

Aplicaciones clínicas del diagnóstico de las alteraciones de p53 en el carcinoma escamoso de cabeza y cuello (p53 en el CECC)

AUTORES/AUTHORS

M. López-Martínez (1), M. Anzola (1), N. Cuevas (1), J.M. Aguirre (2), Martínez de Pancorbo (3).

- (1) Departamento Z y Dinámica Celular A, Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco/ EHU. España.
- (2) Profesor Titular de la UPV/ EHU. Medicina Bucal, Dpto. de Estomatología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/ EHU.
- (3) Profesora Titular de la UPV/ EHU. Departamento Z y Dinámica Celular A, Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco/ EHU.

López-Martínez M, Anzola M, Cuevas N, Aguirre JM, Martínez de Pancorbo M. Aplicaciones clínicas del diagnóstico de las alteraciones de p53 en el carcinoma escamoso de cabeza y cuello (p53 en el CECC). *Medicina Oral* 2002; 7: 108-20.
© Medicina Oral. B-96689336.
ISSN 1137-2834.

RESUMEN

La alteración del gen supresor tumoral p53 confiere un riesgo enormemente elevado de desarrollar cáncer y la mutación del mismo es uno de los cambios genéticos más frecuentemente encontrados en el cáncer humano.

El carcinoma escamoso de cabeza y cuello (CECC) muestra una elevada incidencia de alteraciones en el gen supresor tumoral p53, por lo tanto parece jugar un importante papel en la patogénesis y progresión de este tipo de tumores. La pérdida de actividad de la proteína p53 puede ser debida bien a mutaciones en el gen o bien a la acción de ciertos virus que infectan la cavidad oral. La recurrencia local es la causa más común de mortalidad tras la cirugía de un CECC. En este sentido se ha observado la presencia de mutaciones del gen p53 en el tejido adyacente al tumoral siendo un buen marcador pronóstico de recurrencia. El análisis de las alteraciones del gen p53 en CECC aporta una importante información sobre el diagnóstico, pronóstico y terapia de los pacientes afectados, siendo un indicador en

Recibido: 10/06/01. Aceptado: 29/12/01.

Received: 10/06/01. Accepted: 29/12/01.

los pacientes de alto riesgo de la conveniencia de usar terapias adyuvantes más agresivas.

Palabras clave: p53, carcinoma escamoso de cabeza y cuello, papillomavirus humano, mutación.

INTRODUCCIÓN

Recientemente ha habido importantes contribuciones a la comprensión de los mecanismos tumorigénicos y los oncogenes han atraído considerable atención. No ha sido hasta finales de la década de los ochenta cuando se han puesto en evidencia los genes supresores de tumores y en un corto período de tiempo han adquirido considerable importancia. Estos genes codifican proteínas que causan disfunciones en la función normal del ciclo celular, lo cual conduce al desarrollo de neoplasias. El motivo de esta revisión es el análisis de las principales aplicaciones clínicas del análisis de uno de estos genes supresores tumorales, p53, en relación con la naturaleza específica del CECC.

P53 EN RELACIÓN CON EL CARCINOMA ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO (CECC)

Los genes supresores tumorales están implicados en diversos procesos de división celular: la regulación de la expresión génica, control del ciclo celular, programación de la muerte celular y estabilidad del genoma. La pérdida de actividad de estos genes provoca la incapacidad de respuesta a los mecanismos de control que regulan la división celular; de modo que se produce una proliferación más o menos incontrolada de la célula lo cual conduce, en ocasiones, al desarrollo de neoplasias y a la evolución de las mismas hacia procesos tumorales más agresivos (1).

El gen p53 es uno de los genes supresores tumorales más representativos. Este gen tiene múltiples funciones ya que aparece implicado no sólo en el control del ciclo celular sino también en la integridad del ADN y la supervivencia de las células expuestas a agentes que dañan el ADN. La alteración del gen p53 confiere un riesgo muy elevado de desarrollar cáncer y la mutación del mismo es uno de los cambios genómicos más frecuentes en el cáncer humano (2).

El gen supresor de tumor p53 está mutado en aproximadamente la mitad de casi todos los tipos de cánceres originados en un amplio espectro de tejidos (3). Las mutaciones de p53 se encuentran en todos los grandes grupos histopatogénicos (4-8). La Figura 1 (9) muestra la incidencia de las mutaciones de p53 en los distintos cánceres humanos entre los que se encuentra el carcinoma escamoso de cabeza y cuello (CECC).

Este tipo de cáncer muestra una alta incidencia de alteraciones en el gen supresor tumoral p53, de modo que su pérdida de funcionalidad juega un papel importante en la patogénesis y progresión del mismo (10). La sobreexpresión de proteína p53 mutante ha sido estudiada por varios autores (11-15) que detectaron inmunopositividad de la proteína p53 en un rango de 27-35% de las lesiones premalignas y de un

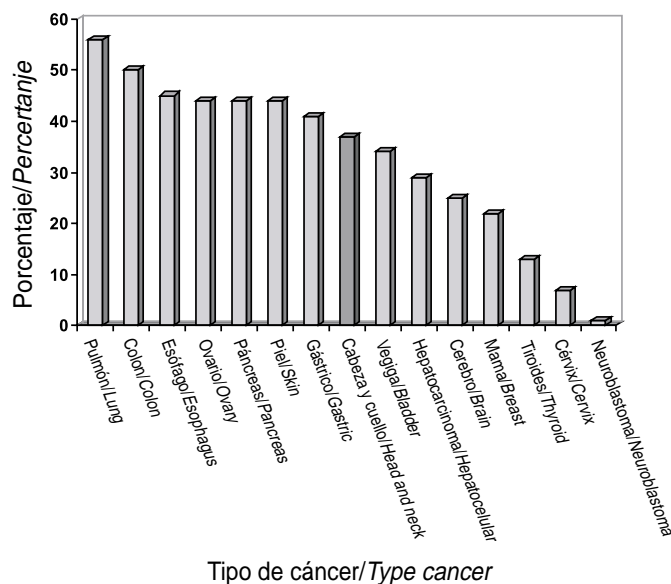


Fig. 1. Incidencia de mutaciones de p53 en cánceres humanos según los datos de Greenblatt *et al.* (1994) (9). En este estudio se evaluó la mutación de p53 con técnicas basadas en PCR. El *screening* es de los exones 5-8 de p53.

Incidence of the mutations in p53 gene in each type of human cancer (9).

33-100% de carcinomas escamosos de cabeza y cuello. El incremento en la expresión de p53 observado en estadios tempranos de CECC indica que la inactivación de p53 está implicada en la tumorigénesis de este tipo de carcinomas.

Las mutaciones del gen p53 han sido detectadas en 15-27% de lesiones orales premalignas con displasia (14, 16). Estos hallazgos sustentan la idea de que la mutación en p53 es un suceso temprano en la carcinogénesis oral. Más de la mitad de los carcinomas CECC tienen mutaciones en el gen p53 (9) lo cual indica que la mucosa oral es una de las dianas más comunes de mutación en p53 y que la disrupción de la función normal de este gen es una etapa esencial en este tipo de carcinomas.

Los CECC presentan un amplio espectro de mutaciones del gen p53, bien sea por causas endógenas o debidas a carcinógenos exógenos, como el humo del tabaco y el alcohol, que dan lugar a una proteína p53 mutante no funcional incapaz de ejercer como supresor tumoral, o bien generan una proteína truncada o degenerada que se degrada prematuramente. Tanto las mutaciones endógenas como las exógenas generan cambios específicos de determinadas bases en la secuencia de p53, de modo que el espectro de mutaciones de p53 en CECC puede proporcionar información sobre la causa específica de aparición del tumor (17).

La etiopatogenia del CECC es en general multifactorial y junto al tabaco y el alcohol, ciertos tipos de virus del papiloma humano (PVH16 y 18) también participan en el desarrollo de este tipo de cáncer (18).

Dos aspectos que caracterizan al CECC son su capacidad

de recurrencia y su naturaleza multifocal. La recurrencia local es la causa más común de fallecimiento tras la resección del carcinoma, y los CECC recurrentes producen una alta morbilidad teniendo en cuenta los efectos que causan en el habla y en la deglución. A pesar de que el estudio histológico muestre que los márgenes quirúrgicos quedan libres de células tumorales, esto no permite asegurar la no recurrencia del tumor. La presencia de alteraciones de p53 en el tejido adyacente al tumoral ha demostrado ser un buen marcador pronóstico de recurrencia (19). Esto se debe a que las alteraciones moleculares son previas a las que se pueden observar histopatológicamente en el tejido.

CARACTERIZACIÓN Y ALTERACIONES DE P53

El gen p53 está localizado en el brazo corto del cromosoma 17, banda 13 (17p13.1), tiene aproximadamente 20 kb y consta de 11 exones, siendo el primero no codificante y colocado a 8-10 kb de los exones 2-11 (20). Este gen produce un transcrito de ARNm de 2,8 kb cuyo resultado es una proteína de 53 kD que tiene 393 aminoácidos. La estructura del gen p53 y de la proteína se muestran en la Figura 2.

El 90% de las mutaciones se han localizado en los exones 5-8 del gen; aproximadamente un 20-30% de estas mutaciones se producen en los 5 codones *hot-spot* (175, 245, 248, 249 y 273) que se encuentran en estos exones. Otras alteraciones de p53 son deleciones, inserciones, mutaciones en los lugares de *splicing* y pérdidas de heterocigosidad (LOH).

El mecanismo más común de pérdida de funcionalidad de p53 es la mutación puntual de uno de los alelos y deleción del otro (21). En este sentido cabe destacar que algunas mutaciones de p53 son dominantes (22), lo cual constituye una excepción a la norma que establece que los genes supresores manifiesten su acción cancerígena sólo si se produce una alteración de ambas copias del gen. Un solo monómero proteico defectuoso procedente de la mutación de uno de los dos alelos del gen p53 es suficiente para provocar la inactivación total de la proteína tetramérica. Cuando los monómeros mutados forman complejos con los monómeros normales se forma una proteína p53 mutante cuya vida media se alarga sensiblemente (23).

Las mutaciones de p53 no son idénticas en cuanto a la manera en que afectan a la actividad y estructura de la proteína (24). Existen dos clases de mutantes de p53: mutantes de contacto que afectan a la unión específica de la proteína p53 al ADN y mutantes conformacionales que impiden que la proteína p53 adquiera su conformación activa.

DIAGNÓSTICO DE LAS ALTERACIONES DE P53

La alta incidencia de mutaciones de p53 en los cánceres humanos y las numerosas sugerencias (3, 25, 26) de varios investigadores sobre las consecuencias tanto diagnósticas como pronósticas de las mutaciones de p53, señalan la importancia de la optimización de los métodos para el diagnóstico de p53.

Inmunohistoquímica

Inmunohistoquímicamente, el diagnóstico de las alteraciones de p53 se basa en la detección de las proteínas p53 mutantes que tienen una vida media mucho más larga que la proteína de tipo salvaje (4). La determinación inmunohistoquímica es posible mediante la detección de la acumulación de p53 mutante principalmente en el núcleo celular, aunque también existen estudios que han documentado expresión citoplasmática de proteína p53 (27-29). En condiciones normales la proteína p53 se encuentra principalmente en el citoplasma, donde puede asociarse a ribosomas participando en el control de la translocación proteica (30). La sobreexpresión de p53 observada en el citoplasma celular ha sido interpretada de forma diversa: a) Errores en la técnica de inmunohistoquímica: reactividad cruzada (31, 32) o marcaje artefactual (33); b) Escape de la proteína p53 del núcleo (34); c) Determinadas conformaciones mutantes de p53 no son reconocidas por los mecanismos que se encargan del transporte de la proteína p53 al núcleo y la proteína se acumula en el citoplasma (35), de hecho la conformación que adopta la proteína p53 parece ser el mayor determinante de su localización subcelular (36); d) Unión a determinadas proteínas que estabilizan p53 en el citoplasma, por ejemplo, algunos mutantes de p53 se unen a proteínas de choque térmico (37). El complejo formado por p53 y HSP70 es uno de los mecanismos de estabilización de la proteína p53 (38).

En los casos en los que la sobreexpresión de p53 es detectada en el citoplasma la interpretación es muy subjetiva y debería ser complementada con el análisis genético de p53 para confirmar la existencia de proteína p53 mutante.

La detección de p53 en el núcleo celular es debida a una acumulación de proteína mutante pero ocasionalmente, los tumores p53 histoquímicamente positivos no portan mutaciones (26, 39). Estos falsos positivos pueden deberse a la estabilización de p53 al enlazarse a proteínas celulares como mdm2 (40, 41) o a la detección de cantidades fisiológicas de proteína p53 normal derivadas de una sobreexpresión como respuesta a daños en el ADN producidos por radiación u otros agentes (42-44).

El análisis inmunohistoquímico también puede dar lugar a falsos negativos ya que determinados tipos de mutaciones tales como, las de desfase de lectura (*frameshift*), terminación de cadena (codones *stop*) o las que afectan al correcto *splicing* del mRNA resultan en una proteína ausente o inestable inmunohistoquímicamente indetectable. Estos cambios en el gen p53 constituyen aproximadamente el 20% de las mutaciones de p53 descritas en tumores humanos (5).

La concordancia entre mutación en el gen p53 y la acumulación de la proteína codificada no es perfecta, aunque la inmunoreactividad es un indicador aproximado de los tumores con función p53 alterada (3).

La detección inmunohistoquímica de un determinado antígeno, como puede ser p53, depende de muchas variables: niveles de antígeno, afinidad del anticuerpo, duración de la incubación, sensibilidad en la detección y la fijación. El anticuerpo debe ser lo más específico posible y carecer de reactividad cruzada con otras proteínas celulares. Numerosos anticuerpos monoclonales que reconocen un epítipo generalmen-

te compartido por la proteína p53 normal y mutante han sido comercializados, aunque sus sensibilidades son variables y han sido estudiadas por varios autores (45-49).

Se han observado diferentes patrones de sobreexpresión de p53 (47) ya que algunos tumores muestran inmunopositividad en la mayoría de las células con una tinción muy intensa pero otros tumores muestran niveles de expresión de p53 variables y únicamente algunas células teñidas. En el primer caso se puede confirmar la presencia de proteína p53 mutante, sin embargo, en el segundo la interpretación es muy subjetiva teniendo en cuenta que la proteína p53 normal puede acumularse en células bajo ciertas condiciones y por otra parte la heterogeneidad intratumoral puede generar estos resultados ambiguos (48).

En conclusión, el estudio inmunohistoquímico no puede detectar todas las alteraciones de p53 en los tumores y es poco sensible en lesiones precancerosas, por tanto sería recomendable complementar el análisis inmunohistoquímico con el análisis genético con el fin de aumentar la sensibilidad y especificidad de detección de p53 alterada.

Análisis genético

Las alteraciones genéticas que surgen durante la carcinogénesis pueden ser de utilidad para la detección de células tumorales en muestras clínicas y su análisis tiene la ventaja de basarse en el material genético. El ADN es un sustrato ideal para el diagnóstico molecular porque es resistente a las condiciones adversas experimentadas por muchos especímenes clínicos, además, la cantidad de material de partida necesario es muy reducida gracias a la posibilidad de ser amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (50).

El procedimiento más habitual para el análisis genético de p53 consiste en la extracción del ADN, amplificación de los exones 4-8 del gen, donde se acumulan la mayoría de las mutaciones, y la detección de las mismas mediante la técnica SSCP (*Single Stranded Conformational Polymorphism*). La técnica SSCP se basa en el principio de que las hebras de ADN, bajo condiciones no desnaturizantes, asumen conformaciones únicas que varían según las secuencias de sus nucleótidos. El cambio de una sola base puede causar un cambio conformacional en la molécula de ADN (51). Cuando se detecta una posible mutación se realiza el subsecuente análisis de secuencia para confirmarla y determinar el cambio de bases exacto así como su posición en el gen. Existen evidencias de que no todas las mutaciones de p53 pueden detectarse por SSCP.

La concordancia de resultados entre secuenciación del ADN y técnicas inmunohistoquímicas de detección de p53 es aproximadamente del 90% (51). Por tanto, el uso combinado de ambas técnicas es el método más fiable para el estudio de las mutaciones de p53.

Recientemente se ha desarrollado un análisis rápido de las mutaciones en la secuencia del gen p53 mediante la utilización de "arrays" de sondas oligonucleotídicas (52, 53). El "array" contiene sondas oligonucleotídicas de la secuencia de p53 normal y de las secuencias mutantes más frecuentes del gen p53 (chip de p53) que hibridan o no con la secuencia

de p53 del ADN tumoral según esté o no mutado. La técnica de los chips de p53 presenta las siguientes ventajas respecto a la secuenciación: es más rápida, más sensible en la detección de mutaciones y permite el análisis de una gran cantidad de muestras clínicas en un único experimento (54).

Análisis de papilomavirus oncogénicos

Las mutaciones no son los únicos mecanismos que pueden hacer perder la función normal de la proteína p53. La oncoproteína E6 sintetizada por los papilomavirus humanos asociados a tumor (PVH-16 y PVH-18) se enlaza a la proteína p53 e induce su degradación vía ubiquitina (55). Esto es especialmente importante en el carcinoma escamoso de cabeza y cuello (CECC) cuyas superficies mucosas están expuestas a PVH (18). La detección de PVH en muestras clínicas se basa en un método PCR con una panel de "primers" oligonucleotídicos localizados en la región altamente conservada L1 del genoma de PVH y posterior tipaje del oncovirus mediante hibridación específica o secuenciación (56).

El gen p53 es polimórfico en el codón 72 del exón 4, pudiendo codificar un residuo de prolina o de arginina en dicha posición. Storey *et al.* (57) demostraron que el fenotipo p53 arginina es más susceptible a la degradación por la oncoproteína E6 de PVH que el fenotipo prolina. Por tanto, los individuos con el fenotipo arginina tienen un factor de riesgo añadido en el desarrollo de cánceres asociados a PVH. El polimorfismo prolina/arginina de los tumores puede ser detectado usando un análisis de PCR que detecta específicamente el genotipo del codon 72 en el exón 4 del gen p53.

Otro virus que está relacionado con el CECC es el virus Epstein-Barr que codifica la proteína EBNA-5 capaz de inducir la degradación de p53 (58).

El gen del antígeno T del virus SV40 y el E1B de los adenovirus codifican proteínas capaces de unirse a la proteína p53 (59) causando la pérdida de actividad de la misma (60) pero no ha sido descrito el mecanismo por el cual se produce esta inactivación, como sucede con la oncoproteína E6 de los HPV (61). Por otra parte, no se ha establecido ninguna relación entre estos virus y el carcinoma escamoso de cabeza y cuello y además no se ha demostrado que SV40 sea un oncovirus humano (62, 63).

APLICACIONES CLÍNICAS DEL DIAGNÓSTICO DE LAS ALTERACIONES DE P53

Detección precoz y de recurrencia

Actualmente, el conocimiento sobre las alteraciones genéticas que potencian la iniciación del cáncer puede facilitar la detección precoz de los tumores primarios y de las posibles recurrencias lo cual puede determinar el éxito en su tratamiento.

La cirugía continúa siendo el tratamiento más eficaz para la mayoría de los tumores primarios en el CECC, pero a menudo, las células tumorales se extienden más allá de los

márgenes quirúrgicos y pueden evadir la detección microscópica (50). Se ha realizado un estudio donde se usaron mutaciones específicas de p53 para identificar las células infiltrantes de tumores escamosos de cabeza y cuello en los márgenes quirúrgicos tras la extirpación de los bordes (64). Aproximadamente el 50% de los pacientes mostró células tumorales portadoras de la misma mutación que el tumor primario en márgenes aparentemente libres de tumor o nódulos linfáticos. Pese al tratamiento con radioterapia, más de un tercio de los pacientes recidivó, desarrollando a menudo nuevos tumores adyacentes a/o dentro del área identificada como positiva por el análisis molecular.

Gainly *et al.*, (65) analizaron las alteraciones del gen p53 y la infección por PVH en 22 tumores recurrentes de pacientes tratados con radioterapia y/o cirugía encontrando una alta incidencia de mutaciones de p53 en los CECC recurrentes (68%) y una infección por PVH de un 38% de modo que la mutación de p53 y la infección por PVH no son mecanismos excluyentes de inactivación de p53. Los tumores CECC recurrentes presentaban un alto índice de inactivación de p53 aunque cabe la posibilidad de que sea el tratamiento con radioterapia el inductor de estas mutaciones ya que la radiación es un potente agente capaz de dañar el ADN.

Por otro lado, en este tipo de cáncer es especialmente difícil identificar el tumor CECC primario cuando un paciente sólo presenta un nódulo linfático metastático. Los análisis moleculares han demostrado ser de utilidad incluso en los casos en que las biopsias al azar de la cavidad oral e hipofaringe no revelaron el foco maligno primario (66). En estudios preliminares se observó que en 6 de 10 pacientes con CECC, al menos una de las biopsias orales tenía los mismos cambios genéticos que habían sido identificados en las metástasis. En dos de los casos el tumor primario se reprodujo en los lugares anatómicamente predichos por el análisis molecular.

Recientemente se están realizando análisis moleculares en saliva para detectar células tumorales en pacientes con CECC (67). Este estudio ha demostrado que el análisis molecular de las células escamosas desprendidas de la mucosa oral puede ser un método de detección fiable y poco agresivo para pacientes con riesgo de desarrollar un primer CECC, pacientes con lesiones premalignas (leucoplasias) y para el seguimiento de pacientes con riesgo de desarrollar un segundo primario o una recurrencia.

Pronóstico

Boyle *et al.*, (68) estudiaron la correlación entre las mutaciones de p53 y la progresión del cáncer de cabeza y cuello y concluyeron que la incidencia de mutaciones p53 en lesiones no invasivas era del 19% (7/37) y se incrementa a 43% (28/42) en carcinomas invasivos. Estos datos sugieren que las mutaciones p53 pueden preceder a la invasión en el cáncer primario de cabeza y cuello, ocurren en algunas lesiones tempranas y se incrementan en relación con la invasividad, de manera que es la acumulación, y no necesariamente el orden de los errores genéticos lo que determina la progresión del cáncer.

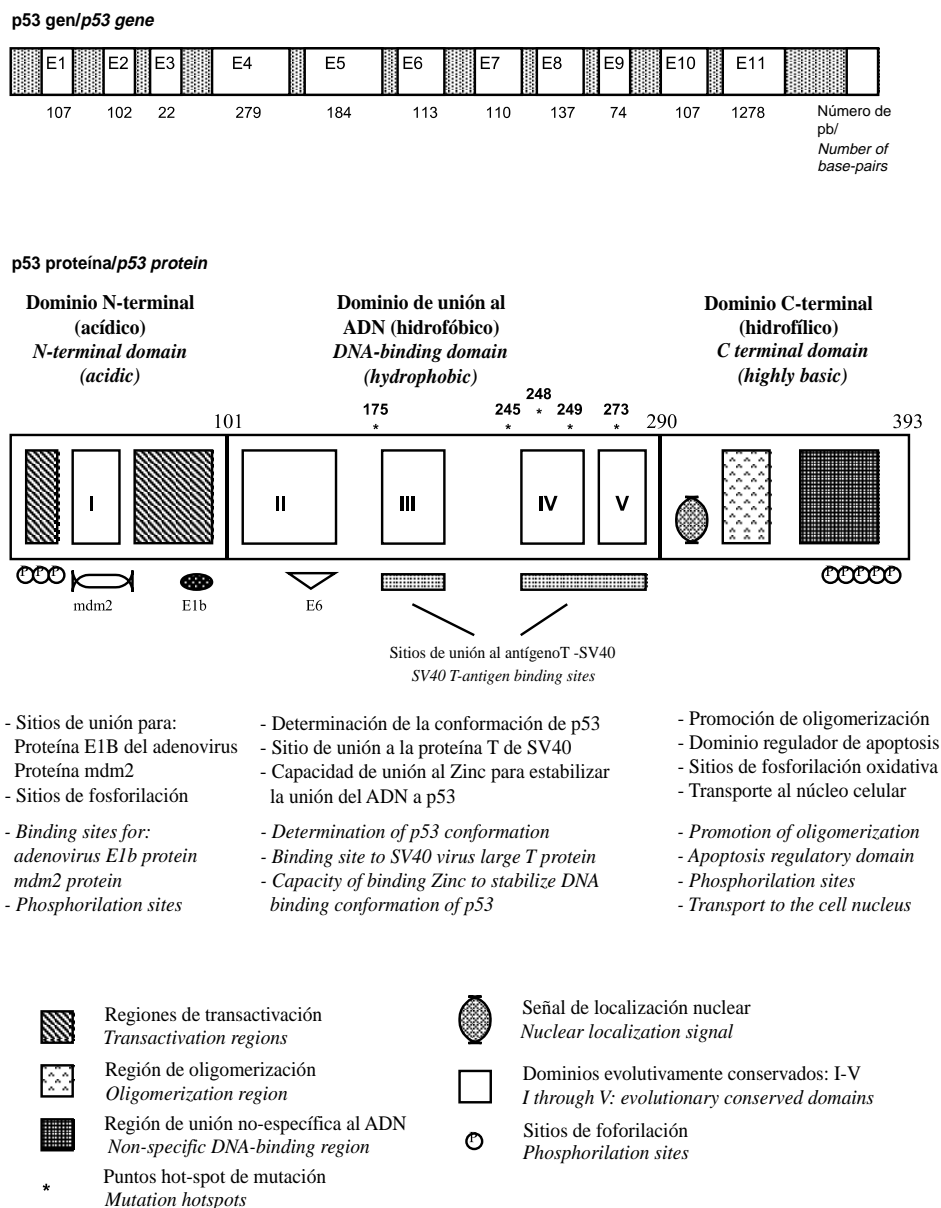


Fig. 2.
Estructura del gen p53 y de la proteína p53.
Structure of the p53 gene and protein.

El estudio de la evolución tanto de las lesiones premalignas como de los CECC en relación con la alteración de p53, con el fin de evaluar su capacidad como marcador pronóstico, ha sido abordado por varios autores con diferentes resultados. Los estudios de sobreexpresión de p53 en CECC realizados por Girod *et al.*, (69) y Chiang *et al.*, (70) muestran la correlación entre la sobreexpresión de p53 y un menor índice de supervivencia en este tipo de carcinomas. Yao *et al.*, (71) observaron que la expresión de proteína p53 mutante estaba relacionada con la mayor agresividad de los CECC estudiados. Koch *et al.*, (72) llevaron a cabo un estudio genético de

p53 en pacientes CECC tratados y observaron una fuerte relación entre las mutaciones en p53 y la recurrencia locoregional del tumor que disminuía la supervivencia del paciente. Lee *et al.*, (73) estudiaron el valor predictivo de varios marcadores histopatológicos y biológicos en relación con el desarrollo de leucoplasias orales a carcinomas, llegando a la conclusión de que la combinación de la expresión de p53 junto con otros marcadores era capaz de predecir el desarrollo hacia carcinoma de la mayoría de las leucoplasias. En cambio otros estudios (74) concluyen que ni la estabilización de p53 detectada por inmunohistoquímica ni el análisis genético de las

mutaciones de p53 permiten predecir el desarrollo de una leucoplasia.

El principal problema que afecta al pronóstico y tratamiento de los pacientes de CECC es la presencia de múltiples tumores primarios, secundarios y recurrentes. Nees *et al.*, (75) estudiaron la sobreexpresión y mutación de p53 en tumores distantes del epitelio de pacientes con CECC. Estos análisis de biopsias de tumores distantes mostraron una topografía marcadamente discontinua y multifocal de las células que expresaban p53 aberrante, tanto en estudios inmunohistoquímicos como genéticos (SSCPs y secuenciación del ADN), y por tanto, muy indicativos de un proceso multifocal y policlonal. Este concepto fue bien confirmado por la presencia de mutaciones de p53 diferentes en tumores primarios y secundarios (76). Estos hallazgos sustentan el concepto de "cancerización de campo" donde pueden surgir múltiples tumores independientemente en un área sometida a factores carcinogénicos comunes. Por tanto, la presencia de mutaciones de p53 en los tejidos que rodean al tumor, y en consecuencia la identificación de pacientes con alto riesgo de desarrollar tumores adicionales, mejorará el pronóstico de estos pacientes.

Por otra parte, la determinación del estatus ganglionar es crítica para estimar el estadio preciso de los tumores y para tomar decisiones referentes a su tratamiento. Los marcadores moleculares son de utilidad para el seguimiento de la migración de las células tumorales localmente o en la corriente sanguínea. A la vista de que los primeros estudios demostraron que los pacientes de cáncer tienen grandes cantidades de ADN circulante en suero o plasma (77, 78), las muestras sanguíneas también fueron analizadas. En el 29% de 21 pacientes con CECC se detectó ADN tumoral en el suero o plasma (79); los pacientes positivos tenían tumores mayores y con peor pronóstico.

Terapia

Selección de la terapia en función del diagnóstico de p53

El uso potencial del análisis inmunohistoquímico y genético es importante para la toma de decisiones de tratamiento. La acumulación de la proteína p53 ha demostrado ser un marcador independiente de una reducida supervivencia en los pacientes; de modo que en estos casos sería adecuado el uso de una terapia más agresiva (80).

En los CECC la resistencia al tratamiento con quimioterapia parece estar relacionado con la pérdida de funcionalidad de p53 (81). La proteína p53 mutante es incapaz de inducir apoptosis celular por agentes citotóxicos. El uso de la quimioterapia, cisplatino y fluorouracilo, es frecuente en este tipo de carcinomas para acentuar la respuesta del tumor antes de la cirugía o radioterapia. Temam *et al.*, 2000 (82) estudiaron como la inactivación de p53 puede predecir la respuesta del tumor a la inducción de la quimioterapia en pacientes con CECC y encontraron que las mutaciones en el gen p53 están estrechamente relacionadas con una escasa respuesta a la qui-

mioterapia. Además, las mutaciones de contacto de p53 producen una peor respuesta al platino y el fluorouracilo y por tanto un peor pronóstico del paciente. También la radiosensibilidad de un tumor está asociada a la existencia de un gen supresor tumoral p53 intacto, mientras que la radiorresistencia se asocia a una pérdida de función del gen p53 (83).

Nuevas terapias basadas en p53

Si la proteína p53 normal es capaz de parar el crecimiento de las células tumorales, el uso de la terapia génica para introducir el gen p53 sano dentro de los tumores podría tener un efecto potencialmente terapéutico. De hecho se ha observado que la tranfección del gen p53 salvaje puede inhibir no sólo el crecimiento de las células tumorales sino el propio potencial tumorigénico de la célula en una gran variedad de líneas celulares cancerosas que presentaban cambios genéticos relacionados con la carcinogénesis (84-86).

Las terapias utilizadas hasta ahora en el carcinoma escamoso de cabeza y cuello a menudo causan gran morbilidad y no han conseguido un aumento significativo de la supervivencia de los pacientes en los últimos 30 años. Sin embargo, estudios preclínicos han demostrado que un vector adenoviral con un inserto del gen p53 salvaje (Ad-p53) es capaz de inducir apoptosis en células cancerígenas además de una disminución de la proliferación celular sin afectar en ningún modo a las células normales (87-89). Se ha confirmado que Ad-p53 reduce el crecimiento tumoral en modelos xenógrafos de CECC y otros tipos de tumores (90). Por otro lado, el vector Ad-p53 es capaz de potenciar las terapias tradicionales, es decir, la radioterapia y la quimioterapia (91-93).

La mejora en un futuro de la terapia génica incluye su combinación terapéutica con agentes citotóxicos y/o radiación como sugiere el aumento del efecto antitumoral que producen tratamientos combinados en modelos preclínicos.

Por otro lado, actualmente se están desarrollando drogas que bloquean la división de las células cancerosas imitando el efecto inhibitorio que produce la proteína p53 en el ciclo celular al actuar como un supresor tumoral (94). Así, la restauración de las funciones del gen p53 sano parece ser una vía esperanzadora en cuanto a la terapia génica del cáncer, pero estas opciones terapéuticas están aún en estudio y sólo el tiempo permitirá saber si tienen aplicación clínica.

CONCLUSIÓN

La nueva biología molecular y genética ha revolucionado nuestro conocimiento de la iniciación y progresión del cáncer humano. La identificación de estos cambios genéticos ha proporcionado un conjunto de marcadores moleculares y test que pueden redefinir los criterios para el diagnóstico del cáncer y abrir nuevas posibilidades para su detección precoz. De este modo, el análisis de las alteraciones de p53 en CECC proporciona una importante información sobre el diagnóstico, pronóstico y terapia de los pacientes afectados por esta enfermedad.

Clinical applications of the diagnosis of p53 alterations in squamous cell carcinoma of the head and neck

SUMMARY

Alteration of the p53 tumor suppressor gene implies an extremely high risk of developing malignancy, and mutation of the gene is one of the most frequent genetic changes found in human cancer. Squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) shows a high incidence of p53 tumor suppressor gene alterations; the latter therefore appears to play an important role in the pathogenesis and progression of such neoplasms. The loss of p53 protein activity may be due to many p53 gene mutations or to the action of certain viruses that infect the oral cavity. Local recurrence is the most common cause of mortality after SCCHN surgery; in this sense, p53 gene mutations have been observed in tissue adjacent to the tumor, and constitute a good prognostic marker of tumor recurrence. The analysis of p53 tumor suppressor gene alterations in SCCHN affords important information on the diagnosis, prognosis and treatment of affected patients – such alterations representing an indicator in high risk patients of the convenience of applying more aggressive adjuvant therapies.

Key words: p53, squamous cell carcinoma of the head and neck, human papillomavirus (HPV), mutation.

INTRODUCTION

In recent years there have been important advances in our understanding of the mechanisms underlying the development of tumors, and in this sense considerable attention has focused on the role played by oncogenes. It was not until the late eighties when the existence of tumor suppressor genes was established, and in a short period of time these genes have grown considerably in importance. In this sense, altered tumor suppressor genes are known to encode for proteins that cause dysfunctions in the normal cell cycle, thereby leading to the development of neoplasms. The present review analyzes the main clinical applications of one such tumor suppressor gene (p53), in relation to squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN).

P53 IN RELATION TO SCCHN

Tumor suppressor genes are implicated in different cell division processes, including the regulation of gene expres-

sion, control of the cell cycle, the programming of cell death and stability of the genome. The loss of activity of these genes leads to dysfunction of the mechanisms controlling cell division, with the induction or more or less uncontrolled cellular proliferation, which in some cases leads to the development of neoplasms and the evolution towards more aggressive tumor processes (1).

The p53 gene is one of the most representative tumor suppressor genes. It possesses multiple functions, since it appears to be implicated not only in control of the cell cycle but also in DNA integrity and the survival of cells exposed to DNA-damaging agents. Alterations in the p53 gene imply a very high risk of developing cancer, and its mutation constitutes one of the most frequently identified genomic changes in human cancer (2).

The p53 tumor suppressor gene is found to have mutated in about half of almost all types of tumors arising in a wide range of tissues (3). In effect, p53 mutations are found in all the major histopathogenic groups (4-8). Figure 1 shows the incidence of p53 mutations in different human cancers, including SCCHN (9).

SCCHN shows a high incidence of p53 suppressor gene alterations; consequently, the loss of p53 functionality plays an important role in the pathogenesis and progression of these malignancies (10). The overexpression of mutant p53 protein has been studied by a number of authors (11-15), who have detected p53 protein immunopositivity in 27-35% of pre-malignant lesions and in 33-100% of SCCHN. The increased p53 expression detected in early-stage SCCHN indicates that p53 gene inactivation is implicated in the genesis of these carcinomas.

P53 gene mutations have been detected in 15-27% of all premalignant oral lesions exhibiting dysplasia (14,16). These findings support the idea that p53 mutation is an early event in oral carcinogenesis. Over half of all SCCHN exhibit p53 gene mutations (9) – indicating that the oral mucosa is one of the most common targets of such mutations, and that disruption of the normal function of this gene is an essential step in the development of such carcinomas.

SCCHN show a broad spectrum of p53 mutations, resulting from the action of endogenous factors or exogenous carcinogenic influences such as tobacco smoke and alcohol, which yield a mutant, non-functional p53 protein unable to act as a tumor suppressor, or alternatively generating a truncated or altered protein that quickly degenerates. Both endogenous and exogenous p53 mutations in SCCHN can provide information on the specific cause underlying development of the tumor (17).

The pathogenesis of SCCHN is generally multifactorial, and in addition to tobacco and alcohol, certain viruses such as human papillomaviruses (HPV types 16 and 18) are also known to play a role in the development of this type of cancer (18).

Two important characteristics of SCCHN are its capacity to recur and its multifocal nature. In effect, local recurrence is the most common cause of mortality after surgical resection of the carcinoma, and recurrent SCCHN produce great

morbidity due to their effects upon speech and swallowing. Furthermore, although the histological study of the surgical piece may show the resection margins to be free of malignant cells, recurrence cannot be ruled out. The detection of p53 alterations in the apparently healthy tissue adjacent to the tumor has been shown to be a good prognostic marker of recurrence (19). This is because alterations at molecular level characteristically precede histologically identifiable changes at tissue level.

CHARACTERIZATION AND ALTERATIONS OF P53

The p53 gene is located on the short arm of chromosome 17, band 13 (17p13.1), and consists of about 20 kbp, with 11 exons – the first being non-codifying and located at a distance of 8-10 kbp from exons 2-11 (20). The transcription of this gene yields a 2.8 kbp messenger RNA (mRNA) that ultimately leads to the synthesis of a 53 kDa protein composed of 393 amino acids. The structure of the p53 gene and its protein are shown in Figure 2.

Ninety percent of the mutations of the gene have been located in exons 5-8, while approximately 20-30% of these mutations occur in the five so-called “hot-spot” codons (175, 245, 248, 249 and 273) that are found in these exons. Other p53 gene alterations comprise deletions, insertions, mutations at the splicing sites, and loss of heterozygosis (LOH).

The most common mechanism underlying the loss of p53 functionality is a point mutation of one allele, with deletion of the other (21). In this sense, it should be pointed out that some p53 mutations are dominant (22) – this constituting an exception to the rule whereby suppressor genes manifest carcinogenic action only if both copies of the gene are altered. A single defective protein monomer arising from the mutation of one of the two p53 alleles suffices to totally inactivate the corresponding tetrameric protein product. When the mutant monomers form complexes with the normal monomers, a mutant p53 protein results with a considerably prolonged half-life (23).

P53 mutations are not identical regarding the way in which they affect the activity and structure of the protein (24). There are two classes of p53 mutants: contact mutants that affect specific binding of p53 protein to DNA, and conformational mutants that prevent the p53 protein from acquiring its active conformation.

DIAGNOSIS OF P53 ALTERATIONS

The high incidence of p53 mutations in human cancers, and the many suggestions made by different investigators (3,25,26) regarding the diagnostic as well as prognostic consequences of such mutations attest to the importance optimizing the diagnosis of p53 alterations.

Immunohistochemistry

Immunohistochemically, the diagnosis of p53 alterations is based on the detection of mutant p53 proteins with a much

longer half-life than the wild variant of the protein (4). Immunohistochemical diagnosis is possible by detecting the accumulation of mutant p53 mainly in the cell nucleus, though some studies have also documented cytoplasmic expression of p53 protein (27-29). Under normal conditions, p53 protein is found mainly in the cytoplasm, where it can combine with ribosomes to participate in the control of protein translocation (30). P53 overexpression within the cytoplasm has been interpreted in different ways: (a) As an immunohistochemical technical error (crossed reactivity (31,32) or artifactual labeling (33)); (b) As the escape of p53 protein from the nucleus (34); (c) As a phenomenon whereby certain mutant p53 conformations are not recognized by the mechanisms in charge of p53 protein transport to the nucleus – thus resulting in protein accumulation within the cytoplasm (35). In fact, the structural conformation adopted by p53 protein appears to be the main determinant factor in deciding its subcellular location (36); and (d) As the binding to certain proteins that stabilize p53 within the cytoplasm, e.g., some p53 mutants bind to heat shock proteins (HSP) (37). In this context, the complex formed by p53 and HSP70 is one of the established p53 stabilization mechanisms (38).

In those cases where p53 overexpression is detected in the cytoplasm, the interpretation is highly subjective, and should be complemented by p53 genetic analysis to confirm the existence of mutant p53 protein. On the other hand, the detection of p53 in the cell nucleus is due to an accumulation of mutant protein, though occasionally p53 histochemically positive tumors do not present mutations (26,39). These false positive results may be due to p53 stabilization upon binding to cell proteins such as mdm2 (40,41), or the detection of physiological amounts of normal p53 protein derived from over-regulation in response to DNA damage caused by radiation or other agents (42-44).

Immunohistochemical analysis may also give rise to false negative results, since certain alterations such as frameshift or stop codon mutations, or mutations affecting correct mRNA splicing, give rise to absent protein or unstable and immunohistochemically undetectable protein. These p53 gene alterations account for approximately 20% of p53 mutations in human tumors (5).

Concordance between gene p53 mutation and accumulation of the encoded protein is not perfect, though immunoreactivity affords an approximate indication of those tumors with altered p53 function (3). The immunohistochemical detection of a certain antigen (e.g., p53) depends on many variables, including antigen levels, antibody affinity, the duration of incubation, detection sensitivity and fixation. The antibody used should be as specific as possible and should lack cross-reactivity with other cellular proteins. Many antibodies that recognize an epitope generally shared by the normal and mutant p53 protein have been commercialized, though the corresponding sensitivities vary (45-49).

Different p53 over-expression patterns have been described (47), since some tumors exhibit immunopositivity in

most cells, with very intense staining, while others show variable p53 expression, with the staining of only some cells. In the former case the presence of mutant p53 protein can be confirmed, though in the latter interpretation is highly subjective, taking into account that normal p53 protein can accumulate in cells under certain conditions, and that intratumor heterogeneity can also generate such ambiguous results (48).

In conclusion, immunohistochemical studies cannot detect all p53 alterations in tumors, and moreover offer limited sensitivity in application to precancerous lesions. Consequently, immunohistochemical study should be complemented by a genetic analysis to increase the sensitivity and specificity of altered p53 detection.

Genetic analysis

The genetic alterations that arise during carcinogenesis may be useful for detecting tumor cells in clinical samples, and their analysis has the advantage of being based on genetic material. In this context, DNA is an ideal substrate for molecular diagnosis, since it is resistant to the adverse conditions to which many clinical specimens are exposed, and moreover very little starting material is required thanks to the amplification possibilities offered by polymerase chain reaction (PCR) techniques (50).

The most common procedure for p53 genetic analysis consists of DNA extraction, followed by amplification of p53 gene exons 4-8 where most mutations are located, and their detection by the single-stranded conformational polymorphism (SSCP) technique. This principle is based on the fact that under non-denaturalizing conditions the DNA strands adopt unique conformations that vary according to their corresponding nucleotide sequences. In this context, the change of a single base can cause a conformation modification of the DNA molecule (51). When a possible mutation is detected, the corresponding sequence analysis is performed for confirmation purposes and to determine the precise base changes and their position within the gene. Evidence suggests that not all p53 gene mutations can be detected by SSCP, however. On the other hand, the concordance between DNA sequencing studies and immunohistochemical techniques in detecting p53 is about 90% (51). Consequently, the combined use of both techniques is the most reliable approach for investigating p53 gene mutations.

Recently, a rapid analysis of p53 gene sequence mutations has been developed, based on the use of oligonucleotide probe arrays (52,53). These arrays contain oligonucleotide probes of the normal p53 sequence and of the sequences of the most frequent mutations of the p53 gene (p53 chip) that either do or do not hybridize with the p53 sequence of tumor DNA, depending on whether the latter is mutated or not. The p53 chip technique offers a number of advantages over sequencing: in effect, it is faster, more sensitive in detecting mutations, and allows the analysis of a large number of clinical samples in a single experiment (54).

Analysis of oncogenic papillomavirus

Mutations are not the only mechanism that can lead to the loss of normal p53 protein function. Oncoprotein E6, synthesized by human tumor-associated papillomaviruses (HPV types 16 and 18), binds to protein p53 and induces its degradation via ubiquitin action (55). This is particularly important in SCCHN, where the mucosal surfaces are exposed to HPV (18). The detection of HPV in clinical samples is based on a PCR method comprising a panel of oligonucleotide primers located in the highly preserved L1 region of the HPV genome, with posterior oncoviral typing by specific hybridization or sequencing (56).

The p53 gene is polymorphic in codon 74 of exon 4, and can encode for either proline or arginine at that position. Storey et al. (57) showed the p53 arginine phenotype to be more susceptible to degradation by HPV oncoprotein E6 than the proline phenotype. Consequently, individuals with the arginine phenotype have an added risk factor for the development of HPV-associated cancers. Proline/arginine polymorphism of the tumors can be detected by PCR, which specifically identifies the genotype of codon 72 in exon 4 of the p53 gene.

Another virus related to SCCHN is the Epstein-Barr virus (EBV), which encodes for EBNA-5, a protein capable of inducing p53 degradation (58). In turn, the T antigen gene of the SV40virus, and E1B of the adenoviruses, encode for proteins that can bind to p53 protein (59) and cause its inactivation (60) – though the mechanism responsible for such inactivation has not been established as in the case of the HPV oncoprotein E6 (61). On the other hand, no relation has been defined between these viruses and SCCHN, and SV40 has not been shown to be a human oncovirus (62,63).

CLINICAL APPLICATIONS OF THE DIAGNOSIS OF P53 ALTERATIONS

Early detection of recurrence

Current knowledge of the genetic alterations that promote carcinogenesis may facilitate the early detection of primary tumors and their possible recurrences – thereby deciding treatment success. In this context, surgery remains the most effective management approach for most primary SCCHN, though the tumor cells often extend beyond the actual resection margins and can evade microscopic detection (50). A study has been made using specific p53 mutations to identify the infiltrating cells of SCCHN in the surgical margins following resection (64). Approximately 50% of the patients studied had tumor cells that carried the same mutation as the primary tumor in apparently tumor-free margins or lymph nodes. Despite treatment with radiotherapy, over one third of cases recurred, often developing new tumors adjacent to or within the area identified by molecular analysis as being mutation-positive.

Recently, Gainly et al. (65) analyzed the p53 gene alterations and HPV infections in 22 recurrent tumors of patients

subjected to radiotherapy and/or surgery. They found a high incidence of p53 mutations in the recurrent SCCHN (68%), with HPV infection in 38% of cases. Consequently, p53 mutation and HPV infection are not mutually excluding p53 inactivation mechanisms. The recurrent SCCHN showed a high p53 inactivation index, though the possibility exists that radiotherapy may have induced such mutations, since it exerts a marked DNA damaging effect.

On the other hand, in these malignancies it is particularly difficult to identify the primary SCCHN when a patient only presents a metastatic lymph node. Molecular analyses have shown their usefulness even in cases where random biopsies of the oral cavity and hypopharynx fail to reveal the primary malignancy (66). Preliminary studies have shown that in 6 out of 10 patients with SCCHN, at least one of the oral biopsies exhibited the same genetic changes identified in the metastases. In two cases the primary lesion recurred in the anatomical locations predicted by molecular analysis.

Molecular analyses have recently been introduced in application to saliva to detect tumor cells on patients with SCCHN (67). This study showed molecular analysis of the squamous cells shed from the oral mucosa to be a reliable and noninvasive method for patients at risk of developing a first SCCHN, patients with premalignant lesions (leukoplakia), and for the follow-up of individuals susceptible to developing a second primary lesion or recurrence.

Prognosis

In 1993, Boyle et al. (68) studied the correlation between p53 mutation and the progression of head and neck cancer. These authors found the incidence of p53 mutations in noninvasive lesions to be 19% (7/37) – a figure that increased to 43% (28/42) in the case of invasive carcinomas. These data suggest that p53 mutations may precede infiltration in primary cancer of the head and neck, developing in certain early lesions and increasing their presence with invasiveness; as a result, the accumulation of genetic errors - not necessarily their order or sequence - may be the determining factor in cancer progression.

The evolution of both premalignant lesions and SCCHN in relation to p53 alteration with the aim of assessing its potential as a prognostic marker has been investigated by a number of authors, with different results. The SCCHN p53 over-expression studies by Girod et al. in 1998 (69), and Chiang et al. in 1999 (70), point to a correlation between p53 over-expression and diminished patient survival in these carcinomas. Yao et al., in 1999 (71) in turn found mutant p53 expression to be related to increased aggressiveness of the SCCHN studied. Koch et al. in 1996 (72) conducted a p53 genetic study in patients with treated SCCHN, and reported a strong association between p53 mutation and locoregional tumor recurrence – which led to reduced patient survival. Lee et al. in 2000 (73) investigated the predictive value of various histopathological and biological markers in relation to oral leukoplakia progression to carcinoma. They concluded that the

combination of p53 expression and the presence of other markers is able to predict the progression to carcinoma of most leukoplakias. In contrast, other studies (74) found that neither the stabilization of immunohistochemically detected p53 nor the genetic analysis of p53 mutations allows prediction of the evolution of leukoplakia.

The main problem facing the prognosis and treatment of SCCHN is the presence of multiple primary, secondary and recurrent lesions. Nees et al. in 1993 (75) investigated p53 over-expression and mutation in tumors distant from the epithelium among patients with SCCHN. These analyses of distant tumor biopsies revealed a markedly discontinuous and multifocal topographic distribution of the cells expressing aberrant p53, in both immunohistochemical and genetic studies (SSCP and DNA sequencing) – thus pointing to the existence of a multifocal and polyclonal process. This concept was reinforced by the presence of different p53 mutations detected in primary and secondary tumors (76). Such observations support the “field cancerization” concept whereby multiple tumors can develop independently in a given area exposed to common carcinogenic factors. Thus, the presence of p53 mutations in the tissues surrounding the tumor, and consequently the identification of patients at a high risk of developing additional malignancies would contribute to improve the prognosis.

On the other hand, the determination of lymph node status is essential for precise tumor staging and for drawing conclusions regarding treatment. Molecular markers are useful for following tumor cell migration locally or in the bloodstream. Considering that early research showed cancer patients to have large amounts of circulating DNA in serum or plasma (77,78), blood samples have also been investigated. Accordingly, in 29% of 21 patients with SCCHN, tumor DNA was detected in serum or plasma (79), and positive patients had larger tumors and a poorer prognosis.

Therapy

Selection of management according to p53 diagnosis

The potential application of immunohistochemical and genetic analyses is important for deciding therapy. The accumulation of p53 protein has been shown to constitute an independent indicator of reduced patient survival. In cases where this marker is found to be positive, a more aggressive therapeutic approach would thus be indicated (80).

In SCCHN, resistance to chemotherapy seems to be related to p53 functionality loss (81). The mutant p53 protein is unable to induce cell apoptosis in response to cytotoxic agents. The use of chemotherapy (cisplatin and fluorouracil) is common in such carcinomas to accentuate tumor response before surgery or radiotherapy. Temam et al. in 2000 (82) studied the way in which p53 inactivation may predict tumor response to chemotherapy induction on patients with SCCHN. These authors found p53 gene mutations to be closely related to poor response to chemotherapy. Moreover, p53 contact mutations yield a poorer response to platinum drugs and fluo-

rouracil, and therefore a worse prognosis. Tumor radiosensitivity is also associated with the existence of an intact p53 tumor suppressor gene, while radioresistance is associated with a loss of p53 gene function (83).

New p53-based therapies

If normal p53 protein is able to arrest tumor cell growth, the application of gene therapy to introduce healthy p53 gene in tumors could have a potential therapeutic effect. In fact, transfection of the wild p53 gene has been shown to inhibit not only tumor cell growth but also the actual carcinogenic potential of the cell in a large variety of cancer cell lines exhibiting genetic changes related to tumor genesis (84-86).

The therapies used to date in application to SCCHN often produce great morbidity, with no significant improvement in patient survival in the past 30 years. However, preclinical studies have shown that an adenoviral vector containing a wild p53 gene insert (Ad-p53) is able to induce cancer cell apoptosis, thereby confirming that Ad-p53 reduces tumor growth in xenograph models of SCCHN and other types of tumors (90). On the other hand, the Ad-p53 vector is able to enhance traditional treatments, i.e., radio- and chemotherapy (91-93).

The future development of gene therapy includes its therapeutic combination with cytotoxic agents and/or radiation, as suggested by the increased antitumor action of combined treatment approaches in preclinical models.

On the other hand, drugs are currently being developed that block cancer cell division, imitating the inhibitory action of p53 protein upon the cell cycle by acting as tumor sup-

pressors (94). Thus, restoration of healthy p53 gene function seems to be a promising approach in relation to the genetic therapy of cancer - though these options are still in the research stages, and only time will tell whether clinical applications can be found for them.

CONCLUSION

Recent developments in molecular biology and genetics have had a dramatic effect upon our knowledge of the initiation and progression of human cancer. The identification of the underlying genetic changes has yielded a series of molecular markers and tests that may redefine our criteria for cancer diagnosis and offer new perspectives for early detection. In this way, analysis of p53 alterations in squamous cell carcinoma of the head and neck provides important information relating to the diagnosis, prognosis and treatment of affected patients. In this context, the present review has offered an analysis of the main clinical applications of p53 diagnosis in relation to the specific nature of SCCHN.

CORRESPONDENCIA/CORRESPONDENCE

Dra. Marian Martínez de Pancorbo
Dpto. Z y Dinámica Celular
Facultad de Farmacia
Universidad del País Vasco
Paseo de la Universidad, 7
01006-Vitoria-Gasteiz
Fax: 945013014
E-mail: gcpmagom@lg.ehu.es

BIBLIOGRAFÍA/REFERENCES

- Weinberg RA. Tumor suppressor gene. *Science* 1991; 254: 1138-46.
- Rosell R. Molecular origins of human cancer. En: Rosell R, Abad A, Monzó M, Barnadas A. Manual de oncología clínica y molecular. Badalona, 2000. p. 1-15.
- Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor suppressor gene. *N Engl J Med* 1993; 329: 1318-26.
- Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991; 351: 453-6.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. P53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253: 49-53.
- Chang F, Syrjanen S, Kurvinen K, Syrjanen K. The p53 tumor suppressor gene as a common cellular target in human carcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 1993; 88: 174-86.
- Chang F, Syrjanen S, Tervahauta A, Syrjanen K. Tumorigenesis associated with the p53 tumor suppressor gene. *Br J Cancer* 1993; 68: 653-61.
- Levine AJ, Perry ME, Chang A, Silver A, Dittmer D, Wu M. The 1993 Walter Hubert Lecture: The role of the p53 tumor suppressor gene in tumorigenesis. *Br J Cancer* 1994; 69: 409-16.
- Greenblatt MS, Bennet WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 4855-78.
- Snow GB. Evaluating and staging of the patient with head and neck cancer. New York: Churchill Livingstone, 1989. p. 17-38.
- Somers KD, Merrick MA, López ME, Incognito LS, Schechter GL, Casey G. Frequent p53 mutations in head and neck cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 5997-6000.
- Shin DM, Kim J, Ro JY, Hittelman J, Roth JA, Hong WK. Activation of p53 gene expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 321-6.
- Crosthwaite N, Teale D, Franklin C, Foster GA, Stringer BM. P53 protein expression in malignant, pre-malignant and non-malignant lesions of the lip. *J Clin Pathol* 1996; 49: 648-53.
- Kusama K, Okutsu S, Takeda A, Himiya T, Kojima A, Kidokoro Y. P53 gene alterations and p53 protein in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *J Pathol* 1996; 178: 415-21.
- Dunphy CH, Dunphy FR, Boyd JH, Varvares MA, Kim HJ, Lowe V. Expression of p53 protein in advanced head and neck squamous cell carcinoma before and after chemotherapy. *Arch. Otolaryngol Head and Neck Surg* 1997; 123: 1223-5.
- Lazarus P, Garewal HS, Sciubba J, Zwiebel N, Calcagnotto A, Fair A. A low incidence of p53 mutations in pre-malignant lesions of the oral cavity from non-tobacco users. *Int J Cancer* 1995; 60: 458-63.

17. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B. p53 mutations in human cancers. *Science* 1992; 253: 49-53.
18. Brachman DG, Graves D, Vokes E, Beckett M, Haraf D, Montag A. Occurrence of p53 gene deletions and human papillomavirus infection in human head and neck cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 4832-6.
19. van-Oijen MG, Leppers-Vd-Straat FG, Tilanus MG, Slootweg PJ. The origins of multiple squamous cell carcinomas in the aerodigestive tract. *Cancer* 2000; 88: 884-93.
20. Lane DP. P53 and human cancers. *Br Med Bull* 1994; 50: 582-99.
21. Brown MA. Tumor suppressor genes and human cancer. *Adv in Genet* 1997; 36: 45-135.
22. Benito de las Heras M. Implicaciones de los oncogenes en el cáncer de colon. *Rev Cáncer* 1992; 6: 156-9.
23. Takeshima Y, Seyama T, Bennett WP, Akiyama M, Tokuoka S, Inai K. P53 mutations in lung cancers from non-smoking and atomic bomb survivors. *Lancet* 1993; 342:1520-1.
24. Soussi T. 1999. http://perso.curie.fr/Thierry_Soussi/p53mutation.html.
25. Harris CC. The 1995 Walter Hubert Lecture-molecular epidemiology of human cancer: insights from the mutational analysis of the p53 tumor-suppressor gene. *Br J Cancer* 1996; 73: 261-9.
26. Harris CC. P53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic an abridged historical perspective. *Carcinogenesis* 1996; 17: 1187-98.
27. Field JK, Spandidos DA, Malliri A, Gosney JR, Yiagnis M, Stell PM. Elevated p53 expression correlates with a history of heavy smoking in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer* 1991; 64: 573-7.
28. Langdon JD, Partridge M. Expression of the tumour suppressor gene p53 in oral cancer. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1992; 30: 214-20.
29. Li X, Tsuji T, Wen S, Sobhan F, Wang Z, Shinozaki F. Cytoplasmic expression of p53 protein and its morphological features in salivary gland lesions. *J Oral Pathol Med* 1995; 24: 201-5.
30. Fontoura BMA, Atienza CA, Sorokina EA, Morimoto T, Carroll RB. Cytoplasmic p53 is associated with ribosomes. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 3146-54.
31. Warnakulasuriya KA, Johnson NW. Expression of p53 mutant nuclear phosphoprotein in oral carcinoma and potentially malignant oral lesions. *Oral Pathol Med* 1992; 21: 404-8.
32. Wade-Evans A, Jenkins JR. Precise epitope mapping of the murine transformation-associated protein, p53. *EMBO J* 1985; 4: 699-706.
33. Guterson BA, Anbazhagan R, Warren W, Midgeley C, Lane DP, O'Hare M, Stamps A, Carter R, Jayatilake H. Expression of p53 in premalignant and malignant squamous epithelium. *Oncogene* 1991; 6: 1785-9.
34. Bartek J, Bartkova J, Vojtesek B, Staskova Z, Rejthar A, Kovarik J, Lane DP. Patterns of expression of the p53 tumour suppressor in human breast tissues and tumours in situ and in vitro. *Int J Cancer* 1990; 46: 839-44.
35. Hansen R, Oren M. P53: from inductive signal to cellular effect. *Curr Op Gene & Dev* 1997; 7: 46-51.
36. Zerrahn J, Deppert W, Weidemann D, Patschinsky T, Richards F, Milner J. Correlation between the conformational phenotype of p53 and its sub-cellular location. *Oncogene* 1992; 7: 1371-81.
37. Sturzbercher HW, Chumakov P, Welch WJ, Jenkins JR. *Oncogene* 1987; 1: 201-11.
38. Kaur J, Srivastava A, Ralhan R. P53-HSP70 complexes in oral dysplasia and cancer: potential prognostic implications. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1996; 32: 45-9.
39. Lehman TA, Bennett WP, Metcalf RA, Welsh JA, Ecker J, Modali RV. P53 mutations, ras mutations, and p53 heat shock 70 protein complexes in human lung carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1991; 51: 4090-6.
40. Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AL. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 1992; 69:1237-45.
41. Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53 associated protein in human sarcomas. *Nature* 1992; 358: 80-3
42. Kastan MB, Zhan Q, El-Deiry WS. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in Ataxia-Telangiectasia. *Cell* 1992; 71: 587-97.
43. Lu X, Lane DP. Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation. defects in chromosome instability syndromes? *Cell* 1993; 75: 765-78.
44. Battifora H. p53 immunohistochemistry: a word of caution. *Hum Pathol* 1994; 52: 435-7.
45. Hall P, Lane DP. P53 in tumor pathology: can we trust immunohistochemistry? *Revisited! J Pathol* 1994; 172: 1-4.
46. Iggo R, Gatter K, Bartek J. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 1990; 675-9.
47. Midgley CA, Fisher CJ, Bartek J. Analysis of p53 expression in human tumors: an antibody raised against human p53 expressed in E. Coli. *J Cell Sci* 1992; 101: 183-9.
48. Baas IO, Mulder JR, Offerhaus GJ, Vogelstein B, Hamilton SR. An evaluation of six antibodies for immunohistochemistry of mutant p53 gene product in archival colorectal neoplasms. *J of Pathol* 1994; 172: 5-12.
49. Soussi T, Legros Y, Lubin R, Ory K, Schlichtholz B. Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review. *Int J Cancer* 1994; 57: 1-9.
50. Sidransky D. Nucleic acid- based methods for the detection of cancer. *Science* 1998; 278: 1054-8.
51. Diamandis EF. Clinical applications of the p53 tumor suppressor gene. *Clin Chim Acta* 1995; 237: 79-90.
52. Fodro S, Read JL, Pirrung M, Stryer L, Lu AT, Solas D. *Science* 1993; 251: 767-73.
53. Pease AC, Solas DM, Sullivan EJ, Cronin MT, Holmes CP, Fodor S. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 5022-6.
54. Ahrendt S, Halachmi S, Chow J, Wu L, Halachmi N, Yang S. Rapid p53 sequence analysis in primary cancer using an oligonucleotide probe array. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 7382-7.
55. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990; 63: 1129-36.
56. Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F. Role of P53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 1995; 393: 229-33.
57. Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus associated cancer. *Nature* 1998; 393: 229-34.
58. Szekeley L, Selinova G, Magnusson KP, Klein G, Wiman KG. EBNA-5 an Epstein Barr virus encoded nuclear antigen, binds to the retinoblastoma and p53 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5455-9.
59. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*. 1990; 248: 76-9.
60. Technau A, Wolff A, Sauder C, Birkner N, Brandner G. P53 in SV40-transformed DNA-damaged human cells binds to its cognate sequence but fails to transactivate target genes. *Int J Oncol* 2000; 18: 281-6.
61. Vogelstein B and Kinzler KW. P53 function and dysfunction. *Cell* 1992; 70: 523-6.
62. Vousden K. Interactions of human papillomavirus transforming proteins with the products of tumor suppressor genes. *FASEB* 1993; 7: 872-9.
63. Mutti L, Carbone M, Giordano GG, Giordano A. Simian virus 40 and human cancer. *Monaldi-Arch-Chest-Dis*. 1998; 53: 198-201.

64. Brennan JA, Mao L, Hruban RH, Boyle JO, Eby YJ, Koch WM. Molecular assesment of histopathological staging in squamous cell carcinoma of head and neck. *J Natl J Med* 1995; 332: 429-35.
65. Ganly I, Soutar DS, Brown R, Kaye SB. P53 alterations in recurrent squamous cell cancer of the head and neck refractory to radiotherapy. *Br J Cancer* 2000; 82: 392-8.
66. Califano J, Westra WH, Koch W, Meininger G, Reed A, Yip L. Unknown primary head and neck squamous cell carcinoma: molecular identification of the site of origin. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 599-604.
67. Spafford M, Koch W, Reed A, Califano J, Xu L, Eisenberger C *et al.* Detection of head and neck squamous cell carcinoma among exfoliated oral mucosal cells by microsatellite analysis. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 607-12.
68. Boyle JO, Hakim J, Koch W, van der Riet P, Hruban RH, Roa RA. The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Res* 1993; 53: 4477-80.
69. Girod SC, Pfeiffer P, Ries J, Pape HD. Proliferative activity and loss of function of tumour suppressor genes as "biomarkers" in diagnosis and prognosis of benign and preneoplastic oral lesions and oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1998; 36: 252-60.
70. Chiang CP, Huang JS, Wang JT, Liu BY, Kuo YS, Hahn LJ. Expression of p53 protein correlates with decreased survival in patients with areca quid chewing and smoking-associated oral squamous cell carcinomas in Taiwan. *J Oral Pathol Med* 1999; 28: 72-6.
71. Yao L, Iwai M, Furuta I. Correlations of bcl-2 and p53 expression with the clinicopathological features in tongue squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 1999; 35: 56-62.
72. Koch WM, Brennan JA, Zahurak M. P53 mutation and locoregional treatment failure in head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1580-6.
73. Lee JJ, Hong WK, Hittelman WN, Lotan R, Shin DM, Benner SE. Predicting Cancer Development in Oral Leukoplakia: Ten Years of translational research. *Clinical Cancer Research* 2000; 6: 1702-10.
74. Warnakulasuriya S. Lack of molecular markers to predict malignant potential of oral precancer. *J Pathol* 2000; 190: 407-9.
75. Nees M, Homann N, Discher H, Andl T, Enders C, Herold-Mende C. Expression of mutated p53 occurs in tumor distant epithelia of head and neck cancer patients: a possible molecular basis for development of multiple tumours. *Cancer Res* 1993; 53: 4189-96.
76. Chung KY, Mukhopadhyay T, Kim J, Casson A, Ro JY, Goepfert H. Discordant p53 mutations in primary head and neck cancer and corresponding second primary cancers of the upper aerodigestive tract. *Cancer Res* 1993; 53: 1676-83.
77. Shapiro B, Chakrabarty M, Cohn EM, Leon SA. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer* 1983; 51: 2116-20.
78. Leon SA, Geen A, Yaros MJ, Shapiro B. Radioimmunoassay for nanogram quantities of DNA. *Cancer Res* 1977; 37: 646.
79. Nawroz H, Koch W, Anker P, Stroun M, Sidransky D. Microsatellite alterations in plasma DNA of head and neck cancer patients. *Nature Med* 1995; 2: 1035-7.
80. Thor AD, Yandel DW. Prognostic significance of p53 overexpression in node-negative breast carcinoma: preliminary studies support cautious optimism. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 176-7.
81. Hamakawa H, Bao Y, Takarada M, Tanioka H. Histological effects and predictive biomarkers of TPP induction chemotherapy for oral carcinoma. *J Oral Pathol and Med* 1998; 27: 87-94.
82. Temam S, Flahault A, Perie S, Monceaux G, Coulet F, Callard P. P53 gene status as a predictor of tumor response to induction chemotherapy of patients with locoregionally advanced squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Clin Oncol* 2000; 18: 385-94.
83. O'Connor PM, Jackman J, Jondle D, Bhatia K, Magrath I, Kohn KW. Role of the p53 tumor suppressor gene in cell cycle arrest and radiosensitivity of Burkitt's lymphoma cell lines. *Cancer Res* 1993; 53: 4776-80.
84. Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Wilson JK, Vogelstein B. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 1990; 249: 912-5.
85. Casey G, Lo-Hsueh M, Lopez ME, Vogelstein B, Stanbridge EJ. Growth suppression of human breast cancer by the introduction of a wild-type p53 gene. *Oncogene* 1991; 6: 1799-805.
86. Friedmann T. Gene therapy of cancer through restoration of tumor suppressor functions? *Cancer* 1992; 70 Suppl: 1810-7.
87. Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M. Wild-type p53 induce apoptosis of myeloid leukemic cells that inhibited by interleukin-6. *Nature* 1991; 352: 345-7.
88. Shaw P, Bovey R, Tardy S, Sahli R, Sordat B, Costa J. Induction of apoptosis of wild-type p53 in a human colon tumor derived cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4495-9.
89. Fujiwara T, Grimm EA, Mukhopadhyay T, Cai DW, Owen-Schaub LB, Roth JA. A retroviral wild-type p53 expression vector penetrates human lung cancer spheroids and inhibits growth by inducing apoptosis. *Cancer Res* 1993; 53: 4129-33.
90. Liu TJ, Zhang WW, Taylor DL, Roth JA, Goepfert H, Clayman GL. Growth suppression of human head and neck cancer cells by the introduction of a wild-type p53 gene via recombinant adenovirus. *Cancer Res* 1994; 54: 3662-7.
91. Fujiwara T, Grimm EA, Mukhopadhyay T, Zhang WW, Owen-Schaub LB, Roth JA. Induction of chemosensitivity in human lung cancer cells in vivo by adenovirus mediated transfer of the wild-type p53 gene. *Cancer Res* 1994; 54: 2287-91.
92. Pirolo KF, Hao Z, Rait A, Jang YJ, Fee WE, Ryan P. P53-mediated sensitization of squamous cell carcinoma of the head and neck to radiotherapy. *Oncogene* 1997; 14: 1735-46.
93. Spitz FR, Nguyen D, Skibber JM, Meyn RE, Cristiano RJ, Roth JA. Adenoviral mediated wild-type p53 gene expression sensitizes colorectal cancer cells to ionizing radiation. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 1665-71.
94. Thierry Soussi, 1999. [http://perso.curie.fr/Thierry.Soussi/9th internationalp53workshop](http://perso.curie.fr/Thierry.Soussi/9th_internationalp53workshop).