

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
MESTRADO EM PATOLOGIA BUCAL

ANA CLÁUDIA PEREIRA COSTA FLORES

AVALIAÇÃO DAS CINASES DE ADESÃO FOCAL (FAKS) EM DIFERENTES  
ZONAS NO CARCINOMA ESPINOCELULAR DE CABEÇA E PESCOÇO E SUA  
RELAÇÃO COM TNM, GRADUAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E EVOLUÇÃO

Linha de Pesquisa: Câncer Bucal

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito à obtenção do título de mestre em Odontologia.

*Área de Concentração: Patologia Bucal*

Orientador: Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho

PORTO ALEGRE

2015

#### CIP - Catalogação na Publicação

Flores, Anacláudia

Avaliação das cinases de adesão focal (FAKs) em diferentes zonas no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço e sua relação com TNM, graduação histopatológica e evolução / Anacláudia Flores. -- 2015.

43 f.

Orientador: Manoel Sant'Ana Filho.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Migração Celular. 2. Metástase. 3. Adesão Celular. 4. Proteínas de Adesão. 5. FAK. I. Sant'Ana Filho, Manoel, orient. II. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelo dom da vida e por ter me dado a fé.

A meus pais Umbelina e Gláucio, por terem sido meus guias em todas as etapas de minha formação e vida.

Aos meus filhos Mateus e Felipe, por serem sempre a minha inspiração em tudo nessa vida e por me ajudarem a descobrir o meu real lugar no mundo.

Ao meu marido André, pelo companheirismo, amor, apoio, ajuda, parceria, cumplicidade.

Ao meu irmão, que é para mim exemplo de pessoa e de militar.

Aos meus sogros e cunhados que sempre torcem por mim.

À Cristina e à Tadiane, minhas fiéis escudeiras, pela ajuda e amizade de todas as horas.

Ao meu orientador, prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho, por todos os ensinamentos teóricos e de vida.

Ao Diretor da PMPA, Cel Cordeiro, e ao Chefe da Odontoclínica da PMPA, Maj Dilli, pelo apoio e compreensão em todos os momentos.

Aos meus colegas da PMPA, e em especial meu chefe direto, Cap Wagner, pela confiança, incentivo e amizade sempre.

À Luciana, à Belkiss, à Fernanda e à Mirela, pela amizade, carinho e apoio em todos os momentos e, em especial, os difíceis.

À todos os colegas/amigos, funcionários e professores da Patologia Bucal da FO/UFRGS, pela amizade, ajuda técnica e teórica e pelo incentivo na elaboração deste trabalho e em todas as atividades na faculdade.

À minha amiga Kelly, que foi o melhor presente que o mestrado poderia ter me dado. Um encontro para a vida.

Aos meus compadres e amigos da vida Alessandra, Mário, Giovana, Diego, Vanessa e Beto. Obrigada por serem meus amigos desde a adolescência.

Aos pacientes que são o motivo deste Mestrado.

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e à CAPES que tornaram possível a realização desse curso de pós-graduação.

“Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas.”

Antoine de Saint-Exupéry

## RESUMO

FLORES, Anacláudia. **Avaliação das cinases de adesão focal (FAKs) em diferentes zonas no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço e sua relação com TNM, graduação histopatológica e evolução.** 2015. 43 f. Dissertação (Mestrado) –Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

O carcinoma espinocelular (CEC) de cabeça e pescoço é uma neoplasia maligna que implica em baixas taxas de sobrevida e prognóstico desfavorável. A perda de adesão do epitélio e a migração celular são processos biológicos envolvidos na carcinogênese. O objetivo desse estudo foi descrever o padrão de expressão da molécula cinase de adesão focal (FAK) e suas formas fosforiladas, FAK-Tyr576 e FAK-Tyr925, em amostras de CEC no centro do tumor (CT) e zona de invasão (ZI) e no tecido epitelial não neoplásico adjacente a estes tumores (EA). De acordo com a graduação histopatológica, 48,1% do total das amostras de CEC são de grau moderado. Segundo o sistema pTNM, 62,9% eram T1 e T2, 64,8% não apresentaram metástase regional e não houve metástase à distância. O tempo máximo de acompanhamento foi de 5,9 anos e obteve-se a preservação final de 46 dos 54 pacientes, onde foi observado que 58,1% apresentaram boa evolução e 41,9% exibiram evolução ruim. A média em anos para que os pacientes obtivessem o *status* de evolução ruim foi de 5,01. Quanto ao estadiamento clínico, houve maior imunomarcagem no estágio IVa quando comparado ao estágio II no EA da FAK Tyr-576 e ocorreu maior expressão no estágio IVb quando comparado ao estágio I no CT da FAK Tyr-576. Os pacientes que apresentaram evolução ruim após o período máximo de acompanhamento tiveram alta expressão no EA e na ZI da FAK Tyr-576 e no CT da FAK Tyr-925. Na ZI, o aumento de expressão da FAK está associado ao aumento da expressão da FAK Tyr-576. À medida que há aumento da expressão no EA há aumento da expressão na ZI na FAK Tyr-576. E quando há aumento de expressão no EA há aumento da marcação na ZI na FAK Tyr-925. Apesar do papel de todas as FAKs fosforiladas não estar claro, mas sabendo-se que são essas FAKs que estão ativas no câncer, a partir dos dados do presente trabalho pode-se sugerir que a avaliação da marcação FAK Tyr -576 no EA, no CT e na ZI venha a fazer parte da rotina no diagnóstico histopatológico e das margens da peça operatória, como norteadores da conduta terapêutica e do protocolo de acompanhamento.

Palavras-chave: Migração Celular. Metástase. Adesão Celular. Proteínas de Adesão. FAK.

## ABSTRACT

FLORES, Anacláudia. **Evaluation of focal adhesion kinase (FAKs) in different areas in oral squamous cell carcinoma of the head and neck and its relationship with TNM, histopathological grading and evolution.** 2015. 43 f. Dissertation (Master's Degree) – Dental School, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

Squamous cell carcinoma (SCC) of the head and neck is a malignant neoplasm that implies low rates of survival and poor prognosis. The loss of adhesion and cell migration are biological processes involved in carcinogenesis. The aim of this study was to describe the pattern of expression of focal adhesion kinase molecule (FAK) and its phosphorylated forms, FAK-Tyr576, FAK-Tyr925, in SCC samples in the center of the tumor (CT) and invasion zone (ZI) and non-neoplastic epithelial tissue adjacent to these tumors (EA). According to histopathological grading, 48,1% of SCC samples are moderate. According to the system pTNM, 62,9% were T1 and T2, 64.8%, had no regional metastasis and no distant metastasis. The maximum time of follow up was 5,9 years and was obtained as the final preservation 46 of 54 patients, where it was observed that 58,1% of patients had good prognosis and 41,9% of patients had poor prognosis. The average years for patients to obtain the poor prognosis of status was 5.01. As for clinical staging, there was greater immunostaining in the stadium IVa compared to stage II in EA Tyr-576. And FAK expression was higher in stage IVb when compared to CT in stage I of FAK Tyr-576. Patients with poor prognosis after the maximum follow-up period had high expression in EA and ZI of FAK Tyr-576 and CT of FAK Tyr-925. In ZI, increased expression of FAK is associated with increased FAK Tyr-576 expression. As there is increased expression in EA's increased expression in ZI in FAK Tyr-576. And when there is increased expression in EA's increased marking the ZI in FAK Tyr-925. Despite the role of all phosphorylated FAKs not clear, but given that these are FAKs that are active in cancer, from the present data it can be suggested that the evaluation of expression of FAK Tyr 576 in EA, CT and ZI will be part of the routine histopathological diagnosis and surgical specimen margins, as guiding the therapeutic management and monitoring protocol.

Keywords: Cell Migration Assays. Neoplasm Metastasis. Cell Adhesion. Cell Adhesion Molecules. FAK.

## SUMÁRIO

<b>ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS.....</b>	<b>07</b>
<b>1. Carcinoma Espinocelular.....</b>	<b>07</b>
<b>2. Proteínas de Adesão Celular no Câncer.....</b>	<b>08</b>
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>13</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
<b>ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>19</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>39</b>
<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>42</b>

## **ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS**

### **1. Carcinoma Espinocelular**

O carcinoma espinocelular (CEC) de boca é um dos seis tipos mais comuns de câncer, com uma incidência anual de 300.000 novos casos no mundo (1). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer estimou a ocorrência de 25.570 novos casos de câncer de cabeça e pescoço (CEC) no ano de 2014 e classificou em quinto lugar como o tipo de câncer mais frequente no Brasil (2). Ele representa 95% de todos os tipos de câncer de cabeça e pescoço e vem ocorrendo um aumento da sua incidência ao longo da última década (3). O CEC de cabeça e pescoço é uma lesão que acomete mais pacientes do sexo masculino, com mais de 50 anos de idade (4-7), e atribui-se que o hábito de fumar e que o uso de álcool estejam associados a mais de 80% dos casos de câncer de boca (5).

Ainda que haja melhoras no diagnóstico e no tratamento, a taxa de sobrevida é de apenas 50% ao longo de 5 anos (8, 9). Isso tem sido atribuído principalmente ao aumento das taxas de linfonodos metastáticos, apesar do fato de que o diagnóstico dos tumores estar sendo feito em estágios precoces (10). A detecção de metástases ocultas permanece difícil, de modo que o estabelecimento e validação de marcadores de prognóstico nas amostras de tumor primário têm sido considerados como de alta prioridade (11, 12). O entendimento dos mecanismos relacionados com a adesão das células epiteliais é importante no processo da carcinogênese do câncer bucal, na capacidade de invasão e de formação de metástases (13), uma vez que tumores com essas características são responsáveis por, aproximadamente, 90% dos casos de morte em decorrência desse tipo de câncer (14).

A população celular do CEC é heterogênea e há uma hierarquia com células mais agressivas, ou altamente tumorigênicas, responsáveis pela formação, invasão e metástase (14-17). As células neoplásicas necessitam alterar suas características moleculares para invadir o tecido conjuntivo adjacente, e os mecanismos que regulam este fenômeno ainda permanecem incertos. Sabe-se que uma pequena subpopulação de células tumorais apresenta esta capacidade (15, 17). Este



comportamento agressivo dessa pequena subpopulação celular possui importância clínica, uma vez que se acredita que esse grupo específico de células tenha papel fundamental na alta morbidade dos pacientes com CEC devido à formação de metástase e à recorrência do tumor (18).

O aparecimento de recorrências locais ou o surgimento de um novo tumor primário é mais comumente encontrado em pacientes já portadores de CEC de cabeça e pescoço. Esta observação foi explicada pelo conceito de “campo de cancerização”, que foi primeiramente descrito em 1953 por Slaughter et al (19) em estudo sobre câncer de boca. Este estudo concluiu que o desenvolvimento deste tumor se dá em áreas multifocais ditas como pré-cancerosas, sendo o tumor circundado por um tecido “anormal”, isto é, já alterado.

A presença deste tecido “anormal” é responsável pelo desenvolvimento de tumores secundários e recorrências locais. É sabido que o processo de carcinogênese resulta do acúmulo de alterações genéticas que torna uma célula normal em uma célula cancerosa (20). Então, este “efeito de campo” também apresenta estas alterações, o que foi observado em alguns tipos de tumores (boca, bexiga, esôfago, mama, entre outros). Logo, o campo de cancerização deve ser estudado como uma entidade distinta por apresentar alterações celulares com importante repercussão clínica (21-25).

A invasão tumoral é caracterizada pela invasão de células neoplásicas através da matriz extracelular (MEC) para o tecido vizinho, que requer aumento da mobilidade celular e alterações na dinâmica das adesões focais (AFs) (26).

## **2. Proteínas de Adesão Celular no Câncer**

A migração celular tem um papel fundamental em muitos aspectos na fisiologia e a sua desregulação pode levar a uma variedade de patologias, inclusive o câncer com seu potencial metastático. Ela requer mudanças altamente coordenadas na morfologia da célula e interações com a MEC (27). A adesão da célula com a MEC é essencial para a sobrevivência, proliferação e migração da maioria dos tipos celulares. A adesão da célula-MEC ocorre através de receptores

de integrina que alcançam a membrana plasmática e estabelecem uma ligação física entre a MEC e o citoesqueleto de actina. Numerosas proteínas celulares são recrutadas para os locais onde as integrinas são armazenadas para aumentar a adesão. Este processo é denominado adesão focal ou contatos focais. A cinase de adesão focal (FAK) localiza-se nas áreas de AFs e é ativada por mediadores de adesão de integrina. Quando a FAK é ativada, a tirosina é fosforilada em cima do agrupamento de integrinas (8). A descoberta das FAK nos anos 90 foi uma maneira de se entender que as integrinas não são apenas proteínas de adesão, mas também receptores de sinalização potentes, que são responsáveis por mecanismos que promovem a migração das células do tumor, invasão dos tecidos vizinhos e disseminação de metástase (8, 28).

Diferentes vias de sinalização celular dependem da ativação de FAK, incluindo migração celular, sinalização de fator de crescimento, progressão do ciclo celular e sobrevivência da célula (26). Ela é atraída para regiões de adesões focais após a ligação de talina e de paxilina à molécula de integrina (cadeias beta e alfa, respectivamente). Após esta ligação, ocorre uma fosforilação cruzada entre resíduos tirosinas específicos (Tyr397), gerando, dessa maneira, sítios de ligação para tirosina-quinases citoplasmáticas (família Src), que, ao se unirem às FAK, as fosforilam em FAK tirosinas e criam sítios de encaixe para outras proteínas sinalizadoras intracelulares (29). Segundo Hamadi et al (30), até 2005, seis locais fosforeceptores foram identificados e chamados de tirosinas 397, 407, 576, 577, 861 e 925 (31, 32). Mas o papel dessas formas fosforiladas de FAK não é muito bem compreendido (8, 33-37). Por todas essas funções, alguns estudos mostraram que a expressão elevada da FAK, em diversos tumores, incluindo os tumores de origem epitelial, indica que ela tem um papel importante na progressão para malignização desses tumores (8, 13, 28).

A superexpressão da FAK tem sido encontrada em diversos tipos de carcinoma, incluindo os de mama, próstata, colon, estômago, cabeça e pescoço, ovário e fígado. Além disso, a expressão elevada da FAK tem sido relacionada à capacidade de invasão do tumor e à presença de metástase regional (8, 38-42). Esses estudos sugerem que a FAK pode ter comportamento diferente em tumores distintos. Porém, não há na literatura estudos que utilizaram as FAKs fosforiladas em CEC.

Estudos prévios revelaram superexpressão da FAK em formas pré-invasivas de câncer de mama, cólon e bucal. Esses dados sugerem que a regulação da FAK pode ser um evento funcionalmente significativa na transformação epitelial e tem significância biológica no desenvolvimento precoce do CEC e de outros tipos de câncer, sendo assim importante a avaliação do tecido epitelial não neoplásico adjacente ao tumor (EA). Além do mais, FAK pode ser um mediador crítico na agressividade regional do CEC, o que pode ser a maior causa de mortalidade dos pacientes com esse tipo de câncer. A FAK tem papel chave na regulação das propriedades celulares que podem mediar a atividade de invasão, como a migração celular, invasão, adesão e sobrevivência. De interesse, a FAK é o ponto de convergência chave de ambos os sinais reguladores, tanto das integrinas como fatores de crescimento, que são frequentemente desregulados no CEC (8). As células do CEC podem ter comportamentos diferentes em cada zona do tumor (centro do tumor - CT e zona de invasão - ZI). Sendo assim, a distribuição espacial dessas células pode ter correlação com os achados clínicos tumorais, enfatizando a importância da análise dessas zonas no presente estudo (43). Esses dados sugerem que a FAK pode servir como um atrativo alvo terapêutico e como um modo de integração e de coordenação dos diferentes sinais celulares que envolvem a capacidade de invasão do CEC e as taxas de sobrevivência (8).

A mobilidade celular é um processo complexo envolvendo a protrusão da membrana plasmática e a formação de adesões que estabilizam a borda da célula e geram forças contráteis (*turnover*) e alcançam a parte posterior da célula. Acredita-se que mecanismos de sinalização FAK/Src podem atuar para coordenar atividades da Rac1 e RhoA para manter a propriedade de polaridade celular e do direcionamento do movimento celular (28, 34).

Além dos efeitos na motilidade, estudos recentes revelam um papel da FAK na sinalização da invasão celular envolvendo degradação proteolítica da matriz extracelular pela matriz de degradação de metaloproteinases (MMP). A ativação transcricional de MMP desencadeia reações que levam a expressão da CAS (p130Cas, substrato associado ao Crk). A expressão da CAS sinaliza comportamento invasivo das células Src-transformadas com a formação de grandes estruturas de podossomos e o aumento na clivagem de MMP-2 na sua forma ativa.

Também, a sinalização FAK/Src através da CAS implica em muitos caminhos que levam a expressão e ativação de MMPs (28).

A resistência a *anoikis*, que é a indução de apoptose relacionada com perda de adesão da célula com a matriz extracelular, é comumente encontrada em células tumorais e facilita o crescimento do tumor e a chance de metástase. Um papel da sinalização da FAK na resistência *anoikis* foi mostrado quando foi encontrada a expressão de CD2-FAK, que é uma fusão de proteínas que retém um alto nível de atividade da FAK quando as células são mantidas em suspensão, conferindo essa propriedade à FAK quando a mesma está ativada através da fosforilação na tirosina 397. Essa expressão da FAK pode ser encontrada em carcinoma espinocelular oral e relaciona a FAK à contribuição para a sobrevivência das células neoplásicas (28).

Há alguns anos, acreditava-se que a FAK era uma proteína que era detectada somente no citoplasma e na membrana plasmática. Porém, alguns estudos descreveram a função nuclear das FAKs nas formas fosforiladas em células endoteliais, que estão relacionadas ao gene p53 e sua regulação da apoptose (44-46). Alguns estudos em que se encontrou alta expressão da FAK no domínio FERM na porção N-terminal puderam iniciar a localização da FAK no núcleo, e com isso correlacionar diretamente a transativação da região da p53 para limitar a sua atividade de transcrição. Dessa maneira, se propôs que a FAK domínio-FERM inicia o processo de sinalização da apoptose e que a sinalização da FAK está relacionada à superexpressão da p 53 (47, 48).

A ativação da FAK é um ponto de convergência dos diversos caminhos de sinalização para mudanças de efeito no comportamento celular. A maior função da FAK é recrutar e ativar a via Src nos locais de adesão na matriz extracelular. Resíduos da FAK, como a FAK Tyr-576 e a FAK-Tyr 925, podem ser fosforilados pela via Src (28). As cinases da família Src são raramente mutadas em tumores humanos, mas a sua ativação é superexpressa em alguns tumores (côlon, mama, pâncreas, cérebro, ovário, bexiga), entre eles o de cabeça e pescoço (49). Embora Src seja um proto-oncogene, sua associação com a FAK é crítica para a formação de metástase (50).

A fosforilação da FAK em FAK-Tyr 576 na porção N-terminal (31) pela via Src, que é uma via de proliferação celular, influencia na migração celular pela regulação

das integrinas e pelas interações célula-célula, perpetuando a ação da FAK (51), elevando sua expressão pelo aumento da autofosforilação (FAK Tyr-397) da FAK (30, 31, 52). Sendo assim, a FAK Tyr-576 está relacionada à sobrevivência e migração das células tumorais, como relata Parri et al no seu estudo em câncer de próstata (53).

A FAK Tyr-925 está relacionada ao aumento da migração celular. Ela também contribui para o aumento do tempo de permanência da FAK nas áreas de AFs, que também se encontram em maior número quando a FAK Tyr-925 está ativa (54), dando estabilidade a essas adesões, contribuindo para a regulação do *turnover* da FAK. E, também, nas células em que a FAK Tyr-925 está presente, existem mais protrusões proeminentes dando mais capacidade de adesividade às mesmas (34). Além dessas funções, a fosforilação da FAK Tyr-925, na porção C-terminal da FAK, cria locais de ligação para outras proteínas (SH2) e adaptadores de moléculas (Grb2) que irão desencadear uma cascata de reações de sinalização celular (55).

Em estudos em outros tumores, como o de Ding et al em gliomas, associou-se a superexpressão da FAK e da forma fosforilada (FAK Tyr-397) à invasão tumoral e à piora no prognóstico (56). Embora a superexpressão da FAK esteja relacionada a tumores invasivos e com capacidade de metástase, não existem estudos publicados correlacionando a expressão da FAK e suas formas fosforiladas com parâmetros clínicos, tais como prognóstico, estadiamento e tempo de recorrência (44).

No presente trabalho, estudou-se a expressão da FAK e de suas formas fosforiladas FAK Tyr-925 e FAK Tyr-576 em CECs através de imunistoquímica, e correlacionou-se esses achados com parâmetros clínicos tumorais. A imunistoquímica é uma técnica que pode ser utilizada em amostras emblocadas em parafina, permitindo a inclusão de pacientes com maior tempo de preservação no estudo.

## Referências Bibliográficas

1. Wang Q, Gao P, Wang X, Duan Y. Investigation and identification of potential biomarkers in human saliva for the early diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2014;427:79-85.
2. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil/ Instituto Nacional de Câncer – Rio de Janeiro: INCA, 2013.
3. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2005;55(2):74-108.
4. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2011;61(2):69-90.
5. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral oncology*. 2009;45(4-5):309-16.
6. Jerjes W, Upile T, Petrie A, Riskalla A, Hamdoon Z, Vourvachis M, et al. Clinicopathological parameters, recurrence, locoregional and distant metastasis in 115 T1-T2 oral squamous cell carcinoma patients. *Head & neck oncology*. 2010;2:9.
7. Baxi SS, Pinheiro LC, Patil SM, Pfister DG, Oeffinger KC, Elkin EB. Causes of death in long-term survivors of head and neck cancer. *Cancer*. 2014;120(10):1507-13.
8. Canel M, Secades P, Rodrigo JP, Cabanillas R, Herrero A, Suarez C, et al. Overexpression of focal adhesion kinase in head and neck squamous cell carcinoma is independent of fak gene copy number. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(11 Pt 1):3272-9.
9. de Vicente JC, Rosado P, Lequerica-Fernandez P, Allonca E, Villallain L, Hernandez-Vallejo G. Focal adhesion kinase overexpression: correlation with lymph node metastasis and shorter survival in oral squamous cell carcinoma. *Head & neck*. 2013;35(6):826-30.
10. Sano D, Myers JN. Metastasis of squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Cancer metastasis reviews*. 2007;26(3-4):645-62.
11. Kantola S, Parikka M, Jokinen K, Hyrynkans K, Soini Y, Alho OP, et al. Prognostic factors in tongue cancer - relative importance of demographic, clinical and histopathological factors. *British journal of cancer*. 2000;83(5):614-9.
12. Wangsa D, Ryott M, Avall-Lundqvist E, Petersson F, Elmberger G, Luo J, et al. Ki-67 expression predicts locoregional recurrence in stage I oral tongue carcinoma. *British journal of cancer*. 2008;99(7):1121-8.

13. Schneider GB, Kurago Z, Zaharias R, Gruman LM, Schaller MD, Hendrix MJ. Elevated focal adhesion kinase expression facilitates oral tumor cell invasion. *Cancer*. 2002;95(12):2508-15.
14. Liang X. EMT: new signals from the invasive front. *Oral oncology*. 2011;47(8):686-7.
15. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 1989;18(8):432-7.
16. Okamoto A, Chikamatsu K, Sakakura K, Hatsushika K, Takahashi G, Masuyama K. Expansion and characterization of cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral oncology*. 2009;45(7):633-9.
17. Yanamoto S, Kawasaki G, Yamada S, Yoshitomi I, Kawano T, Yonezawa H, et al. Isolation and characterization of cancer stem-like side population cells in human oral cancer cells. *Oral oncology*. 2011;47(9):855-60.
18. Zhang Z, Filho MS, Nor JE. The biology of head and neck cancer stem cells. *Oral oncology*. 2012;48(1):1-9.
19. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer*. 1953;6(5):963-8.
20. Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell*. 2004;116(6):769-78.
21. Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer research*. 1996;56(11):2488-92.
22. Ha PK, Califano JA. The molecular biology of mucosal field cancerization of the head and neck. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*. 2003;14(5):363-9.
23. Braakhuis BJ, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer research*. 2003;63(8):1727-30.
24. Braakhuis BJ, Brakenhoff RH, Leemans CR. Second field tumors: a new opportunity for cancer prevention? *The oncologist*. 2005;10(7):493-500.
25. Dakubo GD, Jakupciak JP, Birch-Machin MA, Parr RL. Clinical implications and utility of field cancerization. *Cancer cell international*. 2007;7:2.

26. Lee BY, Timpson P, Horvath LG, Daly RJ. FAK signaling in human cancer as a target for therapeutics. *Pharmacology & therapeutics*. 2015;146:132-49.
27. Gardel ML, Schneider IC, Aratyn-Schaus Y, Waterman CM. Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration. *Annual review of cell and developmental biology*. 2010;26:315-33.
28. Siesser PM, Hanks SK. The signaling and biological implications of FAK overexpression in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(11 Pt 1):3233-7.
29. Klinghoffer RA, Sachsenmaier C, Cooper JA, Soriano P. Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction. *The EMBO journal*. 1999;18(9):2459-71.
30. Hamadi A, Bouali M, Dontenwill M, Stoeckel H, Takeda K, Ronde P. Regulation of focal adhesion dynamics and disassembly by phosphorylation of FAK at tyrosine 397. *Journal of cell science*. 2005;118(Pt 19):4415-25.
31. Calalb MB, Polte TR, Hanks SK. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Molecular and cellular biology*. 1995;15(2):954-63.
32. Schlaepfer DD, Hunter T. Evidence for in vivo phosphorylation of the Grb2 SH2-domain binding site on focal adhesion kinase by Src-family protein-tyrosine kinases. *Molecular and cellular biology*. 1996;16(10):5623-33.
33. Diaz-Montero CM, Wygant JN, McIntyre BW. PI3-K/Akt-mediated anoikis resistance of human osteosarcoma cells requires Src activation. *European journal of cancer*. 2006;42(10):1491-500.
34. Deramautd TB, Dujardin D, Hamadi A, Noulet F, Kolli K, De Mey J, et al. FAK phosphorylation at Tyr-925 regulates cross-talk between focal adhesion turnover and cell protrusion. *Molecular biology of the cell*. 2011;22(7):964-75.
35. Sieg DJ, Hauck CR, Schlaepfer DD. Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. *Journal of cell science*. 1999;112 ( Pt 16):2677-91.
36. van Nimwegen MJ, Verkoeijen S, van Buren L, Burg D, van de Water B. Requirement for focal adhesion kinase in the early phase of mammary adenocarcinoma lung metastasis formation. *Cancer research*. 2005;65(11):4698-706.
37. Schaller MD, Borgman CA, Cobb BS, Vines RR, Reynolds AB, Parsons JT. pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(11):5192-6.



38. Miyazaki T, Kato H, Nakajima M, Sohda M, Fukai Y, Masuda N, et al. FAK overexpression is correlated with tumour invasiveness and lymph node metastasis in oesophageal squamous cell carcinoma. *British journal of cancer*. 2003;89(1):140-5.
39. Theocharis S, Klijanienko J, Giaginis C, Alexandrou P, Patsouris E, Sastre-Garau X. FAK and Src expression in mobile tongue squamous cell carcinoma: associations with clinicopathological parameters and patients survival. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2012;138(8):1369-77.
40. Cance WG, Harris JE, Iacocca MV, Roche E, Yang X, Chang J, et al. Immunohistochemical analyses of focal adhesion kinase expression in benign and malignant human breast and colon tissues: correlation with preinvasive and invasive phenotypes. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2000;6(6):2417-23.
41. Furuyama K, Doi R, Mori T, Toyoda E, Ito D, Kami K, et al. Clinical significance of focal adhesion kinase in resectable pancreatic cancer. *World journal of surgery*. 2006;30(2):219-26.
42. Watermann DO, Gabriel B, Jager M, Orłowska-Volk M, Hasenburg A, zur Hausen A, et al. Specific induction of pp125 focal adhesion kinase in human breast cancer. *British journal of cancer*. 2005;93(6):694-8.
43. Hildebrand LC, Carvalho AL, Lauxen IS, Nor JE, Cerski CT, Sant'Ana Filho M. Spatial distribution of cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinomas. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2014;43(7):499-506.
44. Aronsohn MS, Brown HM, Hauptman G, Kornberg LJ. Expression of focal adhesion kinase and phosphorylated focal adhesion kinase in squamous cell carcinoma of the larynx. *The Laryngoscope*. 2003;113(11):1944-8.
45. Schaller MD. Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. *Journal of cell science*. 2010;123(Pt 7):1007-13.
46. Mitra SK, Schlaepfer DD. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Current opinion in cell biology*. 2006;18(5):516-23.
47. Schlaepfer DD, Mitra SK, Ilic D. Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2004; 1692:77-102.
48. Golubovskaya VM, Finch R, Cance WG. Direct interaction of the N-terminal domain of focal adhesion kinase with the N-terminal domain of focal adhesion kinase with the N-terminal transactivation domain of p53. *Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280:25008-25021.
49. Summy JM, Trevino JG, Baker CH, Gallick GE. c-Src regulates constitutive and EGF-mediated VEGF expression in pancreatic tumor cells through activation of phosphatidyl inositol-3 kinase and p38 MAPK. *Pancreas*. 2005;31(3):263-74.

50. Basson MD. An intracellular signal pathway that regulates cancer cell adhesion in response to extracellular forces. *Cancer research*. 2008;68(1):2-4.
51. Brunton VG, Avizienyte E, Fincham VJ, Serrels B, Metcalf CA, 3rd, Saw TK, et al. Identification of Src-specific phosphorylation site on focal adhesion kinase: dissection of the role of Src SH2 and catalytic functions and their consequences for tumor cell behavior. *Cancer research*. 2005;65(4):1335-42.
52. Ruest PJ, Roy S, Shi E, Mernaugh RL, Hanks SK. Phosphospecific antibodies reveal focal adhesion kinase activation loop phosphorylation in nascent and mature focal adhesions and requirement for the autophosphorylation site. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*. 2000;11(1):41-8.
53. Parri M, Buricchi F, Giannoni E, Grimaldi G, Mello T, Raugei G, et al. EphrinA1 activates a Src/focal adhesion kinase-mediated motility response leading to rho-dependent actino/myosin contractility. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(27):19619-28.
54. Kadare G, Gervasi N, Brami-Cherrier K, Blockus H, El Messari S, Arold ST, et al. Conformational dynamics of the focal adhesion targeting domain control specific functions of focal adhesion kinase in cells. *The Journal of biological chemistry*. 2015;290(1):478-91.
55. Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T, van der Geer P. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature*. 1994;372(6508):786-91.
56. Ding L, Sun X, You Y, Liu N, Fu Z. Expression of focal adhesion kinase and phosphorylated focal adhesion kinase in human gliomas is associated with unfavorable overall survival. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2010;156(1):45-52.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Descrever o padrão de expressão das moléculas de adesão FAK, FAK-Tyr576 e FAK-Tyr925 nas diferentes zonas do carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (centro do tumor e frente de invasão) e no tecido epitelial não neoplásico adjacente ao tumor.

### **Objetivos Específicos**

- Descrever o perfil dos pacientes da amostra e relacionar o tempo de preservação à evolução boa ou ruim.
- Relacionar a expressão de FAK e de formas fosforiladas da FAK (Tyr576 e Tyr925) com a graduação histopatológica, com os parâmetros clínicos tumorais (pTNM) e evolução após 5 anos de acompanhamento.

## ARTIGO CIENTÍFICO

**Artigo apresentado de acordo com as normas do periódico Cancer Research (Qualis Odontologia A1 – Ano base 2013, Fator de impacto 9.284).**

**Avaliação das cinases de adesão focal (FAKS) em diferentes zonas no carcinoma espinocelular bucal de cabeça e pescoço e sua relação com TNM, graduação histopatológica e evolução**

### Abstract

Squamous cell carcinoma (SCC) of the head and neck is a malignant neoplasm that implies low rates of survival and poor prognosis. The loss of adhesion and cell migration are biological processes involved in carcinogenesis. The aim of this study was to describe the pattern of expression of focal adhesion kinase molecule (FAK) and its phosphorylated forms, FAK-Tyr576, FAK-Tyr925, in SCC samples in the center of the tumor (CT) and invasion zone (ZI) and non-neoplastic epithelial tissue adjacent to these tumors (EA). According to histopathological grading, 48,1% of SCC samples are moderate. According to the system pTNM, 62,9% were T1 and T2, 64.8%, had no regional metastasis and no distant metastasis. The maximum time of follow up was 5,9 years and was obtained as the final preservation 46 of 54 patients, where it was observed that 58,1% of patients had good prognosis and 41,9% of patients had poor prognosis. The average years for patients to obtain the poor prognosis of status was 5.01. As for clinical staging, there was greater immunostaining in the stadium IVa compared to stage II in EA Tyr-576. And FAK expression was higher in stage IVb when compared to CT in stage I of FAK Tyr-576. Patients with poor prognosis after the maximum follow-up period had high expression in EA and ZI of FAK Tyr-576 and CT of FAK Tyr-925. In ZI, increased expression of FAK is associated with increased FAK Tyr-576 expression. As there is increased expression in EA's increased expression in ZI in FAK Tyr-576. And when there is increased expression in EA's increased marking the ZI in FAK Tyr-925. Despite the role of all phosphorylated FAKs not clear, but given that these are FAKs that are active in cancer, from the present data it can be suggested that the evaluation of expression of FAK Tyr 576 in EA, CT and ZI will be part of the routine histopathological diagnosis and surgical specimen margins, as guiding the therapeutic management and monitoring protocol.

## Introdução

Apesar dos recentes avanços no diagnóstico e no tratamento, a taxa global de sobrevivência do carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CEC) tem sofrido pequena melhora nos últimos anos (1). Compreender os mecanismos associados com a adesão das células epiteliais é crítico no que diz respeito à carcinogênese do câncer bucal, sua invasão e capacidade de metástase (2).

A adesão das células epiteliais à matriz extracelular (MEC) é um dos principais mecanismos que promove a migração das células do tumor, invasão dos tecidos vizinhos e disseminação de metástase. Essa adesão ocorre através de receptores de integrina espalhados na membrana plasmática que estabilizam uma ligação física entre a MEC e o citoesqueleto de actina (3). E, para que ocorra essa ligação, as células migratórias exigem a formação de adesão focal (AF) na frente da célula e sua dissociação na parte de trás da célula, devendo ser regulada de forma coordenada, sob o controle de vias de sinalização moleculares distintas (4). Um fator chave envolvido no controle das interações da célula-MEC é a cinase de adesão focal (FAK), uma proteína tirosina cinase intracelular que é encontrada nos locais de AFs (1).

A ativação da FAK, através da fosforilação, contribui para a regulação das integrinas e para a regulação de fatores de crescimento que promovem adesão celular, mobilidade, invasão e sobrevivência (5-8). A FAK, em contato com a integrina, se autofosforila em FAK Tyr-397, que, por sua vez, resulta em recrutamento de cinases da família Src e indução de várias vias de sinalização (9). Dependendo do tipo de célula, as cinases da família Src ou outras cinases fosforilam os resíduos restantes de FAK em Tyr-576 e Tyr-925, entre outros (10, 11). Porém, o papel dessas formas fosforiladas de FAK não é muito bem compreendido (4). A fosforilação da FAK na Tyr-576 pela via Src, que é uma via de proliferação celular, influencia na migração celular pela regulação das integrinas e pelas interações célula-célula, perpetuando a ação da FAK (12). A FAK Tyr-925 está relacionada ao aumento da migração celular. Ela também contribui para o aumento do tempo de permanência da FAK nas áreas de AFs, dando estabilidade a essas adesões, contribuindo para a regulação do *turnover* da FAK. E, também, nas células em que a

FAK Tyr-925 está presente, existem mais protrusões proeminentes dando mais capacidade de adesividade às mesmas (4).

Estudos prévios revelaram que a expressão elevada da FAK em formas pré-invasivas de câncer de mama, de cólon e de CEC de cabeça e pescoço pode ser um evento funcionalmente significativa na transformação maligna e tem significância biológica no desenvolvimento precoce do CEC e de outros tipos de câncer, sendo assim importante a avaliação do tecido epitelial não neoplásico adjacente ao tumor (EA). Além do mais, FAK pode ser um mediador crítico na agressividade regional do CEC, o que pode ser a maior causa de mortalidade dos pacientes com esse tipo de câncer. A FAK é o ponto de convergência chave dos sinais reguladores das integrinas e dos fatores de crescimento, que são frequentemente desregulados no CEC (1). Há alguns anos, acreditava-se que a FAK era uma proteína que era detectada somente no citoplasma e na membrana plasmática. Porém, alguns estudos descreveram a função nuclear das FAKs nas formas fosforiladas em que a alta expressão dessas proteínas está relacionada à superexpressão da p53, e com isso ao processo de sinalização da apoptose (13-17).

As células do CEC podem ter comportamentos diferentes em cada zona do tumor (centro do tumor - CT e zona de invasão - ZI). Sendo assim, a distribuição espacial dessas células pode ter correlação com os achados clínicos tumorais, enfatizando a importância da análise dessas zonas no presente estudo (18). Esses dados sugerem que a FAK pode servir como um atrativo alvo terapêutico e como um modo de integração e de coordenação dos diferentes sinais celulares que envolvem capacidade de invasão do CEC e de sobrevivência (1).

Sendo assim, o presente estudo teve como objetivos descrever o perfil dos pacientes da amostra, relacionar o tempo de preservação à evolução boa ou ruim, descrever o padrão de expressão da FAK, da FAK Tyr-576 e da FAK Tyr-925 em amostras de CEC (CT e ZI) e no EA, e correlacionar a expressão dessas proteínas com graduação histopatológica, parâmetros clínicos tumorais (pTNM) e evolução após 5 anos de acompanhamento.

## **Materiais e Métodos**

### **Descrição da Amostra**

Os 54 pacientes que fizeram parte deste estudo foram atendidos no Ambulatório de Cirurgia de Cabeça e Pescoço (CAP) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) entre os anos de 2009 e 2010. O estudo é observacional transversal analítico e a amostra utilizada foi considerada de conveniência.

Os blocos de parafina confeccionados através das amostras de CEC e os dados de acompanhamento clínico dos pacientes até o ano de 2012 são oriundos de estudo prévio aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG/HCPA) sob o número 09-315 (18).

### **Avaliação das Amostras Tumorais**

Cortes histológicos de 3 $\mu$ m, obtidos através dos blocos de parafina corados em hematoxilina e eosina, foram avaliados por dois patologistas cegos (A.P.C.F. e K.B.D.), que não sabiam de qual paciente pertencia o material. A graduação histopatológica foi realizada pelos mesmos patologistas segundo os critérios de Bryne et al, onde, para cada característica morfológica avaliada, foi atribuído um escore, os quais foram somados para determinar a qual grupo de malignidade pertencia o espécime: baixo (4-8), moderado (9-12) e alto (13-16) (19).

Os dados clínicos dos pacientes referentes aos tumores, tais como, tamanho do tumor (T), presença de metástase regional (N) e presença de metástase à distância (M), foram tabulados e classificados de acordo com o sistema TNM estabelecido pela *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* (20). Quando esta classificação é realizada antes do tratamento cirúrgico, é referido como TNM clínico (cTNM), e quando realizada após o exame histopatológico do tecido ressecado é referido como TNM patológico (pTNM) (21). Os dados foram obtidos dos prontuários do HCPA pela equipe que realizou o trabalho prévio citado anteriormente utilizando o pTNM(18). Após o tempo total de aco

mpanhamento, os pacientes vivos e sem recidiva foram considerados com boa evolução e os pacientes com recidiva, metástase ou óbito em decorrência do tumor foram considerados com evolução ruim.

Para cada amostra foram identificadas as zonas tumorais (CT e ZI) bem como EA. Para determinação do CT, foram avaliadas as ilhas tumorais localizadas na

região central da neoplasia, evitando áreas de necrose. A ZI foi identificada a partir das ilhas tumorais localizadas distantes à zona central, preferencialmente na transição entre o tecido conjuntivo e tecidos adjacentes profundos como muscular, adiposo e glandular. O EA correspondeu ao epitélio de revestimento da mucosa sem sinais morfológicos de alteração maligna.

### **Imunoistoquímica**

A técnica de imunoistoquímica foi realizada em lâminas silanizadas com cortes histológicos de 3µm e foram desparafinizados em xilol, reidratadas em álcool e imersas em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol para bloqueio da peroxidase endógena. A seguir, os cortes foram submetidos à recuperação antigênica com a Dako *retrieval solution citrate* pH6.0 (Dako, Carpinteria, CA, USA) para a FAK em panela a 115°C por 3 minutos e trinta segundos e depois a 95°C por 30 segundos. E, para a FAK Tyr-576 e FAK Tyr-925, a recuperação antigênica foi feita com solução enzimática de pepsina 3% a 30°C por 30 minutos. Após, foram incubados os anticorpos primários da FAK e das formas fosforiladas de FAK (Tyr-576 e Tyr-925) (FAK Antibody Sampler Kit #9330, coelho, Cell Signaling Technology), todos com diluição de 1:50 a temperatura de 4° C, *overnight*. O sistema de detecção empregado foi do tipo polimérico (*Envision dual link* ; Dako, Carpinteria, CA, USA). As revelações das reações foram realizadas por meio de solução cromógena, contendo 0,03% de 3-3,3'-Diaminobenzidina (DAB, DakoCytomation, USA) e foram contra-coradas com solução de hematoxilina de Mayer. Todas as reações foram acompanhadas de controles positivos de acordo com as instruções do fabricante em lâminas de carcinoma de mama. Para o controle negativo foi utilizado soro não imune da mesma espécie animal de desenvolvimento do anticorpo primário.

### **Avaliação dos Resultados**

Foram consideradas positivas para FAK e para a FAK Tyr925 as células tumorais que apresentaram a membrana plasmática e o citoplasma de cor castanha. E para a FAK Tyr-576 a marcação acastanhada do núcleo foi considerada como positiva.



Os cortes histológicos foram submetidos à análise semi-quantitativa baseados no percentual de células tumorais positivas em toda a lâmina, onde foram consideradas positivas marcações acima 25% e negativas de 0 à menor ou igual à 25%.

### **Reprodutibilidade**

A reprodutibilidade foi confirmada ao longo do estudo, onde a cada 10 lâminas avaliadas de cada proteína, uma foi sorteada para reavaliação. O valor de Kappa aceito foi maior que 0,7. Durante a avaliação, os examinadores eram cegos para qual paciente pertencia o material.

### **Análise Estatística**

Os dados foram analisados no programa SPSS, versão 21. Para análise de sobrevida através da preservação, foi utilizada a análise de Kaplan-Meier. Para verificar associação entre a positividade dos marcadores imunoistoquímicos com a graduação histopatológica, padrão pTNM dos tumores e dados demográficos dos pacientes, foram empregados os testes Qui-Quadrado, Exato de Fisher, Mann-Whitney, post-hoc de Dunn, Kruskal-Wallis e correlação de Spearman de acordo como tipo de variável utilizada. Foram considerados como níveis de significância valores de p menores e ou iguais à 0,05.

## **Resultados**

A média de idade dos pacientes avaliados no estudo foi de 58,3 anos, sendo 85,2% do gênero masculino e 14,8% feminino (dados não mostrados). No momento do diagnóstico 38,9% dos pacientes eram expostos ao fumo e 48,1% ao álcool. Dos pacientes expostos ao álcool, 83,3% mantinham o hábito por um período maior de dez anos (dados não mostrados).

Antes do diagnóstico de CEC de cabeça e pescoço, 55,5% deixaram o hábito de fumar e 46,3% de beber, numa média de 4,7 e 6,3 anos respectivamente. Os dados relativos à exposição e histórico de uso de fumo e álcool estão representados na tabela 1.

		N	%
<b>Fumo</b>			
<b>Histórico</b>			
	Expostos	51	94,4
	Não-Expostos	3	5,6
<b>Expostos ao fumo no diagnóstico</b>			
	Expostos	21	38,9
Não-expostos	Anteriormente expostos	30	55,55
	Nunca expostos	3	5,6
<b>Álcool</b>			
<b>Histórico</b>			
	Exposto	51	94,4
	Não-exposto	3	5,6
<b>Expostos ao álcool no diagnóstico</b>			
	Exposto	26	48,1
Não-exposto	Anteriormente expostos	25	46,3
	Nunca expostos	3	5,6
<b>Total</b>		<b>54</b>	<b>100</b>

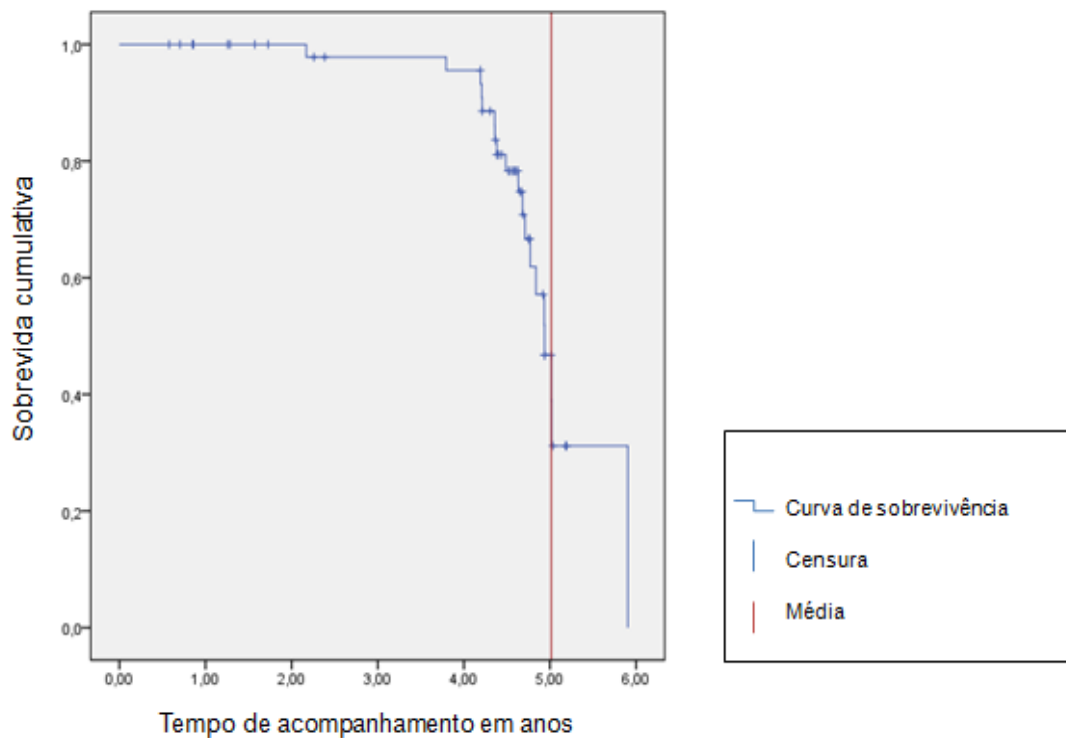
**Tabela 1:** dados relativos à exposição e histórico de uso de fumo e álcool.

De acordo com a graduação histopatológica, observou-se que 48,1% do total das amostras eram de grau moderado. De acordo com o sistema pTNM, 62,9% dos tumores tinham tamanho entre T1 e T2, 64,8% não apresentaram metástase regional (N0) e não houve metástase à distância (M0) (tabela 2).

	N	%
<b>Graduação Histológica</b>		
<b>Baixo</b>	25	46,3
<b>Moderado</b>	26	48,1
<b>Alto</b>	3	5,6
<b>Parâmetros Clínicos Tumorais</b>		
<b>Tamanho</b>		
<b>T1/T2</b>	34	62,9
<b>T3/T4</b>	20	37
<b>Total</b>	54	100
<b>Nódulo</b>		
<b>0</b>	35	64,8
<b>1,2 e 3</b>	19	35,2
<b>Total</b>	54	100
<b>Metástase</b>		
<b>MX, M0, M1</b>	0	0
<b>Total</b>	54	100

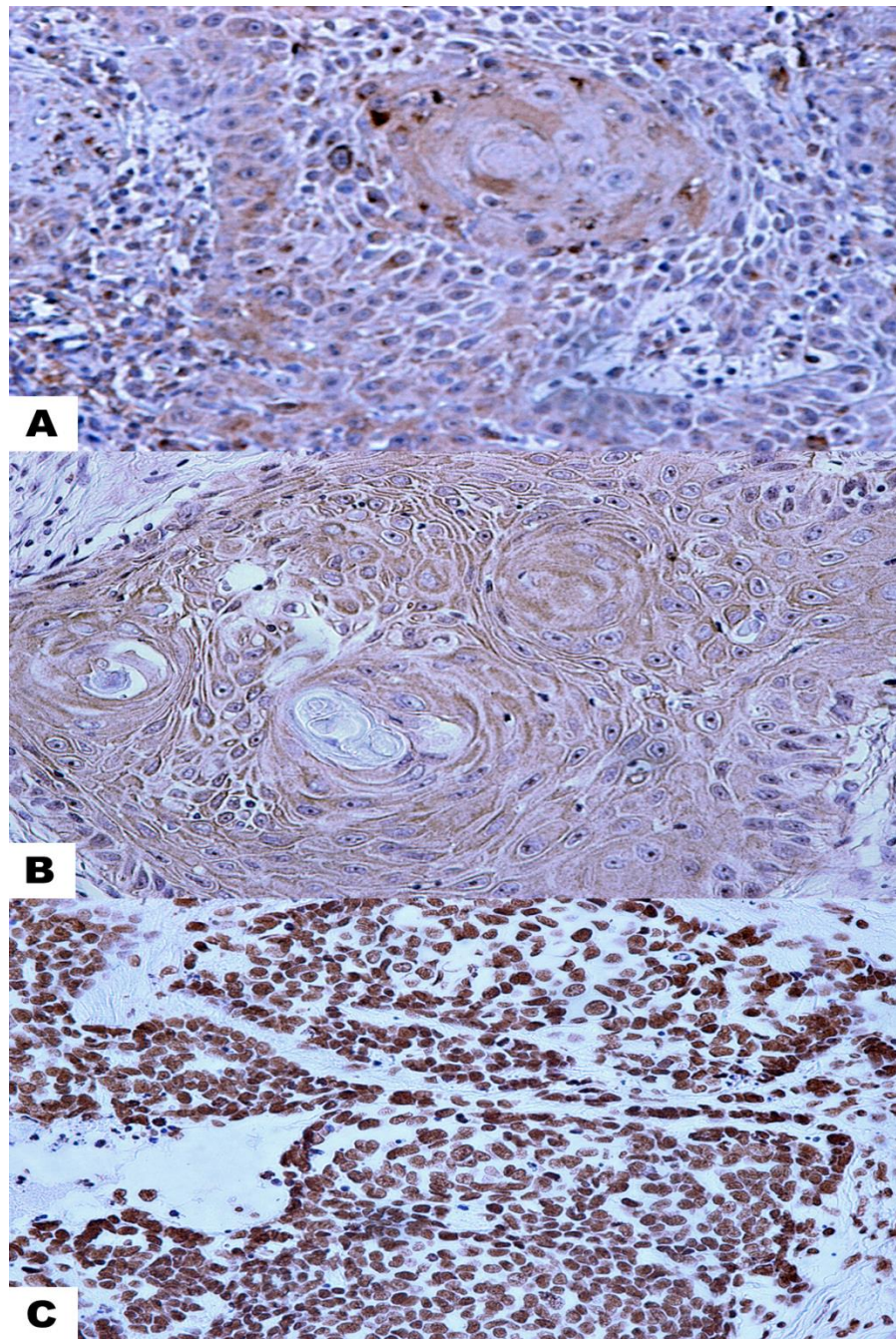
**Tabela 2:** Distribuição da amostra de acordo com a graduação histopatológica e parâmetros clínicos tumorais.

O tempo máximo de acompanhamento foi de 5,9 anos e obteve-se a preservação final de 46 dos 54 pacientes, onde foi observado que 58,1% estavam com boa evolução, enquanto 7% apresentaram recidiva, 2,3% metástase e 32,6% foram à óbito em decorrência do tumor, totalizando um percentual de 41,9% de pacientes com evolução ruim. A média em anos para que os pacientes obtivessem o *status* de evolução ruim foi de 5,01 (figura1).



**Figura 1:** curva de Kaplan-Meier demonstrando, de acordo com o tempo, a piora da evolução dos pacientes (desvio padrão 0,146, intervalo de confiança 95%).

No EA e nas zonas do tumor, observa-se que a FAK e a FAK Tyr-925 têm um padrão de marcação no citoplasma e na membrana plasmática, e a FAK Tyr-576 apresentou maior percentual de imunomarcação, além de também apresentar marcação nuclear das células tumorais (Figura 2). A frequência de imunomarcação das proteínas está representada na tabela 3.



**Figura 2:** Diferença entre o padrão de marcação das proteínas. FAK (A) e FAK Tyr-925 (B): citoplasma e membrana plasmática. FAK Tyr-576 (C): nuclear. Marcação positiva no CT em A, B e C. Aumento original de 400x. FONTE: Patologia Bucal FO/UFRGS.

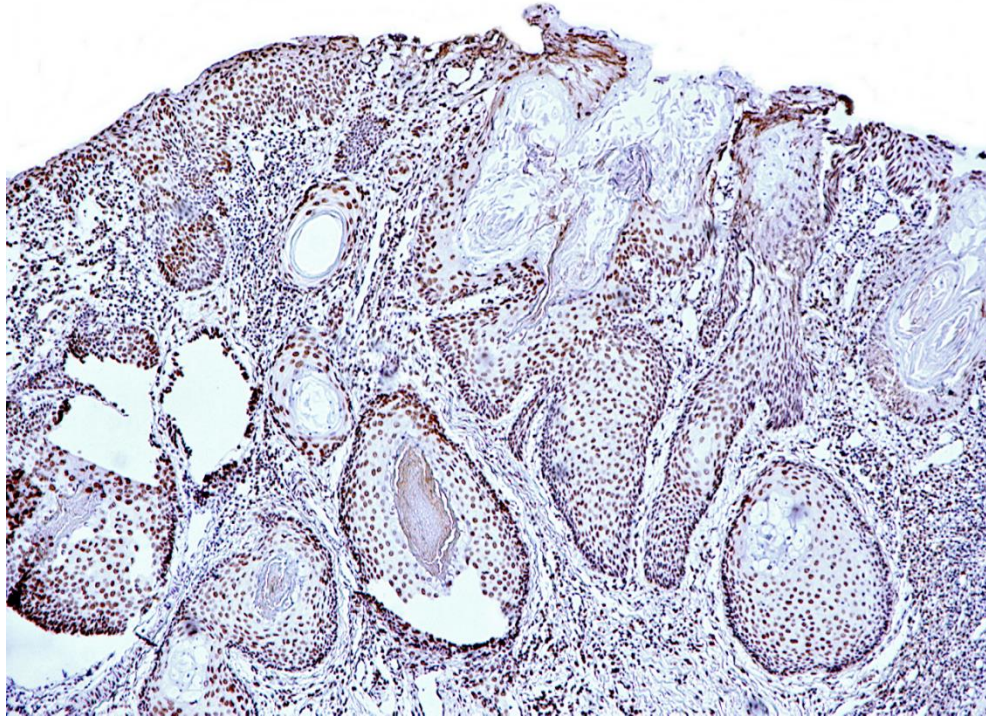
	<b>FAK</b>	<b>FAK Tyr-576</b>	<b>FAK Tyr-925</b>
<b>Epitélio adjacente</b>	79,6% (43)	83,3% (45)	81,5% (44)
<b>Ausente</b>	20,4% (11)	16,7% (9)	18,5% (10)
<b>Total</b>	100% (54)	100% (54)	100% (54)
<b>Zonas do tumor</b>	87% (47)	88,9% (48)	85,2% (46)
<b>Ausente</b>	13% (11)	11,1%(6)	14,8% (8)
<b>Total</b>	100% (54)	100% (54)	100% (54)

**Tabela 3:** Frequência de imunomarcção das FAK, FAK Tyr-576 e FAK Tyr-925 nas zonas do tumor e no EA.

Na ZI, o aumento de expressão da FAK está associado ao aumento da expressão da FAK Tyr-576 ( $r=0,295$ ,  $p=0,049$ ). À medida que há aumento da expressão no EA, há aumento da expressão na ZI na FAK Tyr-576 ( $r= 0,391$ ,  $p= 0,011$ ). E, quando há aumento da expressão no EA, há aumento da marcação na ZI da FAK Tyr-925 ( $r= 0,365$ ,  $p= 0,02$ ) (dados não mostrados).

Os tumores de graduação baixa apresentaram relação com a ausência de marcação no EA ( $p=0,04$ ) e com marcação positiva no CT ( $p=0,033$ ) da FAK Tyr-576. Nos tumores de graduação moderada ocorreu a marcação positiva em todos os EA ( $p=0,04$ ) e em todos os CT ( $p=0,033$ ) da FAK Tyr-576 (Figura 3).





**Figura 3:** Marcação positiva no EA e no CT da FAK-Tyr 576. Aumento original de 100x. FONTE: Patologia Bucal FO/UFRGS.

Quanto ao estadiamento clínico, houve maior imunomarcação no estágio IVa quando comparado ao estágio II no EA da FAK Tyr-576 ( $p=0,017$ ). E ocorreu maior expressão no estágio IVb quando comparado ao estágio I no CT da FAK Tyr-576 ( $p=0,015$ ).

Os pacientes que apresentaram evolução ruim após o período máximo de acompanhamento tiveram alta expressão no EA ( $p=0,033$ ) e na ZI ( $p=0,032$ ) da FAK Tyr-576 e no CT ( $p=0,030$ ) da FAK Tyr-925.

Considerando-se os hábitos investigados, não houve diferença significativa de marcação de nenhuma das proteínas estudadas entre os pacientes que relataram consumo de álcool e o hábito de fumar (dados não mostrados).

## Discussão

O CEC de cabeça e pescoço é uma lesão frequentemente encontrada em pessoas do sexo masculino, acima dos 50 anos de idade, dados esses que

corroboram com o presente estudo, em que a média de idade dos pacientes foi de 58,3 anos e que 85,2% desses eram do sexo masculino (22-25). A Globocan estima que irá ocorrer, em média, duas vezes mais novos casos de CEC de cabeça e pescoço em homens com idade inferior a 65 anos do que em mulheres no Brasil até o final de 2015 (26).

Os dados epidemiológicos dos pacientes portadores de CEC de cabeça e pescoço vêm sendo alterados com o passar do tempo uma vez que a literatura tradicionalmente atribui que o consumo de álcool e o hábito de fumar estejam associados a mais de 80% dos casos de CEC (23). Embora não possa ser negado o fato de que estes fatores são promotores e potencializadores da doença, observa-se nesta amostra uma tendência de mudança de perfil, uma vez que tanto os pacientes expostos ao fumo quanto ao álcool no momento do diagnóstico, cessaram seus hábitos antes do desenvolvimento da doença, sendo em média 4,7 anos para fumantes e 6,3 anos para usuários de álcool. De acordo com o histórico de exposição à estes fatores, houve uma diminuição de pacientes expostos, visto o número de ex-fumantes (55,55%) e ex-usuários de álcool (46,3%) observado na tabela 1. Este declínio do hábito de fumar e do uso de álcool pode estar relacionado a estratégias de saúde pública que visam o combate ao câncer e a outras doenças causadas por esses fatores de risco (27). Além disso, uma vez que o número de pacientes que fumam e que fazem uso de álcool tem diminuído, e que o número de casos de pacientes com CEC não, pode-se inferir que outros mecanismos ambientais ou individuais estejam atuando no desenvolvimento desta doença. Pode-se sugerir que a avaliação de cada paciente em particular seja mais importante na condução terapêutica do que se basear em condutas estabelecidas para a população em geral (28).

Tendo em vista a graduação histopatológica, observou-se que, do total das amostras de CEC, 48,1% era moderado e 46,3% era baixo. Somente 5,6% dos tumores do presente estudo tiveram graduação alta, o que poderia refletir em um alto percentual de pacientes com boa evolução ao término do trabalho. Porém, não foi isso que ocorreu, sendo que 41,9% dos pacientes apresentaram evolução ruim após o acompanhamento médio de 5,01 anos. Esse achado vai ao encontro a outro trabalho que propõe que a graduação histopatológica não serve de fator preditivo para o prognóstico (29). Também se pode considerar que a graduação



histopatológica é um fator de análise subjetivo e que requer patologistas previamente treinados para sua execução, bem como podemos não estar analisando a lesão como um todo e nem analisando a hierarquia celular. No trabalho de Jiang et al (2010) não se encontrou correlação entre a expressão da FAK e o grau de diferenciação histopatológica (Sistema de Broder's) (30). Na FAK e na FAK Tyr-925 também não encontramos resultados significativos em relação à graduação histopatológica de Bryne et al. Mas os tumores de graduação baixa apresentaram relação com a ausência de marcação no EA e com marcação positiva no CT na FAK Tyr-576. E, nos tumores de graduação moderada, ocorreu a marcação positiva em todos os EA e em todos os CT na FAK Tyr-576. Porém, esses achados em relação à FAK Tyr-576 não podem ser confrontados com a literatura, uma vez que não há estudos dessa proteína em CEC de cabeça e pescoço. Esses resultados podem indicar que a marcação da FAK Tyr-576 no EA pode ser fator predictivo, na medida em que há aumento da imunomarcação dessa proteína no EA quando aumenta a graduação histopatológica dos tumores. E, quanto à marcação no CT, pode-se mais uma vez sugerir que a função proliferativa da FAK Tyr-576, como substrato da via Src (31), está ativa em CEC. Assim sendo, podemos sugerir que a avaliação dos tumores por zonas (CT e ZI) e do EA pode ser mais interessante para a prática clínica do que a graduação histopatológica.

De acordo com o sistema pTNM, 62,9% dos tumores tinham tamanho entre T1 e T2 e 64,8% não apresentaram metástase regional. Conforme a literatura, a presença de metástase regional é relativamente comum em CEC e, para alguns autores, é o fator prognóstico mais adverso, servindo como guia terapêutico para esse tumor (1, 30, 32, 33). Já a presença de metástase à distância é rara (34). Este dado está de acordo com os achados da amostra estudada, em que o percentual de metástase regional foi de 35,2% e não houve metástase à distância. A taxa de sobrevida pode cair pela metade na presença de metástase regional (35), sendo assim, o total de pacientes que tiveram evolução ruim (41,9%) ao final do período de acompanhamento estão dentro do percentual encontrado na literatura (26, 27). Todavia, considerando-se que a maioria dos pacientes do presente estudo encontrava-se em estágios iniciais da doença no momento da cirurgia segundo o pTNM (T1-T2=62,9% N0= 64,8%) e o percentual de pacientes com evolução ruim ao final do estudo foi alto (41,9%), sugere-se que o estadiamento clínico parece ter

papel importante na decisão terapêutica no momento do diagnóstico inicial, mas não deve servir como avaliador de prognóstico, de acordo com os resultados do presente estudo, que corroboram com o trabalho de Fan et al em adenocarcinomas (35).

No presente trabalho, a média em anos para que 41,9% dos pacientes obtivessem o *status* de evolução ruim foi de 5,01 anos e o tempo máximo de acompanhamento desses pacientes foi de 5,9 anos. No estudo de de Vicente et al, essa média foi de 4,16 anos (32). Esse percentual vai ao encontro com os dados da literatura que relatam que, apesar dos avanços no diagnóstico e no tratamento, as taxas de sobrevida para pacientes com CEC se mantêm as mesmas há décadas, girando em torno de 30 a 50% (22, 1, 23, 36, 37).

No EA e nas zonas do tumor, observa-se que a FAK e a FAK Tyr-925 têm um padrão de marcação no citoplasma e na membrana plasmática e na FAK Tyr-576 ocorreu a marcação nuclear das células tumorais (Figura 2). Pode-se analisar uma alta marcação positiva das três proteínas em todas as áreas analisadas no estudo, com resultados significativos no EA e ZI da FAK Tyr-576 e no CT da FAK Tyr-925. Destaca-se o maior percentual de expressão tanto no EA quanto nas zonas do tumor da FAK Tyr-576. Somente a imunomarcação da FAK em CEC pode ter seus achados correlacionados aos da literatura (1-3), uma vez que não há relatos de estudos das FAK Tyr-925 e da FAK Tyr-576 nesse tipo de tumor, porém, esse padrão de marcação confere com o que está relatado na literatura para essas proteínas em outros tumores (38).

Nos tumores do presente estudo, observou-se correlação positiva das três proteínas entre si. A correlação positiva entre a ZI na FAK e na FAK Tyr-576 indica que a função de perpetuação da FAK pela ação da FAK Tyr-576 esteja presente na ZI do CEC, assim como em outros tumores, e que relaciona esta zona do tumor à atividade de proliferação e invasão do mesmo (12). A FAK-Tyr 925 está relacionada ao aumento na velocidade de migração celular e também à estabilidade da FAK nas áreas de adesão focal. Ela atua no *turnover* (reciclagem), que é a mudança das formas de adesão aumentando adesividade. Esse *turnover* proporciona protruções proeminentes na área de lamelipódio, aumentando a adesividade (4). E a correlação positiva entre a FAK Tyr-925 no EA com a FAK Tyr-925 na ZI sugere que essas funções da FAK-Tyr 925 no CEC estejam relacionadas à capacidade de invasão

desse tumor, tanto na transição do epitélio para o conjuntivo, quanto em profundidade das células tumorais no conjuntivo, fatos esses que podem levar à metástase.

Na ZI, o aumento de expressão da FAK está associado ao aumento da expressão da FAK Tyr-576. No trabalho que analisou a imunexpressão da FAK em carcinoma espinocelular de língua, observou-se superexpressão da FAK em 69% dos casos com uma forte marcação nas ZIs dos tumores quando comparadas ao EA e ao CT (30). No presente trabalho, observou-se um alto percentual de imunomarcação nas ZIs das três proteínas utilizadas no estudo (FAK= 80,8%, FAK Tyr-576=97,9% e FAK Tyr-925=91,3%), com resultados significativos na ZI da FAK Tyr-576. Sabendo-se que as FAKs fosforiladas é que têm papel na migração e na mobilidade das células tumorais (8), estando ativas no processo da carcinogênese, sugere-se que a aplicação das mesmas seja utilizada como meio avaliador de prognóstico. Como foram encontrados dados de associação entre a imunomarcação das proteínas entre si e obteve-se resultados estatísticos da FAK Tyr-576, indicamos que essa seja a proteína de escolha para a utilização na prática laboratorial.

Metástase regional é um processo no qual as células tumorais degradam a matriz extracelular (MEC), migram através da MEC, circulam nos vasos linfáticos e depois fixam nos linfonodos e proliferam. A presença ou não de metástase regional é determinante na decisão terapêutica e no prognóstico de pacientes com CEC (30, 39). Alguns estudos demonstram que a FAK pode ser utilizada como um marcador molecular para metástase regional em CEC (1, 2, 30, 40). No estudo de Jiang et al 2010, os autores encontraram correlação da expressão da FAK com a presença de linfonodos regionais (30). No estágio IVa, em que provavelmente há a presença de metástase regional, encontrou-se alta expressão no EA na FAK Tyr-576. E, no estágio IVb, em que há necessariamente a presença de metástase regional, encontrou-se alta marcação no CT de FAK Tyr-576. Esses achados sugerem que a expressão no EA e no CT de FAK Tyr-576 faz com que essa proteína possa ser utilizada como um imunomarcador relacionado à metástase regional em CEC.

Os pacientes que apresentaram evolução ruim após o período final de acompanhamento tiveram alta expressão no EA e na ZI da FAK Tyr-576 e no CT da FAK Tyr-925. O aumento da expressão da FAK está relacionado à atividade

metastática e ao prognóstico ruim, conforme a literatura (32). Contudo, não existem estudos fazendo essa relação com as FAKs fosforiladas, que são realmente as ativas no CEC. Esses achados mais uma vez sugerem que a FAK Tyr-576 atue na proliferação celular (12) das células tumorais, uma vez que está presente no EA e que essa proteína perpetua as ações da FAK de sobrevivência e migração (41) na ZI do CEC. A alta marcação no CT de FAK Tyr-925 pode sugerir que a velocidade de migração das células nessa zona do tumor esteja aumentada devido ao maior número de áreas de AFs (42), provavelmente podendo levar a metástase e à piora de prognóstico dos pacientes que tem marcação positiva para essa proteína em CEC de cabeça e pescoço.

Assim como no estudo de de Vicente et al (32), no trabalho não houve significância estatística na relação entre idade, sexo, hábitos de fumo e álcool com a expressão da FAK e de suas formas fosforiladas.

Até o momento, existem poucos trabalhos que correlacionam dados clínicos com a expressão da FAK e de suas formas fosforiladas em CECs, mas os dados existentes relacionam a imunexpressão dessas proteínas com evolução ruim e com baixa taxa de sobrevida (2). Sendo assim, sugere-se que a FAK pode ser utilizada como um marcador predictivo (32). Apesar do papel de todas as FAKs fosforiladas não estar claro, mas sabendo-se que são essas FAKs que estão ativas no câncer e a partir dos dados do presente trabalho, pode-se sugerir que a avaliação da marcação FAK Tyr 576 FAK no EA, no CT e na ZI venha a fazer parte da rotina no diagnóstico histopatológico, além da avaliação das margens da peça operatória. Principalmente no EA essa avaliação poderá servir como indicativo de prognóstico, podendo nortear diferentes condutas, ou seja, pacientes que tiverem marcação positiva para essa proteína deverão ter acompanhamento clínico mais rigoroso.

## **Referências Bibliográficas**

1. Canel M, Secades P, Rodrigo JP, Cabanillas R, Herrero A, Suarez C, et al. Overexpression of focal adhesion kinase in head and neck squamous cell carcinoma is independent of fak gene copy number. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(11 Pt 1):3272-9.

2. Schneider GB, Kurago Z, Zaharias R, Gruman LM, Schaller MD, Hendrix MJ. Elevated focal adhesion kinase expression facilitates oral tumor cell invasion. *Cancer*. 2002;95(12):2508-15.
3. Siesser PM, Hanks SK. The signaling and biological implications of FAK overexpression in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(11 Pt 1):3233-7.
4. Deramaudt TB, Dujardin D, Hamadi A, Noulet F, Kolli K, De Mey J, et al. FAK phosphorylation at Tyr-925 regulates cross-talk between focal adhesion turnover and cell protrusion. *Molecular biology of the cell*. 2011;22(7):964-75.
5. Diaz-Montero CM, Wygant JN, McIntyre BW. PI3-K/Akt-mediated anoikis resistance of human osteosarcoma cells requires Src activation. *European journal of cancer*. 2006;42(10):1491-500.
6. van Nimwegen MJ, Verkoeijen S, van Buren L, Burg D, van de Water B. Requirement for focal adhesion kinase in the early phase of mammary adenocarcinoma lung metastasis formation. *Cancer research*. 2005;65(11):4698-706.
7. Schaller MD, Borgman CA, Cobb BS, Vines RR, Reynolds AB, Parsons JT. pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(11):5192-6.
8. Sieg DJ, Hauck CR, Schlaepfer DD. Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. *Journal of cell science*. 1999;112 ( Pt 16):2677-91.
9. Parsons JT. Focal adhesion kinase: the first ten years. *Journal of cell science*. 2003;116(Pt 8):1409-16.
10. Calalb MB, Polte TR, Hanks SK. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Molecular and cellular biology*. 1995;15(2):954-63.
11. Schlaepfer DD, Hunter T. Evidence for in vivo phosphorylation of the Grb2 SH2-domain binding site on focal adhesion kinase by Src-family protein-tyrosine kinases. *Molecular and cellular biology*. 1996;16(10):5623-33.
12. Brunton VG, Avizienyte E, Fincham VJ, Serrels B, Metcalf CA, 3rd, Sawyer TK, et al. Identification of Src-specific phosphorylation site on focal adhesion kinase: dissection of the role of Src SH2 and catalytic functions and their consequences for tumor cell behavior. *Cancer research*. 2005;65(4):1335-42.
13. Aronsohn MS, Brown HM, Hauptman G, Kornberg LJ. Expression of focal adhesion kinase and phosphorylated focal adhesion kinase in squamous cell carcinoma of the larynx. *The Laryngoscope*. 2003;113(11):1944-8.
14. Schaller MD. Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. *Journal of cell science*. 2010;123(Pt 7):1007-13.
15. Mitra SK, Schlaepfer DD. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Current opinion in cell biology*. 2006;18(5):516-23.
16. Schlaepfer DD, Mitra SK, Ilic D. Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2004; 1692:77-102.
17. Golubovskaya VM, Finch R, Cance WG. Direct interaction of the N-terminal domain of focal adhesion kinase with the N-terminal domain of focal adhesion kinase with the N-terminal transactivation domain of p53. *Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280:25008-25021.
18. Hildebrand LC, Carvalho AL, Lauxen IS, Nor JE, Cerski CT, Sant'Ana Filho M. Spatial distribution of cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinomas. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2014;43(7):499-506.
19. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjaerheim A. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *The Journal of pathology*. 1992;166(4):375-81.

20. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of surgical oncology*. 2010;17(6):1471-4.
21. Takes RP, Rinaldo A, Silver CE et al. Future of the TNM classification and staging system in head and neck cancer. *Head Neck* 2010; 32: 1693–1711.
22. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2011;61(2):69-90.
23. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral oncology*. 2009;45(4-5):309-16.
24. Jerjes W, Upile T, Petrie A, Riskalla A, Hamdoon Z, Vourvachis M, et al. Clinicopathological parameters, recurrence, locoregional and distant metastasis in 115 T1 oral squamous cell carcinoma patients. *Head & neck oncology*. 2010;2:9.
25. Baxi SS, Pinheiro LC, Patil SM, Pfister DG, Oeffinger KC, Elkin EB. Causes of death in long-term survivors of head and neck cancer. *Cancer*. 2014;120(10):1507-13.
26. World Health Organization, Globocan. Acesso em Junho 2015: <http://www-dep.iarc.fr/WHODb/WHODb.htm>
27. Kim L, King T, Agulnik M. Head and neck cancer: changing epidemiology and public health implications. *Oncology*. 2010;24(10):915-9, 24.
28. Zhang Z, Filho MS, Nor JE. The biology of head and neck cancer stem cells. *Oral oncology*. 2012;48(1):1-9.
29. Taghavi N, Yazdi I. Prognostic factors of survival rate in oral squamous cell carcinoma: clinical, histologic, genetic and molecular concepts. *Archives of Iranian medicine*. 2015;18(5):314-9.
30. Jiang H, Liu L, Ye J, Liu H, Xing S, Wu Y. Focal adhesion kinase serves as a marker of cervical lymph node metastasis and is a potential therapeutic target in tongue cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2010;136(9):1295-302.
31. Ciccimaro E, Hanks SK, Blair IA. Quantification of focal adhesion kinase activation loop phosphorylation as a biomarker of Src activity. *Molecular pharmacology*. 2009;75(3):658-66.
32. de Vicente JC, Rosado P, Lequerica-Fernandez P, Allonca E, Villallain L, Hernandez-Vallejo G. Focal adhesion kinase overexpression: correlation with lymph node metastasis and shorter survival in oral squamous cell carcinoma. *Head & neck*. 2013;35(6):826-30.
33. Rosado P, Lequerica-Fernandez P, Pena I, Alonso-Duran L, de Vicente JC. In oral squamous cell carcinoma, high FAK expression is correlated with low P53 expression. *Virchows Arch*. 2012;461(2):163-8.
34. Montero PH, Patel SG. Cancer of the Oral Cavity. *Surgical oncology clinics of North America*. 2015;24(3):491-508.
35. Fan X, Zhang X, Wang H, Jin B. Reevaluation of survival and prognostic factors in pathologic stage I lung adenocarcinoma by the new 2009 TNM classification. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2014;35(6):5905-10.
36. Sankaranarayanan R, Masuyer E, Swaminathan R, Ferlay J, Whelan S. Head and neck cancer: a global perspective on epidemiology and prognosis. *Anticancer research*. 1998;18(6B):4779-86.
37. Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D. Head and neck cancer. *The New England journal of medicine*. 2001;345(26):1890-900.
38. Schaller MD. Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. *Journal of cell science*. 2010;123(Pt 7):1007-13.
39. Ziober BL, Silverman SS, Jr., Kramer RH. Adhesive mechanisms regulating invasion and metastasis in oral cancer. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*. 2001;12(6):499-510.
40. Rodrigo JP, Dominguez F, Suarez V, Canel M, Secades P, Chiara MD. Focal adhesion kinase and E-cadherin as markers for nodal metastasis in laryngeal cancer. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*. 2007;133(2):145-50.

41. Parri M, Buricchi F, Giannoni E, Grimaldi G, Mello T, Raugei G, et al. EphrinA1 activates a Src/focal adhesion kinase-mediated motility response leading to rho-dependent actino/myosin contractility. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(27):19619-28.
42. Kadare G, Gervasi N, Brami-Cherrier K, Blockus H, El Messari S, Arold ST, et al. Conformational dynamics of the focal adhesion targeting domain control specific functions of focal adhesion kinase in cells. *The Journal of biological chemistry*. 2015;290(1):478-91.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O carcinoma espinocelular (CEC) de boca é um dos seis tipos mais comuns de câncer, com uma incidência anual de 300.000 novos casos no mundo (1). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer estimou a ocorrência de 25.570 novos casos de câncer de cabeça e pescoço (CEC) no ano de 2014 e classificou em quinto lugar como o tipo de câncer mais frequente no Brasil (2). O CEC de cabeça e pescoço é uma lesão que acomete mais pacientes do sexo masculino, com mais de 50 anos de idade (1, 3-5), dados esses que corroboram com o presente estudo em que a média de idade dos pacientes foi de 58,3 anos e que 85,2% desses eram do sexo masculino. No presente estudo, 57,4% dos pacientes eram fumantes e 51,9% eram usuários de álcool, números abaixo dos encontrados na literatura que atribuem que o consumo de álcool e o hábito de fumar estejam associados a mais de 80% dos casos de CEC (6). Uma vez que o número de pacientes que fumam e que fazem uso de álcool tem diminuído, e que o número de casos de pacientes com CEC não, pode-se inferir que outros mecanismos ambientais ou individuais necessitam ser investigados para melhor compreensão destes eventos. Pode-se sugerir que a avaliação de cada paciente em particular seja mais importante na condução terapêutica do que basear-se em condutas estabelecidas para a população em geral (7).

A população celular do CEC é heterogênea e há uma hierarquia com células mais agressivas, ou altamente tumorigênicas, responsáveis pela formação, invasão e metástase (8-11). As células neoplásicas necessitam alterar suas características moleculares para invadir o tecido conjuntivo adjacente, e os mecanismos que regulam este fenômeno ainda permanecem incertos. Sabe-se que uma pequena subpopulação de células tumorais apresenta esta capacidade (8, 10). Este comportamento agressivo dessa pequena subpopulação celular tem importância clínica, uma vez que se acredita que esse grupo específico de células tenha papel fundamental na alta morbidade dos pacientes com CEC devido à formação de metástase e à recorrência do tumor (7).

A adesão das células epiteliais à matriz extracelular (MEC) é um dos principais mecanismos que promove a migração das células do tumor, invasão dos



tecidos vizinhos e disseminação de metástase. A adesão da célula-MEC ocorre através de receptores de integrina que alcançam a membrana plasmática e estabelecem uma ligação física entre a MEC e o citoesqueleto de actina através de proteínas celulares que são recrutadas para os locais onde as integrinas são armazenadas para aumentar a adesão. Este processo é denominado adesão focal ou contatos focais. A cinase de adesão focal (FAK) localiza-se nas áreas de AFs e é ativada por mediadores de adesão de integrina. Quando a FAK é ativada, a tirosina é fosforilada em integrinas agrupadas (12).

Estudos prévios revelaram que a expressão elevada da FAK em formas pré-invasivas de alguns tipos de câncer pode ser um evento funcionalmente significativa na transformação maligna, sendo assim importante a avaliação do tecido epitelial não neoplásico adjacente ao tumor (EA). As células do CEC podem ter comportamentos diferentes em cada zona do tumor (centro do tumor - CT e zona de invasão - ZI). Sendo assim, a distribuição espacial dessas células pode ter correlação com as achados clínicos tumorais, enfatizando a importância da análise dessas zonas no presente estudo (13).

A FAK, em contato com a integrina, se autofosforila em FAK Tyr-397, que, por sua vez, resulta em recrutamento de cinases da família Src e indução de várias vias de sinalização (11). Dependendo do tipo de célula, as cinases da família Src ou outras cinases fosforilam os resíduos restantes de FAK em Tyr-576 e Tyr-925, entre outros (12, 13). Porém, o papel dessas formas fosforiladas de FAK não é muito bem compreendido (6). A fosforilação da FAK na Tyr 576 pela via Src, que é uma via de proliferação celular, influencia na migração celular pela regulação das integrinas e pelas interações célula-célula, perpetuando a ação da FAK (14). A FAK Tyr-925 está relacionada ao aumento da migração celular. Ela também contribui para o aumento do tempo de permanência da FAK nas áreas de AFs, dando estabilidade a essas adesões, contribuindo para a regulação do *turnover* da FAK (6).

Embora a superexpressão da FAK esteja relacionada a tumores invasivos e com capacidade de metástase, não existem estudos publicados correlacionando a expressão da FAK e suas formas fosforiladas com parâmetros clínicos, tais como, prognóstico, estadiamento e tempo de recorrência (14). Então, no presente trabalho, avaliou-se a expressão da FAK, da FAK-Tyr 576 e da FAK Tyr-925. E correlacionou-

se esses achados aos parâmetros citados anteriormente e à graduação histopatológica, segundo os critérios de Bryne et al (8).

Somente 5,6% dos tumores do presente estudo tiveram graduação alta, o que poderia refletir em um alto percentual de pacientes com boa evolução ao término do trabalho. Porém, não foi isso que ocorreu, sendo que 41,9% dos pacientes apresentaram evolução ruim após o acompanhamento médio de 5,01 anos. Assim sendo, podemos sugerir que a avaliação dos tumores por zonas (CT e ZI) e do EA pode ser mais interessante para a prática clínica do que a graduação histopatológica.

O aumento da expressão da FAK está relacionado à atividade metastática e ao prognóstico ruim, conforme a literatura (28). Sendo assim, sugere-se que a FAK pode ser utilizada como um marcador predictivo (28). Apesar do papel de todas as FAKs fosforiladas não estar claro, mas sabendo-se que são essas FAKs que estão ativas no câncer e a partir dos dados do presente trabalho, pode-se sugerir que a avaliação da marcação FAK Tyr 576 FAK no EA, no CT e na ZI venha a fazer parte da rotina no diagnóstico histopatológico, além da avaliação das margens da peça operatória. Principalmente no EA essa avaliação poderá servir como indicativo de prognóstico, podendo nortear diferentes condutas, ou seja, pacientes que tiverem marcação positiva para essa proteína deverão ter acompanhamento clínico mais rigoroso.

## Referências Bibliográficas

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2011;61(2):69-90.
2. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil/ Instituto Nacional de Câncer – Rio de Janeiro: INCA, 2013.
3. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral oncology*. 2009;45(4-5):309-16.
4. Jerjes W, Upile T, Petrie A, Riskalla A, Hamdoon Z, Vourvachis M, et al. Clinicopathological parameters, recurrence, locoregional and distant metastasis in 115 T1-T2 oral squamous cell carcinoma patients. *Head & neck oncology*. 2010;2:9.
5. Baxi SS, Pinheiro LC, Patil SM, Pfister DG, Oeffinger KC, Elkin EB. Causes of death in long-term survivors of head and neck cancer. *Cancer*. 2014;120(10):1507-13.
6. Siesser PM, Hanks SK. The signaling and biological implications of FAK overexpression in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(11 Pt 1):3233-7.
7. Zhang Z, Filho MS, Nor JE. The biology of head and neck cancer stem cells. *Oral oncology*. 2012;48(1):1-9.
8. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 1989;18(8):432-7.
9. Okamoto A, Chikamatsu K, Sakakura K, Hatsushika K, Takahashi G, Masuyama K. Expansion and characterization of cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral oncology*. 2009;45(7):633-9.
10. Yanamoto S, Kawasaki G, Yamada S, Yoshitomi I, Kawano T, Yonezawa H, et al. Isolation and characterization of cancer stem-like side population cells in human oral cancer cells. *Oral oncology*. 2011;47(9):855-60.
11. Liang X. EMT: new signals from the invasive front. *Oral oncology*. 2011;47(8):686-7.
12. Canel M, Secades P, Rodrigo JP, Cabanillas R, Herrero A, Suarez C, et al. Overexpression of focal adhesion kinase in head and neck squamous cell carcinoma is independent of fak gene copy number. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(11 Pt 1):3272-9.
13. Hildebrand LC, Carvalho AL, Lauxen IS, Nor JE, Cerski CT, Sant'Ana Filho M. Spatial distribution of cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinomas. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2014;43(7):499-506.

14. Aronsohn MS, Brown HM, Hauptman G, Kornberg LJ. Expression of focal adhesion kinase and phosphorylated focal adhesion kinase in squamous cell carcinoma of the larynx. *The Laryngoscope*. 2003;113(11):1944-8.