

UNIVERSITATEA “OVIDIUS” DIN CONSTANTA
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ
DOMENIUL MEDICINĂ
ANUL UNIVERSITAR 2019-2020

Studiul microclimatului imun și al expresiei PD-L1 în carcinoamele laringiene

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat : **Mariana Așchie**

Doctorand : **Oana Albu (Cojocaru)**

Cuvinte cheie: carcinom, laringe, imunohistochimie, microclimat
imun, PD-L1, cuantificare digitală

CUPRINS

Lista abrevierilor utilizate în text	8
Introducere.....	10
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Date de embriologie, anatomie, histologie și histofiziologia laringelui.....	12
1.1. Embriologia laringelui.....	12
1.2. Anatomia laringelui.....	14
1.3. Vascularizația laringelui.....	23
1.4. Inervația laringelui.....	23
1.5. Histologia laringelui.....	24
Bibliografie selectivă	
2. Date de epidemiologie, de etiologie și patogenie a cancerului larigian	29
2.1. Date epidemiologice asupra cancerului laringian.....	29
2.2. Etiologia cancerului laringian.....	31
Bibliografie selectivă	
3. Aspecte histopatologice și stadializarea cancerelor laringiene.....	42
3.1. Stadializarea OMS a cancerelor laringiene.....	42
3.2. Aspecte histopatologice în tumorile maligne laringiene.....	44
3.3. Clasificarea topografică a CS laringian.....	56
3.4. Variantele morfologice ale carcinomului scuamos laringian	59
3.5. Stadializarea patologică TNM a cancerului laringian.....	68
Bibliografie selectivă	
4. Microclimatul imun în carcinoamele laringiene: alcătuire și aspecte imunohistochimice	
4.1. Componenta celulară a micromediului tumoral.....	78
4.2. Limfocitele stromale tumorale (TIL).....	82

4.3. Ligandul morții programate (apoptozei) (Programmed death-ligand)-PD-L1.....	83
4.4. Expresia p16 și relația cu infecția HPV în cancerul laringian.....	86

Bibliografie selectivă

5. Patologia digitală și rolul ei în diagnosticul histopatologic curent.....	96
---	-----------

Bibliografie selectivă

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

6. Motivația, scopul și obiectivele studiului doctoral	99
---	-----------

6.1. Motivația studiului doctoral.....	99
--	----

6.2. Scopul și obiectivele studiului doctoral.....	101
--	-----

Bibliografie selectivă

7. Material și metodă	104
------------------------------------	------------

7.1. Pacienții și metoda de lucru.....	104
--	-----

7.1.1. Descrierea desenului de studiu.....	104
--	-----

7.1.2. Criterii de eligibilitate și de excludere.....	104
---	-----

7.2. Prelucrarea materialului histopatologic.....	105
---	-----

7.3. Testele imunohistochimice.....	109
-------------------------------------	-----

7.3.1. Examenul imunohistochimic și biomarkerii utilizați.....	109
--	-----

7.3.2. Metode de cuantificare a expresiei imunomarkerilor CD3,CD4 și CD8 – evaluarea lamelor și cuantificarea anticorpilor.....	111
---	-----

7.3.3. PD-L1 – protocolul de obținere a imunocolorației și metoda de cuantificare Protocolul PD-L1	113
---	-----

7.3.4. p16 – examen imunohistochimic și cuantificare	118
--	-----

7.3.5. QuPath – software pentru analiza bioimagingelor microscopice.....	122
--	-----

7.3.6. Prelucrarea și analiza statistică a datelor.....	123
---	-----

Bibliografie selectivă

8. Rezultate și discuții pe baza studiului clinico-morfologic și imunohistochimic. 127

8.1. Rezultate și discuții pe baza studiului clinico-morfopatologic.....	127
---	------------

Bibliografie selectivă

8.2. Rezultate și discuții pe baza studiului imunohistochimic.....	127
---	------------

8.2.1. Evaluarea microclimatului imun pe baza markerilor CD3, CD4, CD8 și p16.....	163
--	-----

8.2.2. Evaluarea microclimatului imun pe baza markerilor CD8 și PD-L1	165
8.2.3. Clasificarea TIME (Tumor Immunity in the MicroEnvironment) a tumorilor laringiene. Corelații între clasele TIME și principalii factori clinico-morfopatologici	211
8.2.4. Discuții asupra rezultatelor obținute, neuniformitatea rezultatelor în literatura de specialitate și necesitatea implementării biomarkerilor predictivi pentru tratamentul imunoterapic	220
Bibliografie selectivă	
9. Concluzii.....	232
Bibliografie generală.....	237
Anexe	273

INTRODUCERE

Cancerul laringian reprezintă unul dintre cele mai comune neoplasme de cap-gât și este unul dintre puținele afecțiuni oncologice la care ratele de supraviețuire la 5 ani au scăzut în ultimii 40 de ani de la aproximativ 66% la 63%, deși incidența a scăzut de asemenea. Rezultatele tratamentului carcinoamelor laringiene rămân modeste la nivel global, ratele incidenței globale la 5 ani fiind în 2018 de 154977 de cazuri la bărbați și 22455 de cazuri la femei. Tot în 2018 s-au înregistrat 81806 decese la sexul masculin și 12965 de decese la sexul feminin, conform datelor publicate de GLOBOCAN [1-5].

Carcinogeneza este un proces multifactorial care nu a fost pe deplin elucidat, iar rolul sistemului imun în etiopatogeneza și progresia tumorilor maligne reprezintă la ora actuală un topic de interes primordial. Acest aspect a fost deja studiat în multe tipuri de tumori solide, ceea ce a avut ca rezultat introducerea în terapie a unor droguri cu acțiune imunomodulatoare și/sau imunostimulatoare.

Teoria controlului imunologic/supravegherii imunologice atribuie roluri specifice pentru diferite tipuri de populații celulare inflamatorii (neutrofile, macrofage și limfocite) de a induce un mediu cu citokine care favorizează apariția răspunsului inflamator cronic tipic afecțiunilor tumorale, în timp ce alte populații celulare de tipul celulelor natural killer NK, limfocitele CD8+ și factorii răspunsului citotoxic major reprezintă supresori ai populațiilor celulare tumorale. Printre mediatorii imuni inhibitori, calea receptorului PD-1 și ai liganzilor săi – PD-L1/PD-L2 joacă un rol important în inducerea și menținerea în periferie a unei toleranțe imunologice și în menținerea stabilității și integrității limfocitului T. De asemenea, această cale mediază semnale potențial inhibitorii pentru a împiedica proliferarea și funcționarea celulelor T efectorii, având efecte nefavorabile asupra imunității antivirale și antitumorale.

Studiile efectuate până în prezent asupra microclimatului imun tumoral pe diferite tipuri de tumori au evidențiat rolul prognostic al diferitelor componente ce alcătuiesc acest micromediu (nivelul limfocitelor CD3, CD4, CD8), dar și rolul prognostic al expresiei PD-L1, existând studii și pe cancerle laringiene, însă cu rezultate contradictorii.

Ideea inițială a acestui studiu a pornit de la rolul infecției Human Papilloma Virus (HPV) în carcinogeneza la nivelul laringelui și corelarea acesteia cu expresia proteinei p16, însă studiile efectuate pe cohorte mari de pacienți au arătat că procentul tumorilor maligne laringiene asociate cu infecția virală este unul redus. Carcinoamele laringiene sunt parte a cancerelor de

cap-gât, iar asupra acestora din urmă s-au efectuat numeroase studii legate de micromediul imun și de expresia PD-L1, lucru care mi-a atras atenția. În studiul actual am analizat micromediul imun în carcinoamele laringiene prin intermediul examenului imunohistochimic cu ajutorul markerilor CD3, CD4, CD8, p16, dar și expresia PD-L1 corelată cu nivelul limfocitelor CD8. Cazuistica aparține Spitalului Clinic Județean de Urgență "Sf. Apostol Andrei" Constanța.

Lucrarea este structurată în două părți, cu 9 capitole, primele 5 reprezentând stadiul actual al cunoașterii, iar ultimele 4 contribuțiile personale.

Stadiul actual al cunoașterii

În primul capitol al lucrării am trecut în revistă date despre embriologie, anatomia și fiziologia laringelui, aspectele histologice, iar în capitolul al 2-lea am adus date despre epidemiologia cancerului laringian și am abordat factorii etiologici. În capitolul al 3-lea am abordat clasificarea actualizată OMS a carcinoamelor laringiene și clasificarea pTNM, dar și aspectele histopatologice ale carcinoamelor laringiene, cu accent pe carcinoamele scuamoase convenționale și pe variantele morfologice ale acestora. Am descris aspectele în colorație uzuală, aspectele imunohistochimice și diagnosticul diferențial. Capitolul al 4-lea cuprinde date despre microclimatul imun tumoral, cu accent pe componenta celulară, în special limfocitele stromale și importanța actuală a PD-L1, legătura cancer laringian-etologia virală HPV și relația dintre expresia p16 și infecția HPV în carcinoamele laringiene. Ultima parte (capitolul al 5-lea) din stadiul actual al cunoașterii evidențiază rolul actual al patologiei digitale în diagnosticul curent al tumorilor laringiene.

Contribuții personale

Scopul studiului actual constă în corelarea aspectelor clinico-morfopatologice cu microclimatul imun, prin limfocitele stromale evaluate cu ajutorul markerilor CD3, CD4 și CD8 și cu expresia PD-L1 în carcinoamele laringiene.

Obiectivele studiului doctoral :

- analiza clinico-morfopatologică a cazurilor studiate.
- analiza microclimatului imun tumoral în CL cu ajutorul expresiei markerilor CD3, CD4, CD8, p16 și PD-L1, dar corelația claselor TIME cu factorii morfo-patologici.
- analiza statistică a datelor obținute .

MATERIAL ȘI METODĂ

Cercetarea pentru studiul doctoral s-a bazat pe analiza retrospectivă a tumorilor laringiene biopsiate/operate în clinica ORL a Spitalului Clinic de Urgență "Sf. Apostol Andrei" Constanța, pe o perioadă de 9 ani (01.01.2011-31.12.2019), cu diagnostic histopatologic în Serviciul Clinic de Anatomie Patologică Constanța. Registrul unic de înregistrare din cadrul

serviciului de anatomie patologică și baza de date informatizată a spitalului au constituit sursele din care au fost extrase datele clinice ale pacienților (vârstă, sex, sediul tumorilor, data diagnosticului, tratamentul ulterior), informațiile anatomopatologice (tipul specimenului chirurgical – biopsie, laringectomie cu sau fără disecție ganglionară regională), diagnostic anatomopatologic, gradul tumoral, stadializarea pTNM și evoluția ulterioară la cazurile care au putut fi urmărite.

În perioada luată în studiu au fost diagnosticate și tratate 404 cazuri de leziuni și tumori maligne laringiene, din care 370 de biopsii și 34 laringectomii. Dintre acestea am selectat un lot de 76 de biopsii, pentru care am realizat examenul imunohistochimic pentru biomarkerii luați în studiu și de asemenea un lot de 23 de cazuri laringectomii pentru care s-a efectuat PD-L1 și CD8 și, de asemenea, încadrarea în clasele TIME. Pentru acest lot s-a putut efectua urmărirea pe o perioadă de minim 12 luni, pentru a putea determina dacă prognosticul pe termen scurt al acestor tumori este influențat de componența microclimatului imun și de expresia PD-L1.

După prelucrarea pieselor examinate, a urmat evaluarea microscopică, finalizată cu elaborarea raportului histopatologic care a inclus elementele obligatorii și suplimentare, necesare evaluării cât mai amănunțite a leziunii tumorale [6-7].

Examenul imunohistochimic Imunocolorarea s-a efectuat pe aparat de imunohistochimie complet automat Ventana BenchMark GX Automated system, cu anticorpi anterior validați CD3, CD4, CD8, p16 și PD-L1.

Cuantificarea expresiei imunomarkerilor CD3, CD4 și CD8 s-a realizat după scanarea lamelor cu ajutorul scannerului s-a realizat după scanarea la scannerul HURON Tissuescope 4000x (CEDMOG Constanța-Centrul de Cercetare Dezvoltare pentru Studiul Morfologic și Genetic în Patologia Malignă). Imaginile au fost interpretate apoi cu ajutorul programului de cuantificare digitală QuPath, un program dezvoltat de Peter BankHead, în anul 2017, program care mi-a permis numărarea limfocitelor pozitive pe mm²[8].

Anticorpi	Valoare cut-off*10 ² /mm ²	Nivel scazut	Nivel ridicat
CD3	5,7	0 < 5,7	≥5,7
CD4	4,3	0 < 4,3	≥ 4,3
CD8	3,6	0 < 3,6	≥ 3,6

Tabel nr. 11. Valorile cut-off ale anticorpilor

Tabel nr. 12. Clasificarea TIME în funcție de expresia PD-L1 și nivelul TIL[14].

I	II	III	IV
---	----	-----	----

PD-L1 negativ TIL negativ/nivel scăzut Ignoranța imunologică	PD-L1 pozitiv TILpozitiv/nivel crescut Rezistență adaptativă	PD-L1 negativ TILpozitiv/nivel crescut Toleranță	PD-L1pozitiv TILnegativ/nivel scăzut Inducție intrinsecă
--	--	--	--

Cuantificarea PD-L1 în cancerul de cap-gât, inclusiv laringe

Expresia PD-L1 se cuantifică cu ajutorul scorului pozitiv combinat (CPS), care reprezintă numărul de celule pozitive PD-L1 (celule tumorale, limfocite și macrofage) împărțite la numărul total de celule viabile, multiplizat cu 100. Deși rezultatul poate depăși 100, scorul maxim este definit ca CPS 100. Formula după care se calculează CPS:

$$\text{CPS} = \frac{\text{\#celule pozitive} \times 100}{\text{Nr. Total de celule viabile}}$$

Nr. Total de celule viabile

Celule pozitive = celule tumorale, limfocite, macrofage

p16: Interpretarea colorației: CINtec p16 histology este o colorație nucleară și citoplasmatică. p16 a fost considerat pozitiv dacă mai mult de 70% din celulele tumorale au avut reacție nucleară pozitivă moderată sau intensă [15].

Prelucrarea statistică a datelor clinice, morfopatologice și imunohistochimice au fost introduse și analizate în baza electronică de date a platformei SPSS (Pachet Statistic pentru Științe Sociale, din engleză – Statistical Package for the Social Sciences).

REZULTATE ȘI DISCUȚII PE BAZA STUDIULUI CLINICO-MORFOLOGIC ȘI IMUNOHISTOCHIMIC

Rezultate și discuții pe baza studiului clinico-morfopatologic

În perioada 01.01.2011-31.12.2019, în cadrul Servicului Clinic de Anatomie Patologică al Spitalului Clinic Județean de Urgență „Sf. Apostol Andrei,, Constanța au fost diagnosticați 404 pacienți, de ambele sexe, cu leziuni laringiene preneoplazice și maligne, toți beneficiind în prealabil de internare și tratament chirurgical minim sau rezecții în Clinica ORL a spitalului nostru, apoi de examen anatomopatologic complet. Acestea au predominat la sexul masculin, înregistrându-se un număr de 367 cazuri, la sexul feminin în număr de 37. Dintre acestea 58 au fost leziuni premaligne și 346 carcinoame invazive, ultimele incluzând și variantele de SCC diagnosticate: 7 cazuri de SCC bazaloid, 2 cazuri de SCC verucos, 3 de SCC papilar, 3 de SCC, 3 de SCC cu celule fusiforme și 1 caz de carcinom adenoscuamos. La bărbați s-au diagnosticat

367 leziuni, dintre care 50 (13,62%) leziuni premaligne și 317 (86,37%) carcinoame invazive, iar la femei 37 de leziuni, din care 7 (18,91%) premaligne și 30 carcinoame invazive (81,08%). Pe baza criteriilor de eligibilitate, în studiul meu am inclus 99 de cazuri, dintre care 76 biopsii și 23 laringectomii totale. Precizez faptul că, dintre cele 404 cazuri în total, 370 au fost fragmente biotice și 34 laringectomii totale. În cazul laringectomiilor totale, nu toate au putut beneficia de follow-up. Procentual, la femei s-au înregistrat 9,2% (37 de cazuri), iar la bărbați 90,8% (367 de cazuri). Ceea ce se evidențiază din grafic este o oscilare a numărului de cazuri la bărbați de-a lungul perioadei de studiu, dar și creșterea numărului de cazuri la femei, cu un vârf în 2019, probabil datorită schimbării comportamentelor la femei, în sensul creșterii consumului de alcool și de tutun, așa cum au arătat și alte studii [17]. Cel mai tânăr pacient a avut 33 de ani (0,2%), iar cei mai vârstnici 85 de ani (3 pacienți, 0,7%).

Au predominat SCC convenționale, fapt evidențiat și de alte studii din țara noastră [18]. Celelalte tipuri de SCC au fost mult mai rare, dintre acestea cel mai frecvent fiind SCC bazaloid (9 cazuri) și cel mai rar SCC adenoscuamos cu un singur caz.

Din punct de vedere histopatologic, din totalul de 346 de carcinoame diagnosticate, predominante au fost SCC, din care la sexul masculin 91,77%, SCC bazaloid, predominant tot la bărbați (77,8%, 7 cazuri din 9 diagnosticate). Celelalte variante – verucos, papilar, fusiform, adenoscuamos au fost mult mai rare și toate diagnosticate la sexul masculin, variind între unul și 3 cazuri fiecare. Vârsta medie a pacienților a fost de $60,59 \pm 8,38$, la femei fiind de 59,37 de ani, iar la bărbați ușor mai crescută, de 60,70 de ani. Testul Chi-Pătrat a arătat o legătură directă între simptomatologie și localizare, conforme cu rezultatele altor studii [19], valoarea lui fiind de 0,01 ($<0,05$).

Rezultate și discuții pe baza studiului imunohistochimic

Evaluarea microclimatului imun pe baza markerilor CD3, CD4, CD8 și p16

În studiul actual, nivelul limfocitelor CD3+ este definit ca scăzut la valori mai mică de $5,7 \times 10^2/\text{mm}^2$ și înalt la valori ce depășesc $5,7 \times 10^2/\text{mm}^2$, nivelul CD4+ este scăzut la valori sub $4,3 \times 10^2/\text{mm}^2$ și crescut la valori peste $4,3 \times 10^2/\text{mm}^2$, iar valoarea cut-off a CD8+ este $3,6 \times 10^2/\text{mm}^2$.

Clasificarea cazurilor în funcție de nivelul anticorpilor (scor dihotomizat în funcție de valoarea medie a limfocitelor/ mm^2).

Markeri TIL	CD3	CD4	CD8
Scor IHC dihotomizat	< 5,7 ≥	< 4,3 ≥	< 3,6 ≥
Scor scăzut	59	57	31
Scor crescut	17	19	45
Total	76	76	76

În studiul actual, din cele 76 de cazuri luate în studiu, 59 de cazuri (77,6%) au avut nivel CD3 scăzut, și 17 cazuri (22,36%) nivel ridicat, rezultate asemănătoare cu cele ale lui Balermipas și colab [26]. În ceea ce privește repartitia pe grade de diferențiere, analiza statistic de tip crosstabulation a arătat că din cele 59 de cazuri (77,6%) cu nivel CD3 scăzut, cel mai mare procent a aparținut SCC G2, iar din cele 17 cazuri cu nivel ridicat (22,4%), cel mai mare procent a aparținut SCC G3, fără să existe o asociere semnificativ statistică (testul chi-pătrat: $\chi^2(df2) = 2$; $p=0,316$).

Repartiția pe vârste a CD3 avut nivel ridicat în 17 cazuri, din care 8 cazuri sub 60 de ani și 9 cazuri peste 60 de ani, iar nivel scăzut în 59 de cazuri, din care 24 sub 60 de ani, rezultate care se corelează cu cele ale studiului lui Balermipas [26]. Vârsta de 60 de ani a fost considerată punct de cut-off, întrucât sunt studii care au evidențiat că poate fi un factor prognostic independent pentru supraviețuirea fără evenimente atât în cancerul de cap-gât cât și în cancerul laringian [27]. De asemenea, raportul trombocite-limfocite este mai scăzut la pacienții de peste 60 de ani, conform studiilor recente care investighează microclimatul inflamator și pe baza elementelor sangvine periferice [28].

De asemenea, s-a remarcat un nivel crescut al CD3 în 13 cazuri la bărbați, comparativ cu numai 4 cazuri la femei, pe când nivelul scăzut al CD3 s-a remarcat la 55 de bărbați și numai 4 femei. Analiza statistică a relevat o asociere semnificativ statistică între cei 2 parametri, testul $\chi^2(df2) = 0,047$, între cei 2 parametri existând o corelație negativă (corelația Spearman $R_s = -0,227$, $p < 0,05$). Acest rezultat nu se suprapune peste datele altor studii din literatură [26,29]. Relația dintre CD3 și localizarea tumorală evidențiază originea predominant glotică pentru cazurile CD3 crescut (15 cazuri, 88,23%), urmată de cea supraglotică (2 cazuri, 11,77%), iar comportamentul cu privire la factorii de risc arată că din cei 76 pacienți, 59 au fost fumători (fumat intens și moderat) și numai 8 au fost nefumători. Dintre cei fumători, 12 au prezentat expresie CD3 crescută (85,3%), iar dintre nefumători numai 2 (25%). Nu a fost identificată nicio asociere semnificativ statistică între acești parametri. Stadiul clinic inițial a fost T1-T2 pentru 18 cazuri și avansat T3-T4 pentru 36 de cazuri. Dintre cele T1-T2, 12 cazuri (66,66%) au fost CD3 scăzut, iar 6 cazuri (33,33%) CD3 crescut. Iar între cazurile de stadiu avansat, 29 (80,55%) au fost CD3 scăzut și numai 7 (19,44%) CD3 crescut.

Metastazele ganglionare s-au încadrat în stadiul N0-N1 în 15 cazuri, N2a-N2b în 8 cazuri și N2c-N3 în numai 5 cazuri. Expresia CD3 a fost crescută în 5 cazuri (62,5%) N0-N1, în 2 cazuri (25%) N2a-N2b și numai 1 caz (12,5%) N2c-N3. Între expresia CD3 și factorii clinici nu au existat corelații semnificativ statistice, rezultate care se suprapun peste studiul din 2017 al lui Karpathiou [30]. Acest studiu a demonstrat că nivelul crescut al limfocitelor CD3+ se asociază cu o mai bună supraviețuire generală, iar impactul prognostic este puternic pentru limfocitele din compartimentul stromal comparativ cu cele din compartimentul frontului tumoral. Infiltrarea cu limfocite CD3+ a fost studiată ca factor de prognostic în serii mici de cazuri de carcinoma scuamos de cap-gât, iar rezultatele au fost extrem de variabile întrucât unele studii le-au evidențiat ca un factor de prognostic pozitiv [31], iar altele nu au evidențiat nicio corelație cu supraviețuirea. În studiul lui Balermipas din 2016, studiu efectuat pe o cohortă de 161 de pacienți, nivelul CD3 crescut a fost factor de prognostic pozitiv [32].

Expresia CD4 a fost scăzută în 57 de cazuri (75%) și crescută în 19 cazuri (25%), iar repartitia pe grade de diferențiere a evidențiat cele mai multe cazuri CD4 scăzut în categoria SCC G2, iar cele mai multe CD4 crescut în categoria SCC G3, rezultate neconcordanțe cu studiul lui Balermipas [26], care arată însă o asociere semnificativă statistic între cele două variabile, cu o corelație pozitivă între cei doi parametri, valoarea testului $\chi^2(df2) = 6,350$; $p=0,012$), iar corelația Sperman R_s având valoarea 0,288.

În ceea ce privește vârsta, cele mai numeroase cazuri CD4+ crescut au fost la pacienți peste 60 de ani, astfel că din cele 19 cazuri, 12 (63,15%) au aparținut pacienților din decada a 7-a și numai 7 cazuri (36,85%) pacienților sub 60 de ani. CD4 a înregistrat un nivel crescut în studiul nostru în 19 cazuri, din care 18 la bărbați și numai unul la femei, iar dintre cazurile cu nivel scăzut majoritatea au aparținut sexului masculin, statistica de corelație neevidențind nicio corelație semnificativ statistică, testul $\chi^2(df2) = 0,338$. Localizarea corelată cu nivelul limfocitelor CD4 nu a evidențiat nicio asociere semnificativ statistică, aspect superpozabil cu alte studii [26], cele mai multe cazuri cu nivel CD4+ crescut fiind localizate la nivel glotic (17 cazuri, 94,44%). Factorii de risc, fumatul și consumul de alcool nu s-au corelat semnificativ statistic cu nivelul CD4+, asemănător cu alte studii [30]. Astfel, toți pacienții au fost fumători (14 cazuri, 100%) și 17 (100%) din au negat consumul de alcool sau au declarat consum moderat, niciunul cu consum ridicat.

În studiul actual, cele mai multe tumori au fost în stadii avansate T3-T4, iar dintre cele 11 cazuri cu nivelul limfocitelor CD4+ crescut, au fost încadrate în stadii avansate 5 cazuri (45,45%). Iar metastaze ganglionare stadiul N2c-N3 au prezentat numai 2 cazuri din 5 cu nivel CD4+ crescut (40%). Sunt studii care arată că nivelul crescut al CD4+ nu afectează prognosticul

pacientului, dar se corelează cu absența metastazelor la distanță [33]. Limfocitele T CD4+ împreună cu celulele dendritice oferă suport răspunsului celulelor T citotoxice și ajută alte celule citotoxice ale sistemului imun, ca celulelor NK și macrofagelor [34].

Expresia CD8 a fost scăzută (73,76) în 31 (41%) din cazuri și crescută în 45 (59%) din cazuri, iar analiza statistică a arătat că 76,08% din cazuri au expresia CD8 crescut și grad de diferențiere G1-G2 (35 de cazuri), iar 16 cazuri (21,05%) sunt carcinoame slab diferențiate G3 și nivel crescut CD8. Nu există corelație între cele două variabile, testul $\chi^2(df2) = 0,485$.

Expresia crescută a CD8 a predominat la pacienții de peste 60 de ani (32 de cazuri, 71,11%) și interesant este faptul că majoritatea cazurilor au avut un nivel crescut CD8 (45 față de numai 31 de cazuri cu CD8 scăzut). Analiza statistică de tip crosstabulation nu a evidențiat nicio corelație semnificativ statistică. Diferențele corelate cu decadele de vârstă au indicat faptul că odată cu înaintarea în vârstă se modifică harta microclimatului imun al pacienților, ceea ce influențează răspunsul antitumoral al acestora și răspunsul la tratament [35].

CD8 a prezentat un nivel ridicat în 51 de cazuri, din care 48 la bărbați (94,11%) și numai 3 la femei (5,89%), numărul cazurilor cu CD8 de nivel scăzut fiind mult mai mic. Se remarcă faptul că numărul de cazuri CD8 crescut depășește cu mult numărul cazurilor CD3 și CD4 crescut, statistic neexistând o asociere semnificativă între parametri. Datele nu se suprapun peste cele din literatură [26]. Tumorile infiltrate cu un nivel crescut de limfocite T CD8+ au fost localizate predominant la nivel glotic (45 cazuri, 88,23%) și numai 6 la nivel supraglottic (11,77%).

Nivelul crescut al limfocitelor CD8+ (Fig. 84) predomină la pacienți fumători - 39 cazuri (88,63%), nefumătorii fiind numai 5 cazuri (11,36%). De asemenea, 4 pacienți (9,09%) sunt consumatori de alcool în cantitate crescută, restul de 45 cazuri (91,83%) fiind consumatori de cantități moderate. În ceea ce privește stadiul clinic pT, 24 de cazuri (68,57%) au prezentat nivel al limfocitelor CD8+ crescut și stadiu avansat T3-T4, iar 11 cazuri (31,42%) stadii timpurii T1-T2. Metastazele ganglionare N1 sau N0 au predominat în tumorile cu nivel ridicat CD8+ (13 cazuri, 72,22%).

În studiul actual, în ceea ce privește localizarea tumorală și markerii studiați, se observă că toți cei 3 markeri CD3, CD4 și CD8 au înregistrat un număr crescut de cazuri cu nivelul crescut pentru localizarea glotică, iar cele mai puține pentru localizarea subglotică. Analiza statistică nu a evidențiat o asociere semnificativ statistică între cei 2 parametri.

Corelând stadiul clinic inițial cu nivelul markerilor CD s-a constatat că nivelul crescut al acestora se înregistrează pentru stadiul tumoral avansat, pentru fiecare marker în parte. Astfel,

din 18 cazuri T1-T2, 6 dintre ele au fost CD3 și CD4 nivel crescut și 11 nivel CD8 crescut. Testul chi-pătrat nu a indicat nicio asociere semnificativă statistic.

Stadiul N clinic initial dominant a fost N0-N1 (15 cazuri), urmat de N2a-2b (8 cazuri) și N2c-N3 cu numai 5 cazuri. Pentru cazurile N0-N1, CD8 crescut a predominat (13 cazuri din 15), în timp ce ceilalți 2 markeri CD3 și CD4 au înregistrat un nivel crescut în 5, și respective 2 cazuri. Pentru stadiile N2a-2b și N2c-N3, CD3 și CD4 au avut nivel scăzut dominant. Aceste date se suprapun partial peste cele din literatură [26]. Sunt studii care arată că tumorile infiltrate cu numeroase limfocite T au un prognostic mai bun comparativ cu pacienții ale căror tumori sunt lipsite de limfocitele T în număr crescut [30]. Ca și în studiul nostru, nici în cel al lui Karpathiou (2017), CD3 și CD8 nu s-au corelat cu mulți factori clinici sau histologici (localizare, T, N, grade histologice de diferențiere, factori de risc, vârstă, sex). Acest aspect sugerează că răspunsul imun CD3 și CD8 este mai degrabă o caracteristică constitutivă, independentă de trăsăturile clinicohistologice tumorale cunoscute. Totuși, în studiul actual CD4 s-a corelat semnificativ statistic cu gradul de diferențiere ($p=0,012$), iar CD3 cu sexul pacientului ($p=0,047$). Karpathiou a evidențiat și faptul că densitatea crescută a limfocitelor CD4+ s-au asociat cu absența metastazelor la distanță [30].

Affara și colab au studiat CD3 în asociere cu CD20 și CD163, evidențiind o legătură între reacția T-limfocitară și limfocitele B și macrophage. Datele experimentale pe carcinoamele scuamoase sugerează că limfocitele B promovează creșterea tumorală în special în displazii și că anticorpii monoclonali anti-CD20 cresc responsivitatea la chemoterapie. Acest din urmă effect necesită acțiune a macrofagelor și limfocitelor CD8 [36].

p16 a fost pozitiv în 17 (22,3%) cazuri și negativ în 59 (77,63%) de cazuri, 12 cazuri (70,58%) p16 pozitiv înregistrându-se la categoria de vârstă sub 60 de ani și numai 5 cazuri (29,42%) la peste 60 de ani. Repartiția pe sexe cuprinde 15 cazuri la sexul masculin (88,23%) și 2 cazuri la sexul feminin (18,75%). Localizarea a fost predominant glotică (13 cazuri, 81,25%), la nivel supraglotic fiind localizate numai 3 cazuri (17,64%), iar subglotic numai 1 caz (5,88%). Aceste rezultate diferă de studiul recent din 2019 [37] al lui Dogantemur și colab., în care majoritatea cazurilor p16 pozitive au fost localizate la nivel supraglotic.

Din cele 17 cazuri p16 pozitive, 10 au fost slab diferențiate G3 (58,8%), iar 7 (41,17%) au fost bine și moderat diferențiate G1-G2.

13 cazuri (81,25%) p16 pozitive au fost depistate la pacienți fumători, și 15 cazuri (88,23%) la pacienți care nu sunt consumatori de alcool sau cu consum moderat. Rezultatele se corelează parțial cu cele ale altor studii ale expresiei p16 [38]. Analiza statistică a evidențiat o asociere semnificativ statistică numai în cazul gradului de diferențiere, testul $\chi^2(df2) = 5,89$,

$p=0,015 < 0,05$, între cei 2 parametri existând o corelație negativă, indicele Spearman $R_s = -0,278$.

Evaluarea microclimatului imun pe baza markerilor CD8 și PD-L1.

În lotul pentru studiul TIL CD8+ corelate cu expresia PD-L1 au fost incluse 23 de cazuri de carcinoame scuamoase laringiene (laringectomii totale) care au prezentat criteriile de eligibilitate. Caracteristicile clinico-patologice ale cazurilor analizate sunt prezentate mai jos.

Dintre acestea, frecvența mai mare au avut-o carcinoamele la pacienți peste 60 de ani (56%), de sex masculin în proporție de 96%. Media de vârstă a fost de $61,48 \pm 4,42$. Localizarea predominantă a fost cea glotică (61%), urmată de transglotică (17%) și infraglotică (13%). Localizarea supraglotică a fost cea mai rară (9%). Disfonia a fost cel mai frecvent simptom (78%), iar fumătorii cu peste 40 de țigarete/zi au înregistrat 43% din cazuri, iar nefumătorii 57%. Din punct de vedere al gradului de diferențiere au predominat carcinoamele moderat diferențiate G2 cu 61% din cazuri, urmate de cele slab diferențiate G3 cu 30%, restul fiind bine diferențiate G1 (9%). 57% dintre carcinoamele studiate au fost diagnosticate în stadii incipiente T1-T2, restul de 43% în stadii avansate T3-T4.

Corelațiile densității CD8+ cu caracteristicile clinico-patologice

Toate cazurile incluse în grupul al 2-lea de studiu au beneficiat de cuantificarea limfocitelor TIL CD8+ cu ajutorul programului de cuantificare digitală QuPath, care a permis numărarea limfocitelor pe mm^2 , pe 3 arii pentru fiecare caz în parte, peritumoral și stromal. Numărul mediu a constituit punctul cut-off, față de care am stabilit nivelul scăzut și crescut al limfocitelor CD8+ [39].

În studiul actual, majoritatea cazurilor au prezentat nivel CD8+ crescut (15 cazuri, 65,21%), predominant la pacienți peste 60 de ani, toți de sex masculin. La pacienții sub 60 de ani (unde se încadrează și singurul pacient de sex feminin), numărul de cazuri cu CD8+ crescut a fost egal cu cel al cazurilor CD8+ scăzut (5 cazuri, 21,73%). Din cele 15 cazuri CD8+ crescut, cea mai mare pondere este reprezentată de SCC G1-G2 (11 cazuri, 47,82%), comparativ cu numai 4 cazuri (17,39%) de SCC G3. Deși analiza statistică nu a evidențiat o asocieră semnificativă statistic, este de menționat că nivelul CD8+ crescut a predominat la pacienții nefumători (8 cazuri, 34,78%), depășind numărul pacienților fumători cu nivel CD8+ crescut. De asemenea, numărul cazurilor CD8+ crescut la pacienți cu SCC în stadiul T1-T2 (8 cazuri, 34,78%), l-a depășit ușor pe cel al pacienților cu stadii avansate de boală T3-T4 (7 cazuri, 30,43%). Nivelul CD8+ scăzut a predominat la pacienți cu SCC în stadii incipiente de boală T1-T2 (5 cazuri, 21,73%). Numărul de ganglioni cu metastază a fost mai mic la pacienți la care

nivelul CD8+ a fost crescut (9 cazuri, 39,13%), comparativ cu pacienții cu număr ridicat de ganglioni cu metastază (stadiul N2c-N3) – numai 2 cazuri (8,69%).

Analiza statistică dintre nivelul CD8+ și expresia PD-L1 a demonstrat o asociere semnificativ statistic (testul chi patrat; χ^2 (df2) = 2; p = 0,019), între cei doi parametri evidențiindu-se o corelație pozitivă (corelația Spearman r_s = 0,516). Analiza statistică dintre nivelul CD8+ și ceilalți parametri clinico-patologici nu a relevat asocieri semnificative statistic, ceea ce se suprapune peste datele obținute de Vassilakopoulou [40]. Ca și în acest studiu și în cazul studiului actual a existat o asociere semnificativ statistică între nivelul CD8+ și expresia PD-L1. Cauzele/determinanții biologici ai acestei asocieri nu sunt pe deplin cunoscute. De exemplu, în melanoamele infiltrate cu limfocite T CD8 pozitive la nivelul stromei, a existat o expresie înaltă a elementelor imunosupresive precum limfocite Treg, proteina PD-L1 și mARN. Inducția acestor căi inhibitorii imune în microclimatul tumoral depinde de prezența limfocitelor T CD8+ și IFN [41].

Toate cazurile au beneficiat de examen imunohistochimic pentru determinarea expresiei PD-L1. Aceasta a fost cuantificată cu ajutorul scorului pozitiv combinat (CPS), reprezentat de numărul de celule pozitive PD-L1 (celule tumorale, limfocite și macrofage), divizate la numărul total de celule tumorale viabile, multiplicat cu 100, acesta fiind scorul utilizat în urma folosirii clonei 22C3. Tumorile au fost clasificate după sistemul: CPS<1 (PD-L1 negativ), CPS = 1-19 (PD-L1 + pozitiv) și CPS≥20 (PD-L1 + nivel crescut).

Din cele 23 de cazuri studiate, majoritatea au fost PD-L1 negative (14 cazuri, 60,86%), cele pozitive având o pondere mai mică (9 cazuri, 39,13%). Dintre cele pozitive, 5 cazuri (21,73%) au avut valoarea PD-L1>1, iar 4 cazuri (17,39%) au avut valoarea peste 20, acestea din urmă fiind distribuite în mod egal între cele 2 categorii de vârstă (sub și peste 60 de ani). La bărbați, cele mai multe cazuri au fost negative (13 cazuri, 56,52%), unicul caz la sexul feminin a fost de asemenea negativ. Gradul de diferențiere tumoral a înregistrat diferențe în expresia PD-L1, astfel, atât tumorile bine și moderat diferențiate (G1 și G2) cât și la cele slab diferențiate (G3) au fost predominant PD-L1 negative (9 cazuri, 39,13%, respectiv 5 cazuri, 21,73%). Între tumorile slab diferențiate procentul celor pozitive per ansamblu este mic, cu doar 1 caz pentru fiecare categorie în parte (2 cazuri pozitive, 8,69%). În funcție de stadiul tumoral (pT), din cele 10 cazuri (43,47%) de tumori PD-L1 pozitive, majoritatea au fost tumori în stadii incipiente (T1-T2) (6 cazuri, 26,08%), cele din stadiile avansate T3-T4 înregistrând numai 4 cazuri (17,39%).

Analiza statistică nu a evidențiat asocieri semnificativ statistic între expresia PD-L1 și comportamentul legat de condiția de fumător, numărul de cazuri pozitive și negative fiind egale la nefumători (5 cazuri, 21,73%), iar la marii fumători, cele mai multe cazuri sunt negative (9 cazuri, 39,13%), numai 4 fiind pozitive (17,39%). Cele mai multe cazuri PD-L1 pozitive au fost cele cu statusul ganglionar N0-N1 (6 cazuri, 26,08%), comparativ cu numai 3 cazuri (13,04%) pozitive pentru statusul ganglionar N2a-N2b și 0 cazuri pentru N2c-N3. În ceea ce privește invazia perineurală, se observă că numărul de cazuri negative IPN0 și IPN1 sunt egale (7 cazuri, 30,43%), iar majoritatea cazurilor PD-L1 pozitive nu au asociat invazie perineurală (7 cazuri, 30,42%), comparativ cu cazurile PD-L1 pozitive, cu invazie perineurală asociată, cu număr redus (2 cazuri, 8,69%). De asemenea, cele mai multe cazuri care au asociat invazie angiolimfatică, au fost PD-L1 negative (9 cazuri, 39,13%) și 8 pozitive (34,78%) (4 cazuri PD-L1 1-19, 4 cazuri PD-L1 >20).

Analiza statistică de tip crosstabulation a arătat o asociere semnificativ statistică între expresia PD-L1 și nivelul CD8+, valoarea testului chi-pătrat fiind de 0,019, cu o asociere negativă, valoarea testului Pearson $R_s = -0,537$.

Până în prezent au fost efectuate foarte puține studii ale carcinoamelor laringiene cu privire la expresia PD-L1 și a TIL. În 2015 și respectiv, 2019 Vassilakopoulou și colab[40] și Ismail și colab [42], au studiat corelația dintre expresia PD-L1 și limfocitele stromale TIL în carcinoame laringiene. În primul studiu, a fost selectată o cohortă de pacienți cu SCC laringian care au beneficiat de laringectomie totală (86,2%) sau de procedee conservative (13,8%), în timp ce radioterapia postoperatorie a fost administrată la 32,7% dintre aceștia, iar disecția ganglionilor a fost efectuată în 28,5% [40]. Pacienții selectați în cohorta noastră au suferit laringectomie totală și disecția ganglionilor, acestea fiind și criterii de eligibilitate. Tratamentul radioterapic nu a fost urmărit, fiind în parte aplicat pacienților, de aceea nu a fost introdus în corelația cu alți parametri. Media de vârstă a pacienților a fost de $61,48 \pm 4,42$ ani, o medie de vârstă mai scăzută față de 63 de ani din studiul amintit. Localizarea preferențială a SCC în studiul actual este glotică și supraglotică (70%), ceea ce se suprapune peste datele evidențiate de studiul din 2015, unde tot aceasta a predominant în proporție de 90%. Tumorile în stadii avansate au reprezentat 43%, un procent mai mic comparativ cu studiul amintit (79,6%). 14 cazuri (60,86%) nu au prezentat metastaze limfoganglionare, procent mai mic comparativ cu 84,6% din studiul lui Vassilokopoulou.

În ceea ce privește nivelul limfocitelor CD8+, în studiul nostru 65,21% dintre cazuri au prezentat nivel crescut, în timp ce în studiul de referință 36,1%, procent mult mai redus, iar numărul cazurilor cu nivel CD8+ scăzut a fost de 63,8%, pe când în studiul actual de numai

34,78%. Nu a fost observată nicio corelație semnificativ statistică între nivelul CD8+ și stadiul tumoral (T), gradul de diferențiere, statusul nodal și comportamentul de fumător, rezultatele actuale suprapunându-se peste cele din 2015. Același rezultat a fost obținut de Karpathiou și colab., în 2016, nivelul limfocitelor CD8 necorelându-se cu parametri amintiți [30].

În studiul lui Ismail din 2019, PD-L1 a fost pozitiv în proporție de 92,5%, iar în timp ce în studiul actual procentul PD-L1 pozitiv a fost de numai 39,13%. În ambele studii de referință nivelul TIL (2015) și al TIL CD8+ (2019) s-au corelat cu expresia PD-L1, rezultat obținut și în studiul actual. De asemenea, studiul lui Vassilokopoulou a analizat și corelația dintre TIL și nivelul proteinei PD-L1, corelația fiind una pozitivă, pacienții cu niveluri TIL crescut, având nivel crescut al proteinei PD-L1 [40]. Corelații semnificativ statistice între expresia PD-L1 și statusul limfoganglionilor și comportamentul de fumător au fost obținute în studiul de referință, fără să se regăsească la cohorta actuală de pacienți.

În studiul din 2015, nivelul TIL și expresia PD-L1 au reprezentat factori predictivi independenți ai supraviețuirii generale și supraviețuirii fără evenimente la pacienții cu SCC laringian, nivelul TIL stromale fiind strâns asociat cu o supraviețuire mai bună. Curbele Kaplan-Meier au arătat un interval de supraviețuire superior la pacienții cu nivel ridicat la TIL. De asemenea, prognostic mai bun s-a observat la pacienții cu expresie crescută a PD-L, cu intervale favorabile fără apariția unui eveniment nou și risc semnificativ mai scăzut pentru recurență au fost evidențiate de curbele Kaplan-Meier și analiza univariată de tip cox-regression. În termeni de supraviețuire generală, studiul lui Ismail a arătat că supraviețuirea generală s-a corelat pozitiv cu nivelul crescut al CD8+ și cu nivelul scăzut al PD-L1 [42].

În 2019, o meta-analiză realizată de Jia și colab [43], a studiat ratele de supraviețuire, inclusiv supraviețuirea generală și fără semne de boală sau progresia tumorală fără evenimente în antecedente, dar și supraviețuirea fără metastaze la distanță ale pacienților cu niveluri diferite ale moleculelor de verificare imunologică. Studiul a fost realizat pe baza a 52 de lucrări prospective din literatura de specialitate și a inclus carcinoamele orale, de cap-gât și nazofaringiene (7127 de pacienți), toate articolele publicate între 2010 și 2018. Majoritatea studiilor au inclus și PD-L1, în carcinoamele laringiene expresia crescută a PD-L1 fiind asociată cu o supraviețuire fără semne de boală (DFS) mai bună.

Pentru analiza supraviețuirii fără semne de boală și a supraviețuirii generale au fost realizate curbele Kaplan-Meier și testul log-rank test. Nivelul limfocitelor CD8+ s-a corelat cu supraviețuirea fără semne de boală, fără a exista o asociere semnificativ statistică ($p=0,98 > 0,05$), ceea ce arată că distribuția supraviețuirii este aceeași în grupurile analizate.

Astfel, supraviețuirea medie fără semne de boală a fost de 9 luni la pacienții cu nivel CD8+ scăzut și de 16 luni la pacienții cu nivel CD8 ridicat, iar supraviețuirea maximă fără semne de boală a fost de 11, respectiv 21. Analiza supraviețuirii fără semne de boală corelată cu expresia PD-L1 a evidențiat un prognostic favorabil la pacienții cu nivel PD-L1 crescut (PD-L1>1 și PD-L1 >20), comparativ cu pacienții cu tumori PD-L1 negative. Valoarea $p=0,006 < 0,05$ arată o asociere semnificativ statistic între cei doi parametri, astfel că se poate concluziona că distribuția supraviețuirii este diferită în grupurile populaționale. Rezultatele se corelează cu cele obținute de Vassilakopoulou în 2015 în ceea ce privește expresia PD-L1 [40]. De asemenea rezultatele sunt contradictorii celor obținute pentru alte tipuri de tumori maligne (renale, colorectale, pulmonare) [44], acestea evidențiind faptul că o expresie PD-L1 crescută se asociază cu un prognostic nefavorabil. Există și studii la care s-a utilizat clona 5H1 pentru examenul imunohistochimic PD-L1, în melanomae maligne metastatice, cancere pulmonare non-small, carcinoame cu cellule Merkel, iar acestea au arătat o asociere pozitivă între expresia înaltă a PD-L1, nivelul crescut al TIL și prognosticul pacienților [45,46].

De asemenea, am constatat o asociere pozitivă între expresia PD-L1 și nivelul limfocitelor CD8+. Până în prezent, mecanismul biologic al asocierii dintre expresia PD-L1, nivelul TIL și prognosticul favorabil nu a fost pe deplin înțeles. De exemplu, în melanoamele în care infiltratul inflamator stromal este dominat de cellule T CD8+, s-a constatat o asociere cu un nivel înalt al celulelor Treg, proteinei PD-L1 și ARNm. Mai mult, inducerea căilor inhibitorii immune în microclimatul tumoral a fost dependentă de prezența limfocitelor T CD8+ și IFN [47]. Astfel, este posibil care mai degrabă decât o indicație de sustragere imună totală, expresia PD-L1 a celulelor tumorale să reflecte prezența unei presiuni immune antitumorale antigen-indusă mediate de limfocitele TIL. Deși numai parțial eficient, recrutarea TIL din microclimatul tumoral în răspunsul tumoral, pentru a prezerva semnalele chemotactice ar putea induce un efect parțial antitumoral și ar putea explica îmbunătățirea ratelor de supraviețuire [48]. Astfel, nivelurile limfocitelor TIL/CD8+ și ale expresiei PD-L1 pot constitui criterii de selecție pentru tratamentul pacienților cu anticorpi monoclonali anti-PD-L1 [40].

Multe dintre studiile predictive corelative efectuate pe trialuri multiinstituționale s-au focusat pe expresia PD-L1, cunoscut fiind că aceasta se asociază cu TIL, dar și cu compoziția infiltratului stromal, rezultat obținut și de Kluger în 2015 [49], în melanomul malign, ceea ce sugerează că TIL poate reprezenta un biomarker predictiv în studiile ce includ pacienții tratați cu inhibitori anti-PD-L1. Acesta a evaluat și valoarea prognostică a subseturilor de celule T în melanomul malign, demonstrând că procentul de celule T CD8+ reprezintă un factor independent pentru o supraviețuire mai bună. În studiul lui Taube din 2014, expresia PD-L1 a

reprezentat cel mai puternic factor de predicție pentru răspunsul pacienților la tratamentul cu nivolumab, dar acesta a arătat la momentul studiului că un model combinat (expresia PD-L1 și TIL) ar putea fi cel mai bun model pentru predicția răspunsului la tratament [50]. În studiul actual, corelația pozitivă, statistic semnificativă între expresia PD-L1 și nivelul limfocitelor CD8+ se încadrează în acest model de predicție.

Balermas și colab. au studiat microclimatul imun în cancerele de cap și gât și au arătat că tumorile cu infiltrat inflamator stromal bogat în limfocite citotoxice CD3 și CD8 sunt asociate cu un prognostic mai bun după tratamentul chimioradioterapic [51], iar importanța prognostică a infiltrării tumorale cu limfocite T CD3 și CD8 a fost evidențiată de asemenea, și în cancerele mamare, esofagiene, pulmonare, ovariene, colonice și anale [52]. Nu numai componența microclimatului tumoral are importanță prognostică, ci și localizarea celulelor inflamatorii în cadrul tumorii (în proximitatea insulelor tumorale, în stroma sau periferie), aspect ce poate constitui obiect de studiu viitor pe tumorile laringiene [51].

Clasificarea TIME (Tumor Immunity in the MicroEnvironment) a tumorilor laringiene. Corelații între clasele TIME și principalii factori clinico-morfopatologici

Pornind de la studiile lui Taube [48] și Zhang [53], am realizat clasificarea carcinoamelor laringiene în funcție de nivelul PD-L1 și TIL CD8+ (TIME), astfel: clasa TIME I PD-L1 negativ/nivel CD8+ scăzut (clasa toleranței imunologice); clasa TIME II PD-L1 pozitiv/nivel CD8+ nivel crescut (clasa rezistenței adaptative); clasa TIME III PD-L1 negativ/nivel CD8+ crescut (clasa toleranței imunologice); clasa TIME IV PD-L1 pozitiv/ nivel CD8+ scăzut (clasa inducției intrinseci) [12]. S-a remarcat o frecvență crescută a cazurilor din clasa TIME IV (39%), dintre acestea ponderea cazurilor de sex feminin a fost foarte redusă (1 caz), încadrată în clasa TIME IV, restul cazurilor de sex masculin, cele mai multe fiind clasa TIME IV.

În funcție de vârstă, la pacienții sub 60 de ani cele mai frecvente au fost carcinoamele din clasa TIME IV (5 cazuri, 21,73%), iar la pacienții peste 60 de ani au predominat carcinoamele din clasa TIME II (6 cazuri, 26,08%). Gradul de diferențiere tumoral s-a asociat semnificativ statistic cu încadrarea în clasa TIME, așa cum a arătat corelația de tip crosstabulation, valoarea testului chi-pătrat fiind de $\chi^2 = 0,019 < p=0,05$, între cele 2 variabile existând un nivel scăzut de corelație și negativ, (Spearman $r = - 0,053$). Cele mai frecvente carcinoame G1-G2 au aparținut clasei TIME IV (8 cazuri, 34,78%), iar cele slab diferențiate G3 au avut același număr în clasele II și III (3 cazuri, 13,04%). De asemenea, încadrarea în

clasa TIME s-a asociat semnificativ statistic cu stadiul tumoral pT , valoarea testului $\chi^2 = 0,029$ $< p=0,05$, între cele două variabile existând un nivel scăzut, negativ de corelație evidențiat de valoarea indicelui Spearman $r = - 0,314$. Cele mai multe carcinoame în stadii incipiente T1-T2 au aparținut clasei IV (8 cazuri, 34,78%), iar cele mai multe în stadii avansate T3-T4 s-au încadrat în clasa II (5 cazuri, 21,73%).

Tabel nr. 34. Corelația claselor TIME cu caracteristicile clinico-patologice

	TIME I	TIME II	TIME III	TIME IV	Valoarea p (test Chi- pătrat)
Vârsta					0,320
≤ 60	2	2	0	5	
>60	1	6	3	4	
Grad de diferențiere					0,019
G1-G2	3	5	0	8	
G3	0	3	3	1	
pT					0,029
T1-T2	2	3	0	8	
T3-T4	1	5	3	1	
pN					0,149
N0	2	7	2	3	
N1-N3	1	1	1	6	
IPN					0,269
IPN0	0	3	2	6	
IPN1	1	5	1	3	
ILV					0,708
ILV0	1	2	0	3	
ILV1	2	6	3	6	
Localizare					0,287
Supraglottic	1	1	0	0	
Glottic	1	5	1	7	
Infraglottic	1	1	0	1	

Transglotic	0	1	2	1	
--------------------	---	---	---	---	--

Invazia perineurală nu s-a asociat semnificativ statistic cu clasa TIME, cele mai multe carcinoame cu invazie perineurală aparținând clasei a II-a (5 cazuri, 21,73%), iar cele mai multe fără invazie perineurală (6 cazuri, 26,08%) s-au încadrat în clasa TIME IV. Invazia vasculară a fost frecventă (15 cazuri ILV1, 65,21%), din care cele mai multe au aparținut claselor II și IV (câte 6 cazuri, 26,08%). Cele mai multe cazuri care nu au asociat invazie perineurală au aparținut clasei a IV-a (3 cazuri, 13,04%). Localizarea glotică preferată a carcinoamelor laringiene a fost împărțită între carcinoamele de clasa a II-a și a IV-a, cu câte 7 cazuri (30,43%). Celelalte localizări au înregistrat între 0 și 2 cazuri (maxim 8,69%).

Pentru analiza supraviețuirii generale pe termen scurt corelate cu clasele TIME au fost analizate toate cele 23 de cazuri luate în studiu, diagnosticate cu SCC și urmărite pe o perioadă 24 de luni. În cadrul acestui grup, 30,43% dintre pacienți au decedat din cauza SCC, distribuția pe clase TIME fiind: clasa I – 33,33%, clasa a II-a – 33,33%, Clasa a III-a – 66,66%, clasa a IV-a – 55,55%. Curbele Kaplan-Meier și testul log-rank test au fost realizate pentru supraviețuirea generală. Clasele imunologice TIME s-au corelat semnificativ statistic cu supraviețuirea generală ($p=0,05$), ceea ce arată că distribuția supraviețuirii generale este diferită în grupuri populaționale diferite. Analizând curba supraviețuirii generale se observă că tumorile încadrate în clasa a IIa (PD-L1 pozitiv, nivel CD8+ crescut) au avut cea mai bună supraviețuire maximă (18 de luni), iar cele din clasa I (PD-L1 negativ, CD8+ scăzut) cea mai mică perioadă de supraviețuire (8 luni). Rata supraviețuirii generale pe lotul de pacienți a fost de 56,52%, iar încadrarea pe clasele TIME a fost următoarea: clasa I – 14,28%, clasa a II-a 42,85%, clasa a III-a 14,28% și clasa a IV-a 28,57%. Astfel, clasa TIME II a avut cea mai bună rata de supraviețuire, iar cea mai mică rată de supraviețuire au avut-o SCC din clasele I și III, aceste diferențe fiind semnificative statistic (testul Log Rank, $p = 0,011$).

Rezultatele studiului nostru sunt în concordanță cu cele publicate de Vassilokopoulou și colab. [40], care subliniază că în carcinoamele laringiene nivelul crescut al TIL și expresia crescută a PD-L1 se corelează cu un prognostic mai bun.

Pe lângă acest aspect, a existat și o corelație pozitivă între nivelul TIL CD8+ și expresia PD-L1 [42], rezultate obținute și în studiul actual.

În ultimii 2 ani, începând din 2018 până în prezent au fost realizate mai multe studii care au analizat expresia PD-L1 corelată cu TIL, modul în care aceste variabile influențează supraviețuirea și posibilitatea de a fi folosite ca biomarkeri în vederea stratificării pacienților cu SCC laringiene, carcinoame de cap-gât dar și carcinoame nazo-faringiene, pentru tratament

imunoterapic unic sau combinat cu chimioradioterapie. Astfel, Ma și colab au raportat că o expresie a PD-L1 de 1% pe celulele tumorale și limfocitele stromale nu influențează supraviețuirea generală sau pe cea fără semne de boală, iar procentele de pozitivitate pentru PD-L1 au fost cuprinse între 20 și 40% [54-56]. Alte studii retrospective au raportat o pozitivitate de 34-46% a PD-L1, cu nivel crescut al expresiei în 70-100% din cazurile pozitive [57]. În 2019, studiul lui Minichsdorfer și colab, pe carcinoame nazofaringiene a evidențiat o rată a pozitivității de 83% , dar și faptul că expresia PD-L1 se corelează în populația caucaziană cu supraviețuirea generală și fără semne de boală [58], iar o metaanaliză a semnificației prognostice a PD-1/PD-L1 la pacienții asiatici nu a evidențiat nicio corelație între expresia PD-L1 și prognostic [59]. În studiul meta-analitic realizat de Jia și colab în 2019, concluzia generală în ceea ce privește carcinoamele de cap-gât și carcinoamele laringiene, că expresia crescută a PD-L1 se corelează pozitiv cu un prognostic mai bun [43].

Chiar la începutul anului 2020, Hu și colab au publicat rezultatele asupra carcinoamelor de hipofaringe și corelația dintre expresia PD-L1 și nivelul limfocitelor TIL, fără a le introduce în clase imunologice. Acesta a arătat că PD-L1 nu s-a asociat cu prognosticul, iar pozitivitatea PD-L1 în combinație cu nivelul TIL CD8+ poate avea potențial predictiv [60].

Deși numărul de cazuri analizate în studiul actual nu este unul ridicat, am realizat un model predictiv pe baza variabilelor care au permis corelațiile de acest tip (Anexa 1 și 2), prin analiza statistică de tip logistic binary regression. Predicibilitatea modelului per ansamblu este de 60,9%, ceea ce reprezintă un bun procent de predicție – în aproximativ 60% din cazuri, pe baza valorilor CD8+ și a expresiei PD-L1, deci a claselor TIME, se va putea face o predicție a supraviețuirii pe termen scurt a pacienților .

CONCLUZII

Studiul actual clinico-statistic s-a realizat pe un lot de 404 pacienți diagnosticați la examenul histopatologic în colorație uzuală hematoxin-eozină cu carcinoame scuamoase invazive ale laringelui în perioada 2011-2019. În urma studiului am desprins următoarele concluzii:

1. Distribuția cazurilor în perioada 2011-2019 a înregistrat o maximă a numărului de cazuri diagnosticate în anul 2013 (66 de cazuri; 16,33%). Din totalul de 346 de cazuri de carcinoamele laringiene, la sexul masculin au fost diagnosticate 317 cazuri (86,37%), la femei numărul fiind mult mai mic (30 cazuri, 81,08% dintre leziunile diagnosticate la femei și numai 8,67% dintre carcinoame). Deși se remarcă o scădere

a numărului de leziuni invazive la sexul feminin în prima parte a perioadei, de la 6 cazuri în anul 2011 la 1 caz în anul 2015, apare apoi o fluctuație a numărului de cazuri, pentru ca în anul 2019 numărul să fie din nou crescut – 8 cazuri, cel mai mare număr înregistrat la femei în decursul unui an).

2. Analiza histopatologică a evidențiat preponderența cazurilor de carcinoame scuamoase convenționale (328 din 346 de cazuri, 94,79 %). Au predominat carcinoamele moderat diferențiate G2 (153 de cazuri, 46,64%), urmate de carcinoamele G3 (128 de cazuri, 39,02%). Cele mai puțin frecvente au fost carcinoamele bine diferențiate G1, (48 de cazuri, 14,63%).
3. Variantele de carcinom au fost mult mai puțin frecvente, în ordinea descrescătoare SCC bazaloid 7 cazuri, SCC cu celule fusiforme 3 cazuri, SCC papilar 3 cazuri, SCC verucos 2 cazuri și SCC adenoscuamos 1 caz.
4. Cele mai multe tumori au fost incluse în stadii tumorale T1-T2 (13 cazuri, 56,52%) și numai 10 cazuri (43,47%) în stadiile tumorale avansate T3-T4.
5. Componente ale microclimatului imun, limfocitele CD3 au prezentat un nivel crescut în 22,36% din cazuri, nivel scăzut în 77,6% din cazuri. Nivelul limfocitelor CD3+ s-a corelat cu gradul de diferențiere tumoral fără a exista o asocieri semnificativ statistică. Astfel, dintre cazurile cu nivel crescut al CD3, cele mai multe au fost carcinoame slab diferențiate G3, iar dintre cele cu nivel scăzut cele mai frecvente au fost cele bine și moderat diferențiate. Analiza statistică a evidențiat o asocieri semnificativ statistică între nivelul limfocitelor CD3 și sexul pacientului testul $\chi^2(df2) = 0,047$, între cei 2 parametri existând o corelație negativă (corelația Spearman $R_s = -0,227$, $p < 0,05$). Cel mai frecvent la bărbați, nivelul limfocitelor CD3 a fost scăzut (55 de cazuri), comparativ cu numai 13 cazuri cu nivel CD3 crescut. a femei numărul celor cu nivel scăzut și crescut al CD3 a fost același (4 cazuri).
6. Nivelul limfocitelor CD4+, altă componentă a microclimatului imun a fost scăzută în 75% din cazurile studiate și crescută în 25%, acesta asociindu-se semnificativ statistic cu gradul de diferențiere tumorală, între cele două variabile existând o corelație pozitivă - valoarea testului $\chi^2(df2) = 6,350$; $p = 0,012$), iar valoarea indicelui Spearman R_s având valoarea 0,288. Cele mai frecvente cazuri cu nivel CD4+ au aparținut decadelor de vârstă peste 60 de ani (63,15%), în decada sub 60 de ani numai 35, 85% dintre cazuri fiind CD4+ crescut. Pentru ceilalți factori clinici, nu s-au înregistrat asocieri semnificativ statistice cu nivelul limfocitelor CD4+.

7. Limfocitele CD8+ au prezentat nivel crescut în 59% din cazuri și au predominat la categoria de vârstă peste 60 de ani (71,11%) și la tumorile cu localizare glotică (88,23%), la pacienții care consumă cantități moderate de alcool (91,83%) și la pacienții fumători (88,63%). Nivel scăzut în 41%. Nivel crescut CD8+ au prezentat tumorile în stadii avansate T3-T4 (68,57%) și cele fără metastaze ganglionare sau cu metastaze ganglionare stadiul N1 (72,22%).
8. Expresia proteinei p16 a fost scăzută în majoritatea cazurilor (77,63%) și pozitiv în numai 22,37%, pozitivitatea fiind mai mare la pacienții sub 60 de ani (70,58%), la pacienții peste 60 de ani pozitivitatea scăzând la 29,42% dintre cazuri. Localizarea preferată a carcinoamelor p16 pozitive a fost cea glotică (81,25%). Analiza statistică a arătat o asociere semnificativ statistică între expresia p16 și gradul de diferențiere a tumorilor, testul $\chi^2(df2) = 5,89$, $p=0,015 < 0,05$, între cei 2 parametri existând o corelație negativă, indicele Spearman $R_s = - 278$. Au predominat tumorile slab diferențiate G3 (58,8%), cu un procent ușor mai ridicat comparative cu cel bime și moderat diferențiate G1-G2 (41,17%). Factorii de risc (alcool, fumat) nu s-au asociat semnificativ statistic cu expresia proteinei p16, fiind ănsă de remarcat pozitivitatea într-un procent mai mare a tumorilor la pacienții fumători (81,25%) și la pacienți cu neconsumatori de alcool sau cu consum moderat de alcool (88,23%).
9. La lotul de pacienți pentru care am analizat corelația nivelului limfocitelor CD8+ cu expresia PD-L1, nivelul CD8+ crescut a predominat la pacienții peste 60 de ani (65,21%), în carcinoamele scuamoase bine și moderat diferențiate G1-G2 (47,82%), în stadiul T1-T2 (34,78%) și în tumorile neasociate cu metastaze ganglionare (39,13%).
10. Expresia PD-L1 a fost negativă în 60,86% din cazuri și pozitivă în 39,13% din cazuri, între acestea din urmă 21,73% având valoare mai mică de 20 și 17,39% peste 20. În funcție de gradul de diferențiere, rezultatele nu arătat diferențe semnificativ statistice, astfel că și în cazul tumorilor bime și moderat diferențiate și în cazul celor slab diferențiate, PD-L1 a fost predominant negativ cu 39,13% și, respectiv 21,73% din cazuri. Cele mai multe tumori PD-L1 pozitive au fost diagnosticate în stadiul T1-T2 (26,08%). Cele mai multe cazuri PD-L1 pozitive au fost cele cu statusul ganglionar N0-N1 (26,08%), comparativ cu numai 3 cazuri (13,04%) pozitive pentru statusul ganglionar N2a-N2b și 0 cazuri pentru N2c-N3. Numărul de cazuri PD-L1 negative IPN0 și IPN1 sunt egale (30,43%), iar majoritatea cazurilor PD-L1 pozitive nu au asociat invazie perineural (30,42%), comparativ cu cazurile PD-L1 pozitive,

cu invazie perineurală asociată, cu număr redus (8,69%). De asemenea, cele mai multe cazuri care au asociat invazie angiolimfatică, au fost PD-L1 negative (39,13%) și 8 pozitive (34,78%) (4 cazuri PD-L1 1-19, 4 cazuri PD-L1 >20).

11. Analiza statistică dintre nivelul CD8+ și expresia PD-L1 a demonstrat o asociere semnificativ statistic (testul chi pătrat; χ^2 (df2) = 2; p = 0,019), între cei doi parametri evidențiindu-se o corelație pozitivă (corelația Spearman r_s = 0,516).

12. Elementul de originalitate al tezei îl constituie clasificarea carcinoamelor scuamoase laringiene în funcție de clasa TIME (nivelul CD8+ și expresia PD-L1), care a evidențiat următoarele: cele mai frecvente au fost carcinoamele din clasa TIME IV (clasa inducției intrinseci) (39%), urmate de cele din clasa a II-a (clasa rezistenței adaptative) (35%) și de clasele I (clasa toleranței imunologice) și clasa aIII-a (clasa rezistenței adaptative) (13% fiecare). Analiza statistică a arătat o asociere semnificativ statistică între clasele TIME și gradul de diferențiere tumorală, valoarea testului chi-pătrat fiind de $\chi^2 = 0,019 < p=0,05$, între cele 2 variabile existând un nivel scăzut de corelație negativ, (Spearman $r = - 0,053$).

Cele mai frecvente carcinoame G1-G2 au aparținut clasei TIME IV 34,78%), iar cele slab diferențiate G3 au avut același număr în clasele II și III (13,04%). De asemenea, clasa TIME s-a asociat semnificativ statistic cu stadiul tumoral pT, valoarea testului $\chi^2 = 0,029 < p=0,05$, între cele două variabile existând un nivel scăzut, negativ de corelație evidențiat de valoarea indicelui Spearman $r = - 0,314$. Alți parametri histopatologici (pN, ILV, IPN) și localizarea tumorală sau vârsta pacienților nu au prezentat asocieri semnificativ statistice cu clasele TIME.

13. Analiza curelor de supraviețuire Kaplan Meier au evidențiat că nivelul limfocitelor CD8+ s-a corelat cu supraviețuirea fără semne de boală (aceasta fiind mai mare la pacienții cu nivel al limfocitelor CD8 crescut), fără a exista o asociere semnificativ statistică (p=0,98 >0,05), ceea ce arată că distribuția supraviețuirii este aceeași în grupurile analizate. Analiza supraviețuirii fără semne de boală corelată cu expresia PD-L1 a evidențiat un prognostic favorabil la pacienții cu nivel PD-L1 crescut (PD-L1 >1 și PD-L1 >20), comparativ cu pacienții cu tumori PD-L1 negative. Valoarea p=0,007 <0,05 arată o asociere semnificativ statistic între cei doi parametri, astfel că se poate concluziona că distribuția supraviețuirii este diferită în grupurile populaționale.

14. Analiza curbelor de supraviețuire Kaplan-Meier în funcție de clasele TIME au arătat că acestea s-au corelat semnificativ statistic cu supraviețuirea general (p = 0,05),

- clasa aIIa TIME având cea mai bună rată de supraviețuire, iar cea mai mica casele I și III, diferențele fiind semnificative statistic (testul Log Rank, $p = 0,011$).
15. Modelul predictiv realizat în funcție de parametri analizați are o predictibilitate per ansamblu de 60,9%, un bun procent de predicție, ceea ce arată că pe baza nivelului limfocitelor CD8 și expresiei PD-L1 corelate (pe baza clasificării TIME) se poate realiza o predicție a supraviețuirii pe termen scurt, deci clasa TIME poate deveni factor predictiv al prognosticului pacientului.
 16. Pentru setarea PD-L1 și/sau claselor TIME ca biomarkeri predictivi care să ajute la stratificarea pacienților în vederea tratamentului imunoterapeutic este nevoie de noi studii, realizate pe cohorte cât mai mari de pacienți care să ajute la uniformizarea rezultatelor, datele actuale din literatură fiind contradictorii, atât pe carcinoamele de cap-gât în ansamblu cât și pe cele ale laringelui.

Bibliografie selectivă

1. American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2019. Atlanta: American Cancer Society, 2019
<https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2019/cancer-facts-and-figures-2019.pdf>
2. Bray F., Ferlay J., Parkin D.M., Pisani P., International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2000 : *Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide*. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2001
3. Harrari PM., Connor NP., Grau C., Functional preservation and quality of life in head and neck radiotherapy, Medical radiology, Springer Science and Business Media, 2009
4. Nocini R, Molteni G, Mattiuzzi C, Lippi G. Updates on larynx cancer epidemiology. Chin J Cancer Res. 2020 Feb;32(1):18-25. doi: 10.21147/j.issn.1000-9604.2020.01.03. PMID: 32194301; PMCID: PMC7072014.
5. GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. Lancet. 2018;392:1789–858. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32279-7.

6. Ordinul nr. 1217/2010 privind aprobarea Ghidurilor de practică medicală pentru specialitatea anatomie patologică – Anexa 1 (<http://www.ms.ro/>)
7. Mogoantă L, Georgescu C, Popescu C, Bădulescu A, Hîncu M, Ghid de tehnici de histologie,, citologie și imunohistochimie, Ed. Medicală Universitară, Craiova, 2003
8. Bankhead, P. et al. (2017). QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. Scientific Reports. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5>
9. Ou D, Adam J, Garberis I, et al. Clinical relevance of tumor infiltrating lymphocytes, PD-L1 expression and correlation with HPV/p16 in head and neck cancer treated with bio- or chemo-radiotherapy. Oncoimmunology. 2017;6(9):e1341030. Published 2017 Jul 5. doi:10.1080/2162402X.2017.1341030
10. Lechner A, Schlößer H, Rothschild SI, et al. Characterization of tumor-associated T-lymphocyte subsets and immune checkpoint molecules in head and neck squamous cell carcinoma. Oncotarget. 2017;8(27):44418-44433. doi:10.18632/oncotarget.17901
11. Taube JM, Anders RA, Young GD, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. Sci Transl Med. 2012;4(127):127ra37. doi:10.1126/scitranslmed.3003689
12. Sznol M, Chen L. Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer. Clin Cancer Res. 2013;19(5):1021-1034. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2063
13. Sanmamed MF, Chen L. Inducible expression of B7-H1 (PD-L1) and its selective role in tumor site immune modulation. Cancer J. 2014; 20(4):256-261. doi:10.1097/PPO.0000000000000061
14. Hamada T, Soong TR, Masugi Y, et al. TIME (Tumor Immunity in the MicroEnvironment) classification based on tumor CD274 (PD-L1) expression status and tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal carcinomas. Oncoimmunology. 2018;7(7):e1442999. Published 2018 Mar 19. doi:10.1080/2162402X.2018.1442999
15. Vermorken JB, Psyrri A, Mesía R, et al. Impact of tumor HPV status on outcome in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck receiving chemotherapy with or without cetuximab: retrospective analysis of the phase III extreme trial. Ann Oncol 2014;25:801–7.

16. IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.
17. Anantharaman D, Marron M, Lagiou P, Samoli E, Ahrens W, Pohlabein H, Slamova A, Schejbalova M, Merletti F, Richiardi L, Kjaerheim K, Castellsague X, Agudo A, Talamini R, Barzan L, Macfarlane TV, Tickle M, Simonato L, Canova C, Conway DI, McKinney PA, Thomson P, Znaor A, Healy CM, McCartan BE, Hashibe M, Brennan P, Macfarlane GJ. Population attributable risk of tobacco and alcohol for upper aerodigestive tract cancer, *Oral Oncol*; 2011; 47(8):725-731.
18. Doros C, Balica N, Cîmpean AM, Dendritic cells: friends or foes of laryngeal cancer? *Rom J Morphol Embryol* 2013, 54(1):131–135
19. Koroulakis A, Agarwal M. Cancer, Laryngeal. [Updated 2019 Nov 23]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526076/>
20. Nocini R, Molteni G, Mattiuzzi C, Lippi G. Updates on larynx cancer epidemiology. *Chin J Cancer Res.* 2020;32(1):18-25. doi:10.21147/j.issn.1000-9604.2020.01.03
21. Wenig BM. Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: precursors and problematic variants. *Mod Pathol.* 2002;15(3):229-254. doi:10.1038/modpathol.3880520
22. Thompson L, Wenig BM, Heffner DK, Gnepp DR, Exophytic and papillary squamous cell carcinomas of the larynx: A clinicopathologic series of 104 cases, *Otolaryngology– Head and Neck Surgery* , 1999, 120(5):718-24
23. Ono T, Azuma K, Kawahara A, et al. Association between PD-L1 expression combined with tumor-infiltrating lymphocytes and the prognosis of patients with advanced hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2017;8(54):92699-92714. Published 2017 Oct 6. doi:10.18632/oncotarget.21564
24. Markou K, Christoforidou A, Karasmanis I, et al. Laryngeal cancer: epidemiological data from Northern Greece and review of the literature. *Hippokratia.* 2013;17(4):313-318.
25. Markou K, Goudakos J, Triaridis S, Konstantinidis J, Vital V, Nikolaou A. The role of tumor size and patient's age as prognostic factors in laryngeal cancer. *Hippokratia.* 2011;15(1):75-80.

26. Balermipas P, Michel Y, Wagenblast, J. et al. Tumour-infiltrating lymphocytes predict response to definitive chemoradiotherapy in head and neck cancer. *Br J Cancer* 110, 501–509 (2014). <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.640>
27. Yang CC, Su YC, Lin YW, Huang CI, Lee CC. Differential impact of age on survival in head and neck cancer according to classic Cox regression and decision tree analysis. *Clin Otolaryngol* 2019;44:244–253.
28. Marchi F, Missale F, Incandela F, et al. Prognostic Significance of Peripheral T-Cell Subsets in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Laryngoscope Investig Otolaryngol.* 2019;4(5):513-519. Published 2019 Aug 28. doi:10.1002/lio2.304
29. Sato F, Ono T, Kawahara A, et al. Prognostic impact of p16 and PD-L1 expression in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma receiving a definitive treatment. *J Clin Pathol.* 2019;72(8):542-549. doi:10.1136/jclinpath-2019-205818
30. Karpathiou G, Casteillo F, Giroult JB, et al. Prognostic impact of immune microenvironment in laryngeal and pharyngeal squamous cell carcinoma: Immune cell subtypes, immuno-suppressive pathways and clinicopathologic characteristics. *Oncotarget.* 2017;8(12):19310-19322. doi: 10.18632/oncotarget.14242
31. Nordfors C, Grün N, Tertipis N, Ährlund-Richter A, Haegglblom L, Sivars L, Du J, Nyberg T, Marklund L, Munck-Wikland E, Näsman A, Ramqvist T, Dalianis T. CD8+ and CD4+ tumour infiltrating lymphocytes in relation to human papillomavirus status and clinical outcome in tonsillar and base of tongue squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer.* 2013; 49: 2522–30. doi: 10.1016/j. ejca.2013.03.019.
32. Balermipas P, Rödel F, Rödel C, Krause M, Linge A, Lohaus F, Baumann M, Tinhofer I, Budach V, Gkika E, Stuschke M, Avlar M, Grosu A, et al. CD8+ tumour-infiltrating lymphocytes in relation to HPV status and clinical outcome in patients with head and neck cancer after postoperative chemoradiotherapy: A multicentre study of the German cancer consortium radiation oncology group (DKTK-ROG). *Int J Cancer.* 2016;
33. Zal T, Chodaczek G. Intravital imaging of anti-tumor immune response and the tumor microenvironment. *Seminars in Immunopathology.* 2010. p. 305–17. doi: 10.1007/s00281-010-0217-9.
34. McDonnell AM, Nowak AK, Lake RA. Contribution of the immune system to the chemotherapeutic response. *Seminars in Immunopathology.* 2011; 1–15. doi: 10.1007/ s00281-011-0246-z.

35. Jeske SS, Schuler PJ, Doescher J, et al. Age-related changes in T lymphocytes of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Immun Ageing*. 2020;17:3. Published 2020 Feb 12. doi:10.1186/s12979-020-0174-7
36. Affara NI, Ruffell B, Medler TR, Gunderson AJ, Johansson M, Bornstein S, Bergsland E, Steinhoff M, Li Y, Gong Q, Ma Y, Wiesen JF, Wong MH, et al. B cells regulate macrophage phenotype and response to chemotherapy in squamous carcinomas. *Cancer Cell*. 2014; 25: 809–21. doi: 10.1016/j.ccr.2014.04.026.
37. Dogantemur S, Ozdemir S, Uguz A, Surmelioglu O, Dagkiran M, Tarkan O, et al. Assessment of HPV 16, HPV 18, p16 expression in advanced stage laryngeal cancer patients and prognostic significance. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2020;86:351---7
38. Jeske SS, Schuler PJ, Doescher J, et al. Age-related changes in T lymphocytes of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Immun Ageing*. 2020;17:3. Published 2020 Feb 12. doi:10.1186/s12979-020-0174-7
39. Lechner A, Schlößer H, Rothschild SI, et al. Characterization of tumor-associated T-lymphocyte subsets and immune checkpoint molecules in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(27):44418-44433. doi:10.18632/oncotarget.17901
40. Vassilakopoulou M, Avgeris M, Velcheti V, et al. Evaluation of PD-L1 Expression and Associated Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2016;22(3):704-713. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-1543
41. Spranger S, Spaapen RM, Zha Y, Williams J, Meng Y, Ha TT, et al. Upregulation of PD-L1, IDO, and T(regs) in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8(t) T cells. *Sci Transl Med* 2013;5:200ra116.
42. Ismail M, El Wakiel H, El Ghany D Abd, Shakweer MM, Lotfy A, Gaballah AM, Correlation between tumour infiltration lymphocyte and PDL-1expression in laryngeal cancer and its prognostic significance: A prospective, non-interventional trial, *Annals of Oncology* (2019) 30 (suppl_11): xi48-xi57. 10.1093/annonc/mdz452
43. Jia YQ, Yang B, Wen LL, Mu WX, Wang Z, Cheng B. Prognostic value of immune checkpoint molecules in head and neck cancer: a meta-analysis. *Aging (Albany NY)*. 2019;11(2):501-522. doi:10.18632/aging.10175

44. Song M, Chen D, Lu B, Wang C, Zhang J, Huang L, et al. PTEN loss increases PD-L1 protein expression and affects the correlation between PD-L1 expression and clinical parameters in colorectal cancer. *PLoS ONE* 2013; 8:e65821.
45. Lipson EJ, Vincent JG, Loyo M, Kagohara LT, Lubner BS, Wang H, et al. PD-L1 expression in the Merkel cell carcinoma microenvironment: association with inflammation, Merkel cell polyomavirus and overall survival. *Cancer Immunol Res* 2013;1:54–63.
46. Droezer RA, Hirt C, Viehl CT, Frey DM, Nebiker C, Huber X, et al. Clinical impact of programmed cell death ligand 1 expression in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2013;49:2233–42.
47. Spranger S, Spaapen RM, Zha Y, Williams J, Meng Y, Ha TT, et al. Upregulation of PD-L1, IDO, and T(regs) in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8(t) T cells. *Sci Transl Med* 2013;5:200ra116.
48. Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med* 2012;4:127ra37.
49. Kluger HM, Zito CR, Barr ML, Baine MK, Chiang VL, Sznol M, et al. Characterization of PD-L1 Expression and Associated T-cell Infiltrates in Metastatic Melanoma Samples from Variable Anatomic Sites. *Clin Cancer Res* 2015;21:3052–60.
50. Taube JM, Klein A, Brahmer JR, Xu H, Pan X, Kim JH, et al. Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin Cancer Res* 2014;20: 5064–74
51. Balermipas P, Rodel F, Liberz R, Oppermann J, Wagenblast J, Ghanaati S, et al. Head and neck cancer relapse after chemoradiotherapy correlates with CD163⁺ macrophages in primary tumour and CD11b⁺ myeloid cells in recurrences. *Br J Cancer* 2014;111:1509–18.
52. Gooden MJ, de Bock GH, Leffers N, Daemen T, Nijman HW. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br J Cancer* 2011;105:93–103.
53. Zhang Y, Chen L. Classification of Advanced Human Cancers Based on Tumor Immunity in the MicroEnvironment (TIME) for Cancer Immunotherapy [published

- correction appears in JAMA Oncol. 2016 Nov 1;2(11):1511]. *JAMA Oncol.* 2016;2(11):1403-1404. doi:10.1001/jamaoncol.2016.2450
54. Ma BBY, Lim WT, Goh BC, Hui EP, Lo KW, Pettinger A, et al. Antitumor activity of nivolumab in recurrent and metastatic nasopharyngeal carcinoma: an international, multicenter study of the mayo clinic phase 2 consortium (NCI-9742). *J Clin Oncol.* (2018) 36:1412–8. doi: 10.1200/JCO.2017. 77.0388
 55. Lee VH, Lo AW, Leung CY, Shek WH, Kwong DL, Lam KO, et al. Correlation of PD-L1 expression of tumor cells with survival outcomes after radical intensity-modulated radiation therapy for nonmetastatic nasopharyngeal carcinoma. *PLoS ONE.* (2016) 11:e0157969. doi: 10.1371/journal.pone.0157969
 56. Qu Y, Wang D, Yang L, Liu HY, Cui W, Che YQ. Expression and clinical significance of programmed death ligand 1 in nasopharyngeal carcinoma. *Mol Clin Oncol.* (2018) 9:75–81. doi: 10.3892/mco.2018.1633
 57. Zhou Y, Shi D, Miao J, Wu H, Chen J, Zhou X, et al. PD-L1 predicts poor prognosis for nasopharyngeal carcinoma irrespective of PD-1 and EBV-DNA load. *Sci Rep.* (2017) 7:43627. doi: 10.1038/sr ep43627
 58. Minichsdorfer C, Oberndorfer F, Krall C, et al. PD-L1 Expression on Tumor Cells Is Associated With a Poor Outcome in a Cohort of Caucasian Nasopharyngeal Carcinoma Patients. *Front Oncol.* 2019;9:1334. Published 2019 Nov 29. doi:10.3389/fonc.2019.01334
 59. Huang ZL, Liu S, Wang GN, Zheng SH, Ding SR, Tao YL, et al. The prognostic significance of PD-L1 and PD-1 expression in patients with nasopharyngeal carcinoma: a systematic review and metaanalysis. *Cancer Cell Int.* (2019) 19:141. doi: 10.1186/s12935-019-
 60. Hu C, Tian S, Lin L, Zhang J, Ding H. Prognostic and clinicopathological significance of PD-L1 and tumor infiltrating lymphocytes in hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncology.* 2020 Mar;102:104560. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2019.104560.

ANEXE

ICONOGRAFIE. Lucrarea cuprinde 121 de imagini macro- și microscopice originale, aparținând cazurilor studiate, 38 de tabele și 136 de figuri.