

La localización subcelular de YAP1 y su relación con la sobrevida en cáncer escamoso de cabeza y cuello

The subcellular localization of YAP1 and its relationship with survival in squamous cell cancer of the head and neck

Matías Álvarez B.^{1,4}, Antonieta Solar G.², Patricio Le-Cerf S.³, Cesar Imarai B.¹, Pablo Cabello E.^{1,5}

¹Departamento de Otorrinolaringología, Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.
²Departamento de Anatomía Patológica, Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.
³Servicio de Anatomía Patológica, Complejo Asistencial Dr. Sótero del Río. Santiago, Chile.
⁴Servicio de Otorrinolaringología, Hospital La Florida. Santiago, Chile.
⁵Servicio de Otorrinolaringología, Complejo Asistencial Dr. Sótero del Río. Santiago, Chile.

Correspondencia:

Pablo Cabello E.
 Diagonal Paraguay 362,
 Otorrinolaringología,
 Santiago, Chile.
 E-mail: pacabell@uc.cl

Financiamiento: Premio del Concurso Anual de Investigación de la Sociedad Chilena de Otorrinolaringología, Medicina y Cirugía de Cabeza y Cuello, 2017.

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Recibido el 16 de julio de 2023. Aceptado el 12 de febrero de 2024.

Resumen

Introducción: La vía de señalización Hippo y su proteína YAP1 participan en la progresión de múltiples tipos de cáncer, incluido el cáncer escamoso de cabeza y cuello (CECC), con mayor evidencia para cavidad oral, por lo que es necesario comprender si su efecto es dependiente o independiente de la localización del tumor primario. **Objetivo:** Evaluar el rol de la vía Hippo en la sobrevida de pacientes con CECC a través de la proteína YAP1 y compararlo con ALDH1 como marcador de células troncales tumorales. **Material y método:** Estudio retrospectivo de registros clínicos y biopsias de pacientes con CECC. Las muestras de tumores primarios fueron marcadas mediante inmunohistoquímica con anticuerpos anti-YAP1 y anti-ALDH1A1 y evaluadas en forma ciega por un anatomopatólogo. La sobrevida global, de acuerdo con la localización y etapa, fue analizada con la prueba de Log-rank, mientras que la correlación entre marcadores fue analizada con las pruebas de Phi y V de Cramer. **Resultados:** En una cohorte de 57 pacientes, la localización nuclear de YAP1 se asoció con una disminución significativa de la sobrevida en tumores de fosa nasal/cavidades paranasales y cavidad oral, mientras que los niveles de ALDH1A1 se correlacionaron con una disminución de la sobrevida sólo en cavidad oral. No hubo correlación entre la localización nuclear de YAP1 y la expresión de ALDH1A1. **Conclusión:** La localización nuclear de YAP1 se asocia a una disminución de la sobrevida en CECC de cavidad oral y fosa nasal/cavidades paranasales, sin correlación con la expresión de ALDH1A1.

Palabras clave: cáncer, cabeza y cuello, carcinoma escamoso, Hippo, sobrevida.

Abstract

Introduction: The Hippo signaling pathway and its protein YAP participate in the progression of multiple types of cancer, including head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), with greater evidence for oral cavity involvement. Therefore, it is necessary to understand whether their effect is dependent or independent of the primary tumor's location. **Objective:** To evaluate the role of the Hippo pathway in the survival of patients with HNSCC through the protein YAP1 and compare it with ALDH1 as a marker of tumor stem cells. **Material and Method:** Retrospective study of clinical records and biopsies from patients with HNSCC. Samples of primary tumors were immunohistochemically stained with anti-YAP1 and anti-ALDH1A1 antibodies and blindly evaluated by a pathologist. Overall survival according to location and stage was analyzed using the Log-rank test, while the correlation between markers was analyzed using the Phi and Cramer's V tests. **Results:** In a cohort of 57 patients, nuclear localization of YAP1 was associated with a significant decrease in survival in nasal cavity/paranasal sinus tumors and oral cavity tumors, while ALDH1A1 levels correlated with decreased survival only in the oral cavity. There was no correlation between the nuclear localization of YAP1 and the expression of ALDH1A1. **Conclusion:** Nuclear localization of YAP1 is associated with decreased survival in HNSCC of the oral cavity and nasal cavity/paranasal sinuses, without correlation with the expression of ALDH1A1.

Keywords: Cancer, head and neck, squamous cell carcinoma, Hippo signaling, survival.

Introducción

Los carcinomas escamosos de cabeza y cuello (CECC) son los tumores más importantes que comprometen la cabeza y el cuello. Aproximadamente 650.000 nuevos casos por año son diagnosticados a nivel mundial, con una mayor incidencia en hombres y una sobrevida global de aproximadamente 50% a 5 años¹. En los últimos años, la sobrevida de esta enfermedad ha aumentado globalmente debido a la mayor incidencia de tumores asociados con el virus papiloma humano. Sin embargo, la mayoría de los tumores son diagnosticados en etapas avanzadas, donde el control de la enfermedad es más complejo y requiere terapias multimodales que incluyen cirugía y quimio-radioterapia, las cuales tienen una importante morbilidad y toxicidad².

Uno de los problemas más importantes en el manejo del CECC es la recidiva tumoral. Ésta ha sido relacionada al concepto de “cancerización de campo”, la cual es producida por alteraciones genéticas que ocurren en distintos niveles de la vía aero-digestiva, debido a la exposición a carcinógenos como el tabaco³. Este fenómeno podría ser explicado por la presencia de células genéticamente alteradas, localizadas en el estrato basal del epitelio, las cuales presentan una tasa de sobrevida elevada y que tienden a estar en balance con las células normales hasta el desarrollo del tumor⁴. Interesantemente, esta teoría es compatible con el modelo de células troncales tumorales, las cuales poseen una capacidad ilimitada de auto-renovación y son capaces de generar todas las subpoblaciones tumorales. Estas células son altamente quimio y radio-resistentes, debido a características como resistencia al daño al ADN y una alta capacidad de eliminar drogas quimioterapéuticas, entre otros mecanismos de sobrevida⁵; los cuales podrían explicar las recidivas tardías luego de tratamientos iniciales exitosos.

Varios marcadores de células troncales tumorales han sido descritos en el CECC y se piensa que esta subpoblación podría promover la resistencia a quimio-radioterapia⁶. Específicamente, una alta expresión de CD44, baja actividad del proteasoma 26S y una alta expresión de ALDH1A1, son marcadores de células troncales tumorales que se relacionan

a un aumento de recurrencias loco-regionales y resistencia a quimio-radioterapia⁷⁻⁹. Estos hallazgos muestran la necesidad de lograr un mejor entendimiento de la biología de las células troncales tumorales en CECC, con el fin de progresar hacia terapias dirigidas a esta subpoblación celular.

Existen múltiples vías de señalización celular relacionadas a la regulación del desarrollo que también están involucradas en diferentes tipos de cáncer. Una de estas es la vía Hippo, la cual participa en la regulación del tamaño de los órganos durante el desarrollo, y que en cáncer se relaciona al control de la proliferación, sobrevida y la promoción de un fenotipo de célula troncal tumoral¹⁰. La proteína central de esta vía es YAP1, la cual es un cofactor transcripcional que junto a la proteína TAZ se une a factores de transcripción de la familia TEAD, promoviendo así la transcripción de genes blanco. La actividad de YAP/TAZ es regulada a través de fosforilación por el complejo LATS1/2-MOB1, el cual es el miembro final de una cascada de kinasas, promoviendo la traslocación de YAP/TAZ desde el núcleo al citoplasma y/o su degradación por el proteasoma¹⁰ (Figura 1).

La participación de la vía Hippo en CECC ha sido recientemente descrita. Un aumento de la expresión de YAP1 ha sido demostrada en tumores de carcinoma escamoso de cavidad oral comparado con tejidos normales, lo que

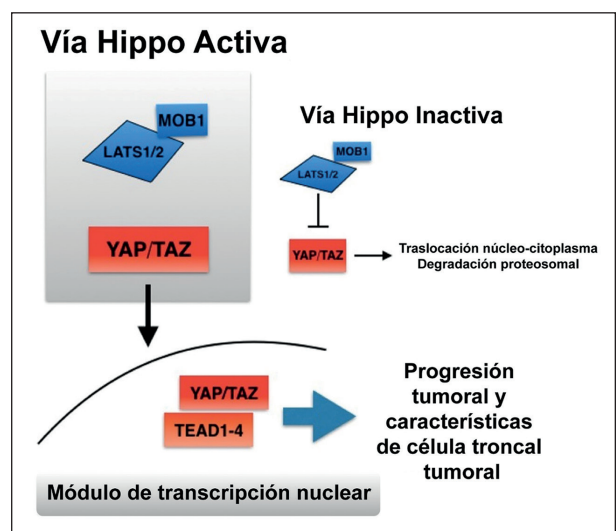


Figura 1. Diagrama de la vía Hippo activa.

a su vez se asocia a la presencia de metástasis y una disminución de la sobrevida global y libre de enfermedad^{11,12}. Además, la localización nuclear de YAP1 podría estar asociada con el desarrollo de un fenotipo más agresivo de CECC^{13,14}. Es importante enfatizar que la mayoría de la evidencia de la participación de la vía Hippo ha sido descrita en carcinoma escamoso de cavidad oral, pero hay una falta de estudios que evalúen otras localizaciones de CECC, haciendo necesario entender si el posible rol de esta vía en la promoción tumoral es dependiente o independiente de la localización del primario.

Objetivo

El objetivo de este estudio es evaluar el rol de la vía Hippo a través de su proteína YAP1 en la sobrevida en CECC de diferentes localizaciones en una población chilena, y compararlo con la expresión de ALDH1A1 usado como un marcador conocido de célula troncal tumoral en CECC.

Material y Método

Población del estudio

Se realizó una revisión retrospectiva de registros clínicos de pacientes diagnosticados con CECC de fosa nasal/cavidades paranasales, cavidad oral, nasofaringe, orofaringe, hipofaringe y laringe en el Complejo Asistencial Dr. Sótero del Río entre 2010 y 2017. Los criterios de inclusión fueron pacientes de cualquier sexo, mayores de 18 años con el diagnóstico de CECC y con especímenes de biopsia disponibles en nuestro hospital. Pacientes con tumores no escamosos fueron excluidos. Datos demográficos, etapificación y registros anatomopatológicos fueron revisados y analizados. La data de muerte fue obtenida de certificados de defunción en los casos correspondientes.

Este estudio fue aprobado por el Comité Ético Científico del Servicio de Salud Metropolitano Sur-oriente de Santiago, Chile (ID02102017).

Muestras de tejidos e inmunohistoquímica

Muestras incluidas en parafina de tumores primarios obtenidos de cirugías o biopsias

incisionales fueron recolectados y analizados con tinción de hematoxilina-eosina. Áreas representativas del tumor fueron seleccionadas para construir un microarreglo de tejidos (TMA) como está descrito previamente¹⁵. Para la inmunohistoquímica (IHQ) se utilizaron anticuerpos monoclonal de conejo anti-YAP (D8H1X) XP® (Cell Signaling Technology, MA, USA) (dilución 1:100) y monoclonal de conejo anti-ALDH1A1 (EP1933Y) C-terminal (Abcam, UK) (dilución 1:150). La desparafinización, rehidratación y recuperación antigénica fue realizada usando el kit Dako PT Link System (Agilent, CA, USA) según el protocolo del fabricante. Las muestras fueron incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente con anticuerpos primarios. El kit ImmPRESS® HRP Anti-Rabbit IgG (Peroxidase) Polymer Detection Kit (Vector Laboratories, CA, USA) fue usado, según el protocolo del fabricante, para la marcación con anticuerpo secundario y detección con diaminobenzidina como cromógeno.

Evaluación de la expresión de YAP1 y ALDH1A1

Las muestras fueron analizadas en forma ciega a la información clínicamente relevante por una anatomopatóloga (AS). Para la expresión de YAP1, la distribución nuclear y citoplasmática dentro de las células tumorales fue evaluada y cuantificada como el porcentaje de células con la distribución indicada en relación al total de células tumorales (**Figura 2A**). Luego, se calculó el índice núcleo/citoplasma (índice N/C) como la proporción de células con núcleos positivos en relación a las células con distribución citoplasmática. El índice N/C fue creado para diferenciar células con YAP1 “transcripcionalmente activo” de aquellos con su localización basal citoplasmática. Una alta localización de YAP fue considerada con un índice N/C >0,5. Para ALDH1A1, las células positivas fueron cuantificadas como porcentaje del total de células de la muestra y clasificadas como ALDH^{high} cuando la expresión estaba en ≥ 50% de las células y ALDH^{low} cuando la expresión se identificó en <50% de las células (**Figuras 2B-C**).

Análisis estadístico

Se construyeron curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global y se calculó la dife-

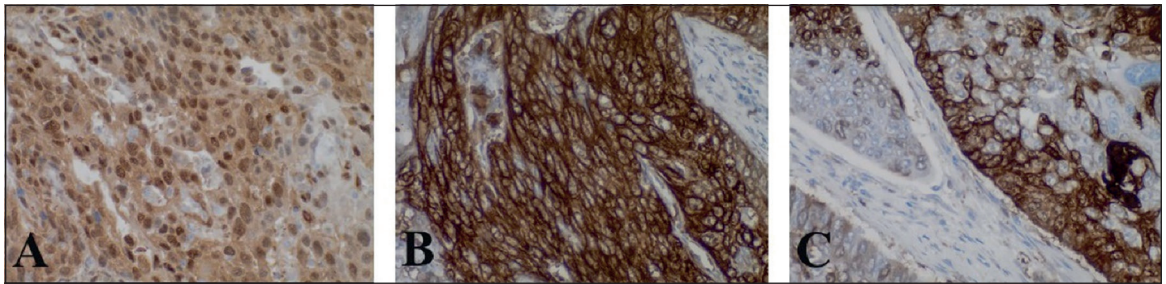


Figura 2. A: Inmunohistoquímica con anti-YAP; dilución 1:100; contratinción DAB (café) - hematoxilina (azul). Se observa una tinción nuclear fuerte y citoplasmática moderada, con un índice N/C >0,5. Magnificación 400x. **B:** Inmunohistoquímica con anti-ALDH1A1, 1:150; contratinción DAB (café) - hematoxilina (azul). Se observa expresión en $\geq 50\%$ de las células. Magnificación 400x. **C:** Inmunohistoquímica con anti-ALDH1A1, 1:150; contratinción DAB (café) - hematoxilina (azul). Se observa expresión en $< 50\%$ de las células. Magnificación 400x.

rencia estadística usando el test Log-rank (Mantel-Cox) usando el programa Prism 8 (GraphPad Software, CA). La correlación entre el índice N/C de YAP1 y la expresión de ALDH1A1 fue medida usando el test V de Cramer usando el programa JASP (Países Bajos). Diferencias estadísticamente significativas fueron consideradas con un valor $p \leq 0,05$.

Resultados

Un total de 171 casos fueron identificados originalmente. Después de eliminar casos con datos incompletos o con muestras de biopsia no disponibles, se incluyeron 57 pacientes, con una edad media de 62,5 ($\pm 12,7$) años, con una proporción hombre:mujer de 2.5:1 (71,9% y 28,1%, respectivamente). Entre los factores predisponentes, un 70,6% eran usuarios de tabaco y un 54,5% consumieron alcohol.

Las localizaciones primarias del tumor fueron laringe (46%), cavidad oral (23%), orofaringe (18%), fosa nasal/cavidades paranasales (11%), hipofaringe (2%) y nasofaringe (2%). Con respecto a la etapificación, el 87,5% correspondió a etapas III y IV, mientras que el resto a etapas I y II (Tabla 1).

Análisis de sobrevida

Todas las localizaciones

La sobrevida global para todas las etapas en los diferentes sitios, se muestra en la Figura 3. Basado en la prueba de Log-rank (Mantel-Cox), no se observaron diferencias significativas en la sobrevida global en todas

las etapas de acuerdo al índice N/C de YAP ($p = 0,3835$). Tampoco se encontraron diferencias significativas en la sobrevida global según la expresión de ALDH1 ($p = 0,6765$). Los valores del índice N/C y la expresión de ALDH1 para las distintas localizaciones son mostrados en la Tabla 2.

Tabla 1. Datos demográficos de la cohorte (n = 57)

Variable	n (%)
Sexo	
Hombre	41 (72%)
Mujer	16 (18%)
Consumo de alcohol	
Sí	24 (55%)
No	20 (45%)
Tabaquismo	
Sí	36 (71%)
No	15 (29%)
Etapas	
I	3 (5%)
II	7 (12%)
III	13 (23%)
IV	34 (60%)
Localización	
Cavidad oral	13 (23%)
Fosa nasal/Cavidades paranasales	6 (11%)
Laringe	26 (45%)
Orofaringe	10 (17%)
Nasofaringe	1 (2%)
Hipofaringe	1 (2%)

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

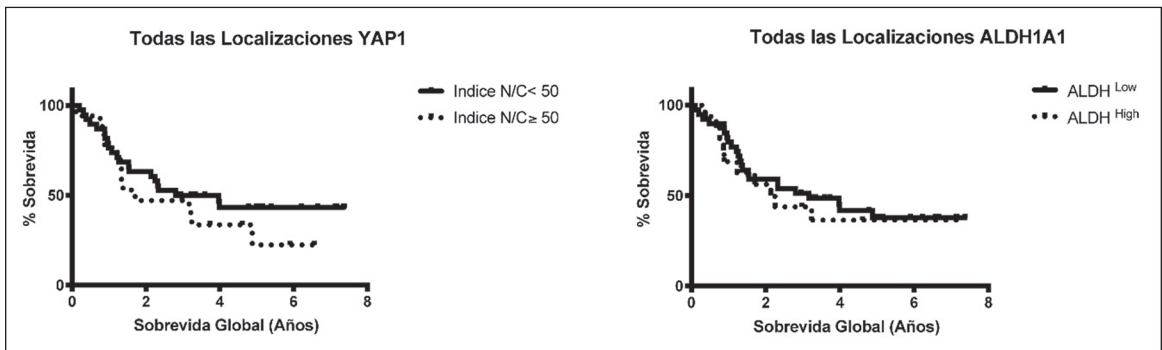


Figura 3. Curva de Kaplan-Meier para sobrevida global en CECC para todas las localizaciones. No se observa diferencia significativa en la sobrevida en pacientes con índice N/C \geq 0,5 y ALDH1^{high}, respectivamente.

Tabla 2. Localización de YAP1 y expresión de ALDH1A1 según localización de tumor primario

Localización	YAP1		ALDH1	
	Índice N/C	n (%)	Nivel de expresión	n (%)
Cavidad oral	N/C < 0,5	10 (77%)	Low	12 (92%)
	N/C \geq 0,5	3 (23%)	High	1 (8%)
	Total	13	Total	13
Fosa nasal/Cavidades paranasales	N/C < 0,5	5 (83%)	Low	5 (83%)
	N/C \geq 0,5	1 (17%)	High	1 (17%)
	Total	6	Total	6
Laringe	N/C < 0,5	17 (65%)	Low	18 (69%)
	N/C \geq 0,5	9 (35%)	High	8 (31%)
	Total	26	Total	26
Orofaringe	N/C < 0,5	6 (60%)	Low	4 (40%)
	N/C \geq 0,5	4 (40%)	High	6 (60%)
	Total	10	Total	10

Cavidad oral

El análisis de sobrevida global en CECC de cavidad oral para todas las etapas se muestra en la **Figura 4**. Basado en la prueba de Log-rank (Mantel-Cox), se observó una diferencia significativa según el índice N/C de YAP1 en la sobrevida global para todas las etapas ($p < 0,0001$). También se observó una diferencia significativa de la sobrevida global de acuerdo a la expresión de ALDH1A1 para todas las etapas ($p = 0,0005$). El análisis de acuerdo a estadios precoces (etapa I y II) y avanzados (etapa III y IV) no se realizó debido a la sub-representación de etapas precoces en la muestra.

Fosa nasal/Cavidades paranasales

El análisis de la sobrevida global en estadios avanzados de CECC de fosa nasal/cavidades paranasales se muestra en la **Figura 5**. No se encontraron etapas precoces en la muestra analizada. Basado en la prueba de Log-rank (Mantel-Cox), se observó una diferencia significativa en la sobrevida global en etapas avanzadas según el índice N/C de YAP1 ($p = 0,0253$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas según la expresión de ALDH1A1 ($p = 0,6458$).

Laringe y orofaringe

El análisis de la sobrevida global para

CECC de laringe y orofaringe en todas las etapas se muestra en la **Figura 6**. Basado en la prueba de Log-rank (Mantel-Cox), no se observaron diferencias significativas según el índice N/C de YAP1 en la sobrevida global en laringe ($p = 0,6135$) ni en orofaringe ($p = 0,3501$). Tampoco se observaron diferencias en la sobrevida global según la

expresión de ALDH1A1 ($p > 0,05$ para laringe y orofaringe).

Análisis de correlación

En nuestra muestra no se observó correlación entre el índice N/C de YAP1 y los niveles de expresión de ALDH1A1 (Test V de Cramer = 0,275).

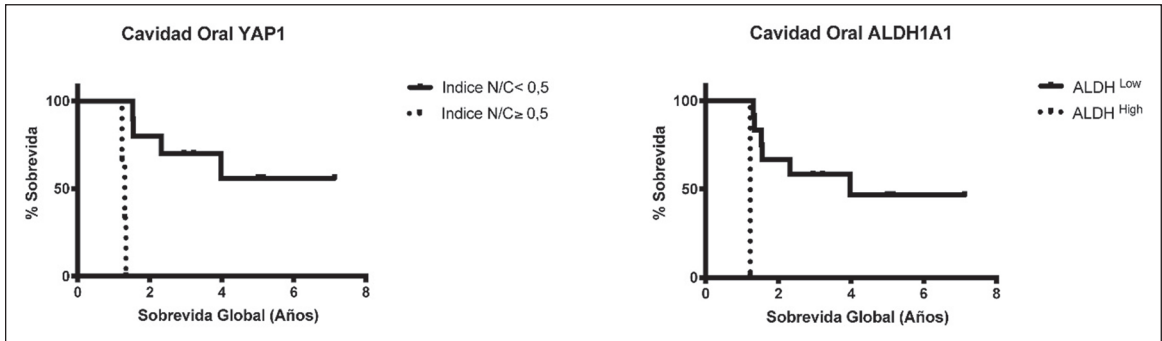


Figura 4. Curva de Kaplan-Meier para sobrevida global en CECC de cavidad oral. Se observa una diferencia significativa entre pacientes con índice N/C $\geq 0,5$ y ALDH1^{high}, respectivamente.

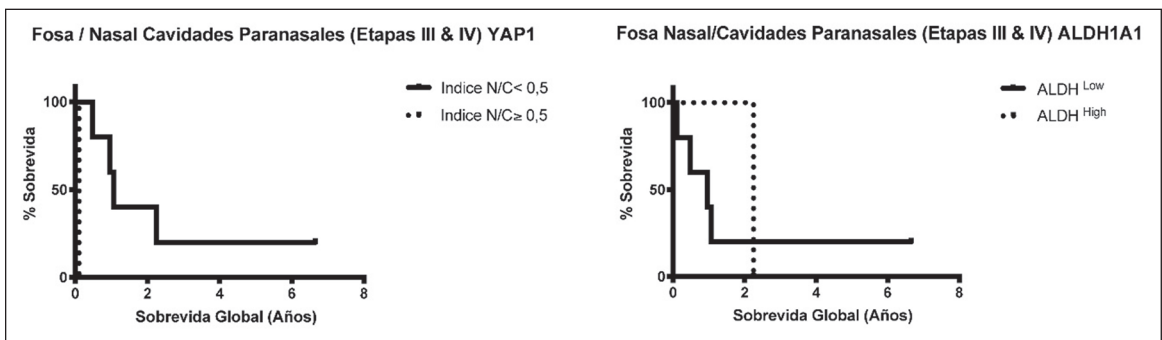


Figura 5. Curva de Kaplan-Meier para sobrevida global en CECC avanzado de fosa nasal/Cavidades paranasales. Se observa una diferencia significativa entre pacientes con índice N/C $\geq 0,5$ y ALDH1^{high}, respectivamente.

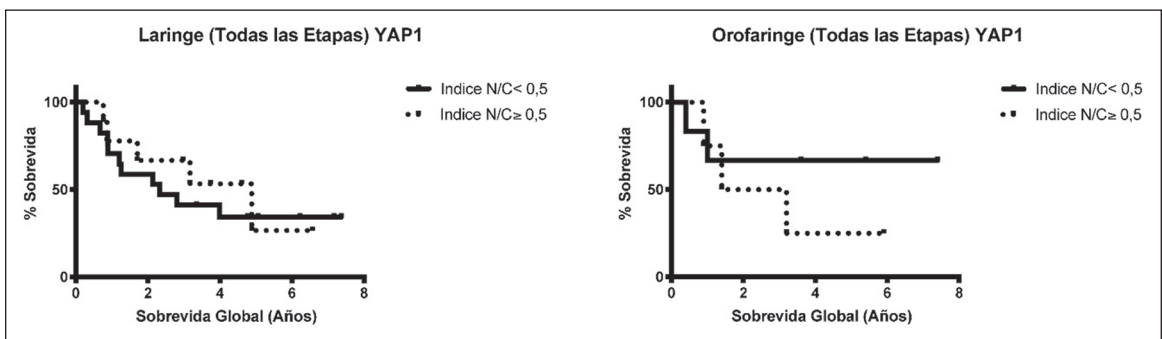


Figura 6. Curva de Kaplan-Meier para sobrevida global en CECC de laringe y orofaringe. No se observa diferencia significativa en la sobrevida en pacientes con índice N/C $\geq 0,5$.

Discusión

Se ha evidenciado actividad de la vía de señalización Hippo en diferentes tumores, incluyendo CECC¹⁶. Estudios *in vitro* en CECC de cavidad oral han sugerido que la actividad de YAP1 puede gatillar la transición epitelio-mesenquimal y sustentar la auto-renovación entre otras características de las células troncales tumorales, y por lo tanto, contribuir al inicio de este cáncer^{13,17}. Por otro lado, también en cavidad oral, la sobre expresión de TAZ se asocia significativamente con el tamaño tumoral, estadio clínico, sobrevida global y libre de enfermedad¹⁸. Con respecto a otras localizaciones, en CECC de laringe, la expresión de YAP1 se correlaciona con el grado de diferenciación en tumores primarios y con la presencia de metástasis linfáticas¹⁹. En CECC de nasofaringe, el aumento de expresión de YAP1 se correlaciona con un peor pronóstico, probablemente por su relación con infección por hepatitis B²⁰. Significativamente, también se ha descrito la participación de YAP1 en procesos de resistencia a cisplatino, cetuximab y gefitinib *in vitro*^{11,21,22}. Otros componentes de la vía Hippo, además de YAP1, también han sido asociados a la promoción y progresión tumoral y la adquisición de un fenotipo de célula troncal tumoral^{17,18,23-27}.

En este trabajo, nosotros analizamos primariamente la localización subcelular de YAP1 usando IHQ a través de un índice de localización núcleo/citoplasma, dado que YAP1 ejercería su función de promotor tumoral en el núcleo, a través del control de la expresión de genes relacionados al cáncer¹⁰. En nuestra cohorte, la localización nuclear de YAP1 en los tumores primarios, reflejada como un índice N/C $\geq 0,5$, se correlacionó con una disminución de la sobrevida global en cáncer avanzado de fosa nasal/cavidades paranasales ($p = 0,0253$) y en cavidad oral ($p < 0,0001$), mientras la expresión de ALDH1A1 se correlacionó con disminución de sobrevida global sólo en cavidad oral ($p = 0,0005$). Al intentar obtener un cociente de riesgo en las localizaciones con diferencias significativas, no se logró obtener un intervalo de confianza significativo, a pesar de los resultados significativos encontrados en la prueba de Log-rank. Esta discordancia se debe probablemente al

pequeño tamaño muestral, el cual sobreestima la influencia de valores extremos. Como resultado de esta observación, calculamos el tamaño muestral necesario para obtener resultados significativos usando los cocientes de riesgo obtenidos para la estimación del tamaño del efecto²⁸. Para cada cociente de riesgo se estimó un tamaño muestral de 1.073 y 2.200 casos para cavidad oral y fosa nasal/cavidades paranasales, respectivamente, por lo que estudios multicéntricos con mayores tamaños muestrales son necesarios, con el fin de mejorar la significancia estadística y permitir ajustar por otras variables como sexo, edad, tabaquismo, infección por virus papiloma humano, entre otros. Esto podría dar luz sobre un rol potencial de YAP1 como un marcador predictor de pronóstico en estas localizaciones.

Se ha demostrado que en cáncer hay otros mecanismos de regulación de la vía Hippo, además del canónico mediado por la fosforilación de YAP1 por LATS, y que se relacionan con mecano-transducción, inhibición de contacto, señales inflamatorias y oncoproteínas virales¹⁰. Además, en cáncer cervicouterino, la proteína E6 del VIRUS PAPILOMA HUMANO induce la estabilización de YAP y promueve la proliferación celular²⁹. También, la vía Hippo interacciona con otras vías de señalización oncogénicas como Wnt/ β -catenina y TGF- β , las cuales están involucradas en la progresión tumoral de múltiples tipos de cáncer, incluyendo CECC³⁰⁻³². En nuestro estudio no analizamos la expresión de p16 debido a la falta de evidencia previa de regulación de YAP por el VIRUS PAPILOMA HUMANO en CECC, sin embargo, sería interesante explorar esta hipótesis inicialmente a nivel celular, con el fin de extender su estudio a nivel poblacional.

Se ha propuesto que el efecto pro-tumoral de Hippo a través de la actividad de YAP1 en CECC y otros tipos de cáncer podría aparecer cuando se excede un "umbral oncogénico", por lo que la actividad de YAP podría llevar inicialmente a la formación de lesiones premalignas, como la displasia epitelial y a medida que la actividad de YAP aumenta, las lesiones progresarían a un fenotipo maligno³³. Además de la interacción con otras vías oncogénicas, la vía Hippo podría ser regulada por interacción con micro-ARN, tal como se observó en un

análisis *in silico* en muestras de CECC de *The Cancer Genome Atlas*³⁴.

ALDH1 es un marcador conocido de células troncales tumorales en CECC. Estudios previos han mostrado que la sobreexpresión de ALDH1 se asocia con la presencia de metástasis regionales y peores resultados del paciente, por lo que se ha propuesto como un posible blanco terapéutico^{35,36}. Debido al rol establecido de ALDH1 como un marcador de células troncales tumorales y la promoción de este fenotipo por la vía Hippo, se buscó la existencia de una correlación entre ambos marcadores. En nuestro estudio, se buscó la existencia de una correlación entre YAP1 y ALDH1A1 en cavidad oral, dado las diferencias significativas de SG para ambos marcadores, sin embargo, no se encontró una correlación entre el índice N/C de YAP1 y los niveles de expresión de ALDH1A1. Estos hallazgos podrían sugerir que la localización nuclear de YAP1 podría ser un marcador de célula troncal tumoral independiente, sin embargo, se requieren más estudios para confirmar estos hallazgos.

Entre las limitaciones de este estudio se encuentra que el estudio fue realizado en un único centro terciario, lo que podría generar un sesgo de selección hacia la predominancia de estadios avanzados del CECC, debido a las características demográficas y socioeconómicas de nuestra población. La sub-representación de estadios precoces nos impidió evaluar la contribución de la vía Hippo en dichas etapas y por lo tanto, subestimar su importancia en las localizaciones sin resultados significativos. Además, contamos con una muestra pequeña dado la naturaleza piloto del estudio, lo que disminuye el poder para detectar diferencias significativas.

Conclusiones

La localización nuclear de YAP1 se asocia significativamente con la disminución de la sobrevida global en CECC de cavidad oral y en etapas avanzadas de fosa nasal/cavidades paranasales. No se observó asociación entre la localización nuclear de YAP1 y la expresión de ALDH1A1 en cavidad oral, orofaringe ni laringe. Estos resultados apoyan los hallazgos previos con respecto al rol de la vía Hippo en

CECC de cavidad oral, por lo que proponemos el uso del índice N/C de YAP1 como una forma de evaluar la participación de la vía Hippo en biopsias de pacientes con CECC.

Bibliografía

1. Cardemil M F. Epidemiología Del Carcinoma Escamoso De Cabeza Y Cuello. *Rev Chil Cirugía*. 2014;66(6):614-620. doi: 10.4067/S0718-40262014000600017
2. Lo Nigro C, Denaro N, Merlotti A, Merlano M. Head and neck cancer: improving outcomes with a multidisciplinary approach. *Cancer Manag Res*. 2017;9:363-371. doi: 10.2147/CMAR.S115761
3. Rettig EM, D'Souza G. Epidemiology of head and neck cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2015;24(3):379-396. doi: 10.1016/j.soc.2015.03.001
4. Jou A, Hess J. Epidemiology and Molecular Biology of Head and Neck Cancer. *Oncol Res Treat*. 2017;40(6):328-332. doi: 10.1159/000477127
5. Méry B, Guy J-B, Espenel S, et al. Targeting head and neck tumoral stem cells: From biological aspects to therapeutic perspectives. *World J Stem Cells*. 2016;8(1):13-21. doi: 10.4252/wjsc.v8.i1.13
6. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(3):973-978. doi: 10.1073/pnas.0610117104
7. Krause M, Dubrovská A, Linge A, Baumann M. Cancer stem cells: Radioresistance, prediction of radiotherapy outcome and specific targets for combined treatments. *Adv Drug Deliv Rev*. 2017;109:63-73. doi: 10.1016/j.addr.2016.02.002
8. Krishnamurthy S, Nör JE. Orosphere assay: a method for propagation of head and neck cancer stem cells. *Head Neck*. 2013;35(7):1015-1021. doi: 10.1002/hed.23076
9. Zhang Z, Filho MS, Nör JE. The biology of head and neck cancer stem cells. *Oral Oncol*. 2012;48(1):1-9. doi: 10.1016/j.oraloncology.2011.10.004
10. Zanconato F, Cordenonsi M, Piccolo S. YAP/TAZ at the Roots of Cancer. *Cancer Cell*. 2016;29(6):783-803. doi: 10.1016/j.ccell.2016.05.005
11. Chia S, Low J, Zhang X, et al. Phenotype-driven precision oncology as a guide for clinical decisions one patient at a time. *Nat Commun*. 2017;8(1):435. doi: 10.1038/s41467-017-00451-5
12. Ge L, Smail M, Meng W, et al. Yes-associated protein expression in head and neck squamous cell carcinoma nodal metastasis. *PLoS One*. 2011;6(11). doi: 10.1371/journal.pone.0027529
13. Hiemer SE, Zhang L, Kartha VK, et al. A YAP/TAZ-Regulated Molecular Signature Is Associated with

- Oral Squamous Cell Carcinoma. *Mol Cancer Res*. 2015;13(6):957-968. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0580
14. Wang Y, Gersten A, Moleirinho S, Gunn-Moore FJ, Reynolds PA, Prystowsky MB. Fibroblasts in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Associated With Perineural Invasion Have High-Level Nuclear Yes-Associated Protein (YAP) Expression. *Acad Pathol*. 2015;2(4):2374289515616972. doi: 10.1177/2374289515616972
 15. Koo M, Squires JM, Ying D, Huang J. Making a Tissue Microarray. *Methods Mol Biol*. 2019;1897:313-323. doi: 10.1007/978-1-4939-8935-5_27
 16. Santos-de-Frutos K, Segrelles C, Lorz C. Hippo Pathway and YAP Signaling Alterations in Squamous Cancer of the Head and Neck. *J Clin Med*. 2019;8(12):2131. doi: 10.3390/jcm8122131
 17. Li Z, Wang Y, Zhu Y, et al. The Hippo transducer TAZ promotes epithelial to mesenchymal transition and cancer stem cell maintenance in oral cancer. *Mol Oncol*. 2015;9(6):1091-1105. doi: 10.1016/j.molonc.2015.01.007
 18. Wei Z, Wang Y, Li Z, et al. Overexpression of Hippo pathway effector TAZ in tongue squamous cell carcinoma: Correlation with clinicopathological features and patients' prognosis. *J Oral Pathol Med*. 2013;42(10):747-754. doi: 10.1111/jop.12062
 19. Qiu S, Xia Z, Li Q, Ye D, Huang Q, Shen Z. Expression and clinical significance of YAP in laryngeal squamous cell carcinoma patients. *Oncol Lett*. 2017;13(3):1311-1314. doi: 10.3892/ol.2016.5541
 20. Huang Z, Su B, Liu F, et al. YAP1 Promotes Tumor Invasion and Metastasis in Nasopharyngeal Carcinoma with Hepatitis B Virus Infection. *Oncotargets Ther*. 2020;13:5629-5642. doi: 10.2147/OTT.S247699
 21. Jerhammar F, Johansson AC, Ceder R, et al. YAP1 is a potential biomarker for cetuximab resistance in head and neck cancer. *Oral Oncol*. 2014;50(9):832-839. doi: 10.1016/j.oraloncology.2014.06.003
 22. Yoshikawa K, Noguchi K, Nakano Y, et al. The Hippo pathway transcriptional co-activator, YAP, confers resistance to cisplatin in human oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2015;46(6):2364-2370. doi: 10.3892/ijo.2015.2948
 23. Akervall J, Nandalur S, Zhang J, et al. A novel panel of biomarkers predicts radioresistance in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur J Cancer*. 2014;50(3):570-581. doi: 10.1016/j.ejca.2013.11.007
 24. Reddy VR, Annamalai T, Narayanan V, Ramanathan A. Hypermethylation of promoter region of LATS1--a CDK interacting protein in oral squamous cell carcinomas--a pilot study in India. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(4):1599-1603. doi: 10.7314/APJCP.2015.16.4.1599
 25. Dong C, Wei KJ, Zhang W Bin, Sun H, Pan HY, Zhang L. LATS2 induced by TNF-alpha and inhibited cell proliferation and invasion by phosphorylating YAP in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2015;44(6):475-481. doi: 10.1111/jop.12317
 26. Takeuchi S, Kasamatsu A, Yamatoji M, et al. TEAD4-YAP interaction regulates tumoral growth by controlling cell-cycle arrest at the G1 phase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;486(2):385-390. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.03.050
 27. Ladiz MAR, Najafi M, Kordi-Tamandani DM. Contribution of LATS1 and LATS2 promoter methylation in OSCC development. *J Cell Commun Signal*. 2017;11(1):49-55. doi: 10.1007/s12079-016-0356-4
 28. G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods*. 2007;39(2):175-191. doi: 10.3758/BF03193146
 29. He C, Mao D, Hua G, et al. The Hippo/YAP pathway interacts with EGFR signaling and HPV oncoproteins to regulate cervical cancer progression. *EMBO Mol Med*. 2015;7(11):1426-1449. doi: 10.15252/emmm.201404976
 30. Pang X, Tang YL, Liang XH. Transforming growth factor- signaling in head and neck squamous cell carcinoma: Insights into cellular responses. *Oncol Lett*. 2018. doi: 10.3892/ol.2018.9319
 31. Katoh M, Katoh M. Molecular genetics and targeted therapy of WNT-related human diseases (Review). *Int J Mol Med*. 2017;40(3):587-606. doi: 10.3892/ijmm.2017.3071
 32. Saito A, Nagase T. Hippo and TGF- interplay in the lung field. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2015;ajplung.00238.2015. doi: 10.1152/ajplung.00238.2015
 33. Maehama T, Nishio M, Otani J, Mak TW, Suzuki A. The role of Hippo-YAP signaling in squamous cell carcinomas. *Cancer Sci*. 2021;112(1):51-60. doi: 10.1111/cas.14725
 34. Chamorro Petronacci C, García García A, Padín Iruegas E, Rivas Mundiña B, Lorenzo Pouso A, Pérez Sayáns M. Identification of Prognosis Associated microRNAs in HNSCC Subtypes Based on TCGA Dataset. *Medicina (B Aires)*. 2020;56(10):535. doi: 10.3390/medicina56100535
 35. Vieira V, Campos L-H, Jesus L-H, et al. Overexpression of ALDH1 and EMT marker profile are linked with unfavorable outcome in head and neck cancer. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2020;25(6):e752-e761. doi: 10.4317/medoral.23777
 36. Szafarowski T, Sierdzi ski J, Ludwig N, Gluszeko A, Filipowska A, Szczepa ski MJ. Assessment of cancer stem cell marker expression in primary head and neck squamous cell carcinoma shows prognostic value for aldehyde dehydrogenase (ALDH1A1). *Eur J Pharmacol*. 2020;867:172837. doi: 10.1016/j.ejphar.2019.172837.