Sakamoto K, et al. CD163-Positive Macrophages Within the Tumor Stroma Are Associated With Lymphangiogenesis and Lymph Node Metastasis in Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2017;75(10):2144-2153. doi:10.1016/j.joms.2017.03.009
145. Hadler-Olsen E, Wirsing AM. Tissue-infiltrating immune cells as prognostic markers in oral squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis.

- Br J Cancer*. 2019;120(7):714-727. doi:10.1038/s41416-019-0409-6
146. Pettersen JS, Fuentes-Duculan J, Suárez-Farías M, et al. Tumor-associated macrophages in the cutaneous SCC microenvironment are heterogeneously activated. *J Invest Dermatol*. 2011;131(6):1322-1330. doi:10.1038/jid.2011.9
147. Andersen MN, Etzerodt A, Graversen JH, et al. STAT3 inhibition specifically in human monocytes and macrophages by CD163-targeted corosolic acid-containing liposomes. *Cancer Immunol Immunother*. 2019;68(3):489-502. doi:10.1007/s00262-019-02301-3
148. Kambayashi Y, Fujimura T, Aiba S. Comparison of immunosuppressive and immunomodulatory cells in keratoacanthoma and cutaneous squamous cell carcinoma. *Acta Derm Venereol*. 2013;93(6):663-668. doi:10.2340/00015555-1597
149. Foks M, Wągrowaska-Danilewicz M, Danilewicz M, Bonczysta M, Olborski B, Stasikowska-Kanicka O. The number of CD163 positive macrophages is associated with more advanced skin melanomas, microvessels density and patient prognosis. *Pol J Pathol*. 2019;70(3):217.
150. Ortner D, Tripp CH, Komenda K, Dubrac S, Zelger B, Hermann M, Doppler W, Tymoszyk PZ, Boon L, Clausen BE SP. Langerhans cells and NK cells cooperate in the inhibition of chemical skin carcinogenesis. *Oncoimmunology*. 2016;18(6):1689-1699. doi:10.1080/2162402X.2016.1260215
151. Taghavi N, Bagheri S, Akbarzadeh A. Prognostic implication of CD57, CD16, and TGF- β expression in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2016;45(1):58-62. doi:10.1111/jop.12320
152. Dasgupta S, Bhattacharya-Chatterjee M, O'Malley BW, Chatterjee SK. Inhibition of NK Cell Activity through TGF- β 1 by Down-Regulation of NKG2D in a Murine Model of Head and Neck Cancer. *J Immunol*. 2005;175(8):5541-5550. doi:10.4049/jimmunol.175.8.5541
153. Elahi M, Rakhshan V. MED15, transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1), Fc γ RIII (CD16), and HNK-1 (CD57) are prognostic biomarkers of oral squamous cell carcinoma. *Sci Rep*. 2020;10(1):1-14. doi:10.1038/s41598-020-65145-3

BIBLIOGRAFÍA

154. Bishesar SK, De Ruiter EJ, Devriese LA, Willems SM. The prognostic role of NK cells and their ligands in squamous cell carcinoma of the head and neck: a systematic review and meta-analysis. *Oncoimmunology*. 2020;9(1). doi:10.1080/2162402X.2020.1747345
155. Fraga CADC, Oliveira MVME De, Domingos PLB, et al. Infiltrating CD57+ inflammatory cells in head and neck squamous cell carcinoma: Clinicopathological analysis and prognostic significance. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2012;20(3):285-290. doi:10.1097/PAI.0b013e318228357b
156. Cabibi D, Aragona F, Guarnotta C, et al. Glut-1 expression and in situ CD1a/CD57 immunologic deficit in keratoacanthoma and squamous cell carcinoma of immunocompetent patients. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2011;19(3):239-245. doi:10.1097/PAI.0b013e3181f7b2f0
157. Syafriadi M, Cheng J, Jen KY, Ida-Yonemochi H, Suzuki M, Saku T. Two-phase appearance of oral epithelial dysplasia resulting from focal proliferation of parabasal cells and apoptosis of prickle cells. *J Oral Pathol Med*. 2005;34(3):140-149. doi:10.1111/j.1600-0714.2004.00283.x
158. de Ruiter EJ, Ooft ML, Devriese LA, Willems SM. The prognostic role of tumor infiltrating T-lymphocytes in squamous cell carcinoma of the head and neck: A systematic review and meta-analysis. *Oncoimmunology*. 2017;6(11). doi:10.1080/2162402X.2017.1356148
159. Santos EM, Rodrigues de Matos F, Freitas de Moraes E, Galvão HC, de Almeida Freitas R. Evaluation of Cd8+ and natural killer cells defense in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Cranio-Maxillofacial Surg*. 2019;47(4):676-681. doi:10.1016/j.jcms.2019.01.036
160. Huang Z, Xie N, Liu H, et al. The prognostic role of tumour-infiltrating lymphocytes in oral squamous cell carcinoma: A meta-analysis. *J Oral Pathol Med*. 2019;48(9):788-798. doi:10.1111/jop.12927
161. Lai C, August S, Behar R, et al. Characteristics of immunosuppressive regulatory T cells in cutaneous squamous cell carcinomas and role in metastasis. *Lancet*. 2015;385:S59. doi:10.1016/s0140-6736(15)60374-9
162. Rojas IG, Spencer ML, Zapata PA, et al. CD8+ and FoxP3+ T-cell infiltration in

BIBLIOGRAFÍA

- actinic cheilitis. *Int J Dermatol*. 2017;56(1):54-62. doi:10.1111/ijd.13446
163. Stravodimou A, Tzelepi V, Papadaki H, et al. Evaluation of T-lymphocyte subpopulations in actinic keratosis, in situ and invasive squamous cell carcinoma of the skin. *J Cutan Pathol*. 2018;45(5):337-347. doi:10.1111/cup.13123
164. Akimova T, Hancock WW. How little is known about the role of human FOXP3+ Tregs in tumors. *Expert Opin Ther Targets*. 2018;22(8):655-658. doi:10.1080/14728222.2018.1499728
165. Boduc M, Roessler M, Mandic R, et al. Foxp3 expression in lymph node metastases in patients with head and neck cancer. *Acta Otolaryngol*. 2017;137(11):1215-1219. doi:10.1080/00016489.2017.1353705
166. Koike K, Dehari H, Ogi K, et al. Prognostic value of FoxP3 and CTLA-4 expression in patients with oral squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2020;15(8 August):1-17. doi:10.1371/journal.pone.0237465
167. Santegoets SJAM, Dijkgraaf EM, Battaglia A, et al. Monitoring regulatory T cells in clinical samples: consensus on an essential marker set and gating strategy for regulatory T cell analysis by flow cytometry. *Cancer Immunol Immunother*. 2015;64(10):1271-1286. doi:10.1007/s00262-015-1729-x
168. Azzimonti B, Zavattaro E, Provasi M, et al. Intense Foxp3+CD25+ regulatory T-cell infiltration is associated with high-grade cutaneous squamous cell carcinoma and counterbalanced by CD8+/Foxp3+CD25+ ratio. *Br J Dermatol*. 2015;172(1):64-73. doi:10.1111/bjd.13172
169. Jang TJ. Prevalence of Foxp3 positive T regulatory cells is increased during progression of cutaneous squamous tumors. *Yonsei Med J*. 2008;49(6):942-948. doi:10.3349/ymj.2008.49.6.942
170. Salguero Fernandez I. Importancia del infiltrado inflamatorio y la neovascularización asociada al melanoma y su correlación con el desarrollo de metástasis: Estudio inmunohistoquímico de 81 casos. Árboles de decisión basados en “Machine learning.” Published online 2021.
171. Venables ZC, Autier P, Nijsten T, et al. Nationwide Incidence of Metastatic Cutaneous Squamous Cell Carcinoma in England. *JAMA Dermatology*.

- 2019;155(3):298-306. doi:10.1001/jamadermatol.2018.4219
172. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärnlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G KO. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998;4(7):844-847. doi:10.1038/nm0798-844
173. Galon J, Mlecnik B, Bindea G, et al. Towards the introduction of the “Immunoscore” in the classification of malignant tumours. *J Pathol*. 2014;232(2):199-209. doi:10.1002/path.4287
174. Foote JA, Harris RB, Giuliano AR, et al. Predictors for cutaneous basal- and squamous-cell carcinoma among actinically damaged adults. *Int J Cancer*. 2001;95(1):7-11. doi:10.1002/1097-0215(20010120)95:1<7::AID-IJC1001>3.0.CO;2-X
175. Korhonen N, Ylitalo L, Luukkaala T, et al. Characteristics and trends of cutaneous squamous cell carcinoma in a patient cohort in Finland 2006-2015. *Acta Derm Venereol*. 2019;99(4):412-416. doi:10.2340/00015555-3110
176. Kim Y, Feng J, Su KA, Asgari MM. Sex-based differences in the anatomic distribution of cutaneous squamous cell carcinoma. *Int J Women's Dermatology*. 2020;6(4):286-289. doi:10.1016/j.ijwd.2020.05.008
177. Duran J, Morgan FC, Karia PS, Schmults CD. An evaluation of high-stage cutaneous squamous cell carcinoma outcomes by sex. *Br J Dermatol*. 2017;177(4):1131-1133. doi:10.1111/bjd.15208
178. Thomas-Ahner JM, Wulff BC, Tober KL, Kusewitt DF, Riggenbach JA, Oberyszyn TM. Gender differences in UVB-induced skin carcinogenesis, inflammation, and DNA damage. *Cancer Res*. 2007;67(7):3468-3474. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3798
179. Sahovaler A, Krishnan RJ, Yeh DH, et al. Outcomes of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma in the Head and Neck Region with Regional Lymph Node Metastasis: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2019;145(4):352-360. doi:10.1001/jamaoto.2018.4515
180. Green AC, Olsen CM. Cutaneous squamous cell carcinoma: an epidemiological

- review. *Br J Dermatol*. 2017;177(2):373-381. doi:10.1111/bjd.15324
181. Smith JA, Virk S, Palme CE, et al. Age is not a predictor of prognosis in metastatic cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. *ANZ J Surg*. 2018;88(4):E273-E277. doi:10.1111/ans.13757
182. Zeng S, Fu L, Zhou P, Ling H. Identifying risk factors for the prognosis of head and neck cutaneous squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2020;15(9 September):1-15. doi:10.1371/journal.pone.0239586
183. Brougham NDLS, Dennett ER, Cameron R, Tan ST. The incidence of metastasis from cutaneous squamous cell carcinoma and the impact of its risk factors. *J Surg Oncol*. 2012;106(7):811-815. doi:10.1002/jso.23155
184. Grin CM, Bart RS, Levenstein MJ. Recurrence Rates of. Published online 1991:713-718.
185. Eroğlu A, Berberoğlu U, Berreroğlu S. Risk factors related to locoregional recurrence in squamous cell carcinoma of the skin. *J Surg Oncol*. 1996;61(2):124-130. doi:10.1002/(SICI)1096-9098(199602)61:2<124::AID-JSO6>3.0.CO;2-E
186. Kyrgidis A, Tzellos TG, Kechagias N, et al. Cutaneous squamous cell carcinoma (SCC) of the head and neck: Risk factors of overall and recurrence-free survival. *Eur J Cancer*. 2010;46(9):1563-1572. doi:10.1016/j.ejca.2010.02.046
187. Carter JB, Johnson MM, Chua TL, Karia PS, Schmults CD. Outcomes of primary cutaneous squamous cell carcinoma with perineural invasion an 11-year cohort study. *JAMA Dermatology*. 2013;149(1):35-42. doi:10.1001/jamadermatol.2013.746
188. Karia PS, Morgan FC, Califano JA, Schmults CD. Comparison of tumor classifications for cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck in the 7th vs 8th edition of the AJCC cancer staging manual. *JAMA Dermatology*. 2018;154(2):175-181. doi:10.1001/jamadermatol.2017.3960
189. Fane M, Weeraratna AT. How the ageing microenvironment influences tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2020;20(2):89-106. doi:10.1038/s41568-019-0222-

190. Schröder AK, Rink L. Neutrophil immunity of the elderly. *Mech Ageing Dev.* 2003;124(4):419-425. doi:10.1016/S0047-6374(03)00017-4
191. Škuciová V, Drahošová S, Výbohová D, Cígerová V, Adamkov M. The relationships between PD-L1 expression, CD8+ TILs and clinico-histomorphological parameters in malignant melanomas. *Pathol Res Pract.* 2020;216(9). doi:10.1016/j.prp.2020.153071
192. Wang W, Li L, Chen N, et al. Nerves in the Tumor Microenvironment : Origin and Effects. 2020;8(December):1-16. doi:10.3389/fcell.2020.601738
193. Linedale R, Schmidt C, King BT, et al. Elevated frequencies of CD8 T cells expressing PD-1 , CTLA-4 and Tim-3 within tumour from perineural squamous cell carcinoma patients. Published online 2017:1-13.

11. ANEXO



**DICTAMEN
DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN
DEL HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO REINA SOFÍA
ÁREA DE SALUD VII DE MURCIA**

D^a Inmaculada Sellés Navarro, presidenta del Comité de Ética de la Investigación del Hospital General Universitario Reina Sofía, Área de Salud VII, Murcia Este, le notifica que en la sesión celebrada el 27/10/2020, se examinó la propuesta para que se lleve a cabo en este ámbito el proyecto: **"Contribución clínica al estudio de biomarcadores del cáncer cutáneo no melanoma"**, que realizará como investigadora principal D^a Joana Cruaños Monferrer.

Que en esta reunión los miembros del CEI presentes que figuran en el Anexo I y se cumplieron los requisitos establecidos en la legislación vigente R.D. 1090/2015, y que el CEI, tanto en su composición como en sus procedimientos, cumple con las normas BCP (CPMP/ICH/135/95), que regulan su funcionamiento.

Por lo que este Comité emite Dictamen Favorable. Para la realización de dicho estudio es indispensable obtener la aprobación de la Dirección Médica de este Hospital.

Murcia, a 27 de octubre de 2020

La Presidenta del CEI


Inmaculada Sellés Navarro
HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO
REINA SOFÍA
COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CLÍNICA



**AUTORIZACIÓN DE LA DIRECCIÓN MÉDICA
DEL HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO REINA SOFÍA
ÁREA DE SALUD VII DE MURCIA**

Con el dictamen favorable del Comité de Ética de Investigación Clínica, examinada la solicitud y la documentación aportada, para llevar a cabo el estudio titulado: **"Contribución clínica al estudio de biomarcadores del cáncer cutáneo no melanoma"**, que realizará como investigadora principal D^a Joana Cruañes Monferrer.

El Doctor Fernando de la Cierva Bento, Director Médico del Hospital General Universitario Reina Sofía, Área de Salud VII de Murcia, **AUTORIZA** la realización del mismo.

En Murcia, a 27 de octubre de 2020

El Director Médico


Fernando de la Cierva Bento