

Patología molecular

Aspectos moleculares del carcinoma escamoso de laringe

A. Nadal*, P. Jares, L. Hernández, P.L. Fernández, M. Cazorla, M. Pinyol, S. Hernández, S. Beà, E. Campo y A. Cardesa

*Hospital Clínic i Provincial, *Hospital Casa de Maternitat, Barcelona.*

INTRODUCCIÓN

Las alteraciones moleculares relacionadas con la aparición y el desarrollo del proceso neoplásico pueden resumirse en dos grandes grupos: la activación de los protooncogenes (que se convierten en oncogenes) y la inactivación de los genes supresores. A su vez, los protooncogenes se pueden subdividir en varios grupos: factores de crecimiento, receptores de los factores de crecimiento, transmisores y factores nucleares. Los mecanismos internos que producen estas alteraciones se resumen en mutaciones puntuales, reordenamientos, amplificaciones y deleciones. Estos cambios conducen a aumentos o pérdidas de la expresión o de la actividad tanto de los oncogenes como de los genes supresores. Las consecuencias dependen de la función y del grado en que ésta se ve alterada por el cambio génico.

ONCOGENES

EGFR

Receptor del factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor Receptor*; EGFR, erbB-1) es una

fosfoglucoproteína de 170.000 D con actividad tirosinquinasa codificada por un gen localizado en 17q21. Actúa como receptor para factores de crecimiento extracelulares, entre ellos el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento y transformación α (TGF- α).

La unión al ligando extracelular provoca la dimerización y la activación tirosinquinasa, la autofosforilación y la unión y posterior fosforilación de proteínas diana intracelulares. Según parece, reordenamientos de los extremos amino o carboxilo activan el potencial transformante, quizás eliminando las regiones reguladoras dando lugar a un estado de permanente activación, de un modo parecido a lo que ocurre con las mutaciones activadoras de *ras*.

Aunque se ha demostrado la presencia de amplificaciones de EGFR en cultivos celulares y tumores de cabeza y cuello, los estudios realizados en carcinomas de laringe se han basado en el aumento de su expresión detectado inmunohistoquímicamente, ya que se ha referido por diversos autores que la amplificación génica se acompaña de sobreexpresión (1-3). El resultado evidencia que existe un aumento de la expresión del EGFR en carcinomas de laringe al compararlos con la mucosa normal, sin relación con el tamaño tumoral pero sí con el grado histológico, de modo que los tumores peor diferenciados

muestran una mayor expresión (4). En modelos experimentales, el aumento de la expresión de EGFR coincide con la adquisición de características invasivas (5).

Respecto al papel de los ligandos extracelulares en el proceso oncogénico, el EGF es una proteína de 6000 D descrita en 1962 por Cohen (6) cuya capacidad mitogénica está mediada a través del EGFR. Reiss y cols. (7) han descrito que los queratinocitos tumorales, a diferencia de los no neoplásicos quiescentes, secretan TGF- α a modo de factor autocrino sin necesidad de que haya mitógenos en el medio de cultivo. También experimentaron el uso de anticuerpos anti-EGFR para inhibir el crecimiento tumoral, lo que se consiguió aproximadamente en un 50%, ofreciendo una posible aproximación terapéutica.

c-erb-B2, Her-2, neu

Es una proteína transmembrana de 185.000 D con homología al EGFR, codificada por un gen situado también en 17q21. Este gen ha sido intensamente estudiado en el carcinoma mamario, donde se encuentra frecuentemente amplificado, hecho que se relaciona con un alto índice de recidivas tempranas. Los trabajos inmunohistoquímicos sobre carcinomas de cabeza y cuello no han podido demostrar una relación parecida (8, 9).

ras

En la investigación sobre los mecanismos moleculares del proceso neoplásico, una familia de genes ha aparecido repetidamente implicada. Se trata de la superfamilia *ras*. Este acrónimo proviene de *rat sarcoma*, ya que originalmente se identificaron como los elementos transformantes de las cepas Harvey y Kirsten de los virus del sarcoma de la rata, portadoras de los genes celulares *H-ras-1* y *K-ras-2*, respectivamente. Los genes de esta familia muestran un elevado grado de conservación evolutiva, hasta el punto de que la transfección de *ras* humano en levaduras defectivas para este gen recupera la viabilidad de las colonias. Ello induce a pensar que la función del *ras* en las células normales, aunque no bien conocida, debe ser fundamental.

Se han identificado tres genes *ras* en humanos: los dos ya descritos, localizados en 11p15 y 12p12, respectivamente, y *N-ras*, identificado en la línea del neuroblasto-

ma humano NIH 3T3, localizado en 1p22-p32, además de al menos dos pseudogenes (*H-ras-2* y *K-ras-1*). Los tres genes *ras* codifican proteínas de 21 kD que unen nucleótidos de guanina y tienen actividad GTPasa, con un elevado grado de homología entre ellas.

El carácter oncogénico de *ras* se obtiene a través de mutaciones activadoras (localizadas de forma casi exclusiva en los codones 12, 13 y 61), o en menor grado, asociado a la sobreexpresión de la proteína. Las mutaciones activadoras (fundamentalmente el cambio de la glicina del codón 12 por otro aminoácido, excepto la prolina) comportan un estado de activación permanente. En condiciones normales, las proteínas *ras* están unidas a la superficie interna de la membrana celular y se unen a GDP. Por un mecanismo estimulador no bien conocido, p21^{ras} se activa, intercambiando la molécula de GDP por otra de GTP. Esta forma activa emite una señal y posteriormente pierde el estado activado, defosforilando a GTP. Las formas mutantes tienen una capacidad de unión a GDP menor pero conservan la conformación activada aun en ausencia de estímulos.

Se acepta que en el carcinoma de laringe, al igual que en el conjunto de los carcinomas escamosos de cabeza y cuello y otras localizaciones, las mutaciones *ras* son un fenómeno infrecuente (10), aunque Anwar y cols. (11), en un trabajo que ha recibido críticas en la interpretación de los resultados, describieron un 51% de mutaciones en carcinomas laríngeos. En el mismo sentido, trabajos publicados en China refieren prevalencias de mutación *ras* en carcinomas laríngeos del orden del 30% (12, 13). En cambio, el aumento de la expresión de las proteínas de p21^{ras} sí es un fenómeno frecuente (14, 15) independiente de las alteraciones del gen (16).

En cualquier caso, parece que la capacidad de *ras* para proporcionar el fenotipo transformado en las células del epitelio escamoso es inferior a la que demuestra en los epitelios glandulares (17). Esto, junto a la identificación de mutaciones *ras* en líneas celulares obtenidas a partir de carcinomas escamosos carentes de mutación en el tumor primario (18), hace pensar que *ras* actúa tardíamente.

bcl-1/CCND1

En realidad, *bcl-1* no es un gen sino una región localizada en 11q13, que participa de fenómenos de reordena-

miento génico observados en linfomas. En esta región se localizan, entre otros, los genes *int-2* y *hst-1*. Se han demostrado amplificaciones de estas secuencias (19-22) en tumores y líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello, pero no se ha podido demostrar la expresión de ninguna de ellos, así que no parece muy probable que estos genes sean la diana del fenómeno de amplificación. Sin embargo, en esta región también se encuentra el gen *PRAD-1*, descrito asociado a un reordenamiento característico de los adenomas de paratiroides (de ahí su nombre, de *parathyroid adenoma*) (23). *PRAD-1* codifica a la ciclina D1. Las ciclinas son una familia amplia de proteínas relacionadas con el control del ciclo celular que deben su nombre a la variación cíclica de su expresión. Ciclina D1 es la subunidad reguladora del complejo ciclina-cinasa dependiente de ciclina (en concreto, ciclina D1 se une a *cdk4*), el cual incluye a *p21^{WAF1}* y PCNA. Este complejo, mediante su actividad cinasa, regula el estado de fosforilación de la proteína del gen del retinoblastoma y provoca la liberación de los factores de transcripción necesarios para avanzar a lo largo del ciclo celular, desde la fase G_0 a la fase S, entre los que se encuentra *c-myc*.

Nuestro grupo ha podido demostrar que *CCND1* (éste es el nombre propuesto para el gen de la ciclina D1) se encuentra amplificado y sobreexpresado en carcinomas escamosos de laringe, de modo que el mecanismo que explica la sobreexpresión del gen es la amplificación del mismo. Además hemos observado que tanto la amplificación como la sobreexpresión de *CCND1* se producen con más frecuencia en casos avanzados, sugiriendo que éstos son fenómenos tardíos en el proceso neoplásico (24).

c-myc

Los genes de la familia *myc* (formada por *c-*, *l-* y *n-myc*) son factores de transcripción implicados en la proliferación y división celular, la diferenciación y la apoptosis.

Se ha demostrado amplificación de *c-myc* mediante la técnica de *Southern-blot* en el 9% a 17% de carcinomas de cabeza y cuello (19, 25) y de *n-myc* en un 39%, pero no de *l-myc*. La sobreexpresión de *c-myc* detectada mediante inmunohistoquímica se encuentra aproximadamente en un 50% de casos, con resultados contradictorios en cuanto a su posible relación con factores pronóstico o de agresividad tumoral (26).

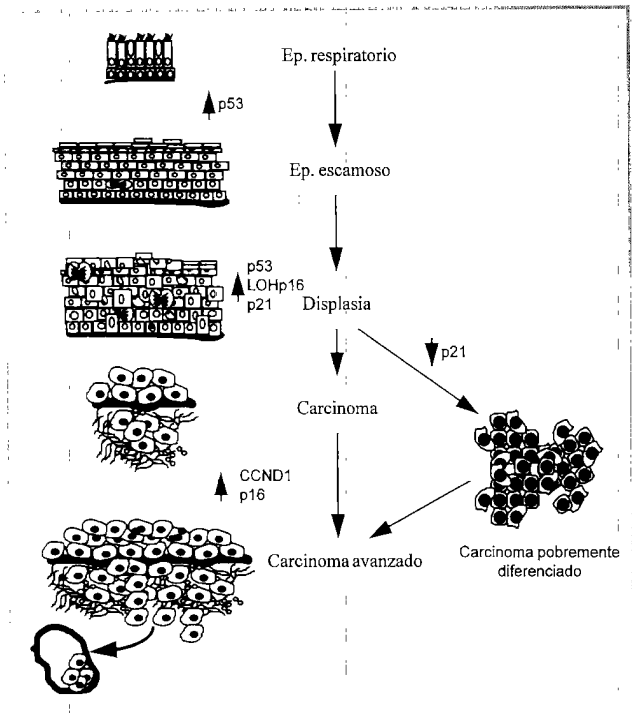


Figura 1. Participación de varios elementos implicados en el control del ciclo celular en el desarrollo y la progresión del carcinoma escamoso de laringe. Así, las alteraciones que producen un incremento de la expresión de *p53* ocurren ya en lesiones que no demuestran un carácter neoplásico, aunque probablemente participan en el proceso de la transformación. Sin embargo, no parece que las alteraciones de *p53* confieran una ventaja proliferativa adicional. A diferencia de *p53*, la amplificación y sobreexpresión de la ciclina D1 ocurre en casos avanzados y puede encontrar la colaboración de las alteraciones de *p16^{INK4a}*. Por su parte, la expresión de *p21^{WAF1}* está relacionada principalmente con la diferenciación celular tumoral, pero no con la progresión del carcinoma.

GENES SUPRESORES

p53

Desde su descubrimiento en 1979 (27, 28), *p53* se ha convertido en la molécula con mayor implicación en el desarrollo de neoplasias humanas (Fig. 1). La detección inmunohistoquímica de *p53* en tumores pero no en tejidos normales abonó la creencia de que se trataba de un oncogén. Al profundizar en el conocimiento del gen, se descubrió que la proteína acumulada en los tejidos tumorales se debía a la presencia de una mutación del gen de *TP53* que estabilizaba la proteína, alargando su vida media permitiendo su acumulación en el núcleo celular y su detección inmunohistoquímica.

p53 participa en el control del ciclo celular, la reparación del DNA, la apoptosis y la conservación de la integridad genómica, interaccionando con el DNA en forma de tetrámeros e induciendo la transcripción de varios genes (*p21^{WAF1}*, *MDM2*, *bax*, *GADD45*). El aumento de la proteína nativa conlleva la parada del ciclo celular antes de entrar en la fase de síntesis del DNA (a través de *p21^{WAF1}*) permitiendo la reparación del material genético dañado o, alternativamente, induciendo los mecanismos que llevan a la muerte celular por apoptosis. Así pues, *TP53* es un gen con actividad supresora tumoral. Aunque los genes supresores se consideran de carácter recesivo (en el sentido de que es necesaria la inactivación de los dos alelos para que se manifieste la pérdida del efecto supresor), algunas mutaciones de *TP53* actúan de forma dominante, ya que al unirse proteínas mutantes a proteínas con la estructura nativa los tetrámeros formados resultan inactivos (29, 30).

Globalmente se han detectado mutaciones de *TP53* en el 50% de los cánceres humanos (31). En el carcinoma escamoso de laringe, la prevalencia es del orden del 28% al 40% según algunos autores (10, 32). La mutación no es el único mecanismo de inactivación de *p53*. Proteínas celulares como *MDM2* (33) y las proteínas E6 de los virus del papiloma humano (HPV) son capaces de inducir la degradación de *p53* con diversos grados de eficacia, según el tipo específico de HPV (34, 35). Las observaciones de diversos grupos, entre ellos el nuestro, sugieren que las alteraciones de *p53* son un fenómeno temprano en la transformación neoplásica en los carcinomas escamosos de laringe. Existe una falta de correlación con los grados de diferenciación o extensión tumoral, a lo que se añade que lesiones preneoplásicas también son portadoras de alteraciones de *p53* (36-40). Hasta la fecha no se ha podido demostrar el valor pronóstico de las alteraciones de *p53* en el carcinoma escamoso de laringe (39, 40). Además, es necesario tener en cuenta que la acumulación de proteína no es un marcador seguro de mutación de *TP53*. En nuestra experiencia, casos de carcinoma de laringe con mutaciones de *p53* que destruyen la estructura de la proteína (mutaciones que cambian el patrón de lectura o mutaciones sin sentido) y delección alélica no muestran sobreexpresión de *p53*. Así, una inmunohistoquímica negativa, que se interpretaría como un *p53* normal, puede esconder en realidad un caso en que la función de *p53* está completamente anulada. Recíprocamente, hemos encontrado ca-

sos con intensa sobreexpresión de *p53* en que la secuencia del gen en las regiones conservadas (exones 5 a 9) no ha mostrado mutación alguna (41). En este sentido, recientes estudios han demostrado acumulación de *p53* sin evidencia de mutación subyacente en linfomas (42), gliomas (43) y carcinomas escamosos de cabeza y cuello, incluidos los casos de laringe (44).

Inhibidores de las cinasas dependientes de ciclinas (CKI)

p21^{WAF1/CIP1/CAP20/SDI1} fue la primera CKI identificada como un componente de los complejos cuaternarios de ciclina/CDK/PCNA (45) regulado por *p53* (46), con actividad inhibidora de las cinasas dependientes de ciclinas (47) y de PCNA (48). Posteriormente se demostró que existen vías de activación de *p21^{WAF1}* distintas de *p53* (49), y que su expresión se correlaciona con diferenciación terminal en diversos tejidos (50). Estudios recientes han demostrado la capacidad supresora tumoral de *p21^{WAF1}* (51). Sin embargo, parece que la mutación de *p21^{WAF1}* en tumores humanos es un fenómeno poco menos que excepcional (52-54).

Nuestro grupo ha estudiado la expresión de la proteína *p21^{WAF1}* mediante inmunohistoquímica y de su RNA mensajero mediante análisis de *Northern-blot* en los carcinomas escamosos de laringe. Los resultados fueron sorprendentes, ya que la mayor parte de los tumores expresan tanto la proteína como el RNAm de *p21^{WAF1}* en cantidades similares o incluso superiores (en ocasiones muy superiores) a las de la mucosa no tumoral. Esta expresión es independiente de *p53* ya que se detecta en casos con anulación completa de *p53*, pero muestra una clara asociación con el fenómeno de la diferenciación tumoral, ya que los tumores pobremente diferenciados (grado IV de Broders) no expresan *p21^{WAF1}*, e incluso en los tumores que sí la expresan las áreas más pobremente diferenciadas tienden a ser negativas (41). Estos resultados nos hacen pensar que en el contexto del carcinoma escamoso de laringe *p21^{WAF1}* no tiene una función de gen supresor, o que la vía supresora en la que se encuentra no es funcional.

La familia de *p21^{WAF1}* se completa con *p27^{KIP1}* (55) y *p57^{KIP2}* (56), que comparten homología y funciones.

p16^{INK4/MTS1}, *p15^{INK4b/MTS2}*, *p18^{INK4c}* y *p19^{INK4d}* constituyen una familia distinta de inhibidores de CDK espe-

cíficos para CDK4/CDK6 (57-59). Tienen actividad supresora tumoral (de ahí su nombre de MTS, *Multiple Tumor Suppressor*). Nuestro grupo ha fijado su interés en $p16^{INK4a}$, el miembro mejor caracterizado y estudiado de la familia, como continuación lógica del trabajo sobre CCND1.

Se ha estudiado la presencia de mutaciones por PCR-SSCP no radiactivo, seguida de la secuenciación de los casos positivos, y la existencia de deleciones alélicas mediante el análisis de la pérdida de la heterocigosidad de los microsatélites vecinos al gen de $p16^{INK4a}$. A diferencia de $p21^{WAF1}$, el comportamiento de $p16^{INK4a}$ sí resulta el esperado para un gen con actividad supresora tumoral. En todos los casos con mutación de $p16^{INK4a}$, ésta se acompaña de la deleción del otro alelo, de acuerdo con el modelo de inactivación de los genes supresores propuesto por Knudson (60). Se detecta pérdida de heterocigosidad en un número superior de casos al de los que muestran mutación, lo que nos lleva a creer que en el proceso de inactivación de $p16^{INK4a}$ la deleción alélica precede a la mutación (61).

Existen otros mecanismos conocidos de inactivación de $p16^{INK4a}$ como son la deleción homocigota [especialmente frecuente en líneas celulares (62)] y la hipermetilación del promotor (63). Hemos analizado la prevalencia de estas alteraciones en los carcinomas escamosos de laringe (resultados remitidos para su publicación), cuyo principal mecanismo de inactivación de $p16^{INK4a}$ es la mutación acompañada de la deleción alélica, seguida de la deleción homocigota y de la hipermetilación del promotor (acompañada también de la deleción del otro alelo). La correlación con la expresión proteica y del RNAm de $p16^{INK4a}$ es excelente en los casos de deleción homocigota y de hipermetilación del promotor, pero los casos mutantes pueden mostrar sobreexpresión o pérdida de expresión (tanto en el análisis de *Western-blot* como en el de *Northern-blot*), por lo que los análisis limitados a la expresión de $p16^{INK4a}$ (por ejemplo mediante inmunohistoquímica) pueden ser la causa de falsas interpretaciones.

El descubrimiento de que el locus del gen de $p16^{INK4a}$ incluye a dos transcritos distintos según el proceso de maduración del RNAm, por empalme alternativo de exones 1 α (que da origen a $p16^{INK4a}$) o 1 β (que da origen a $p19^{ARF}$ en el modelo murino) con los exones 2 y 3 de $p16^{INK4a}$, unido al hecho de que $p19^{ARF}$ muestra actividad supresora tumoral mediante su interacción con

$p53$, ha venido a cuestionar cuál es la verdadera causa de la actividad supresora tumoral del locus de $p16^{INK4a}$ (64).

Retinoblastoma

Como ya se ha descrito previamente, la proteína del gen del retinoblastoma tiene un papel central en el control de la progresión a lo largo del ciclo celular, en el paso entre G₁ y la fase S. El gen del retinoblastoma se localiza en 13q14 y codifica una proteína (pRb) de 105 kD, que en estado de hipofosforilación secuestra los factores de transcripción necesarios para la entrada en la fase S del ciclo celular. La fosforilación de pRb, mediada por los complejos de la ciclina D1, libera los factores de transcripción y permite la progresión. A este gen corresponde el honor de ser el primero descrito con actividad supresora (60).

Se han definido pocas mutaciones del gen del retinoblastoma, ya que su enorme tamaño (consta de 27 exones repartidos a lo largo de más de 200 kb y su RNAm mide 4,5 kb) dificulta mucho su estudio. Por contra, se han estudiado las deleciones, presumiendo que éstas acompañan a alteraciones del alelo restante (65). En carcinomas de laringe, los estudios de la pérdida de heterocigosidad de los marcadores relacionados con el gen del retinoblastoma han dado como resultado que la deleción ocurre en un 15% a 60% de los casos (66, 67). Las discrepancias observadas impiden una valoración de cuál pueda ser el auténtico papel del gen del retinoblastoma en la oncogénesis del carcinoma escamoso de laringe.

Nosotros hemos encontrado expresión inmunohistoquímica de pRb en 36 de 37 carcinomas escamosos de laringe (97%). Dada la dificultad que implica un análisis genético de Rb, los resultados de expresión indican que la prevalencia de las alteraciones de Rb en estos tumores debe ser baja (61).

Cadherina E

Las cadherinas son una familia de moléculas de adhesión celular dependientes del calcio. La cadherina E es específica del epitelio y en condiciones normales se expresa en las células del epitelio escamoso. Un estudio inmunohistoquímico en carcinomas escamosos de laringe ha demostrado que la pérdida de expresión se correlaciona con la pobre diferenciación tumoral, y que las

metástasis ganglionares son negativas en ocho de nueve casos. Los resultados inmunohistoquímicos se han confirmado mediante el análisis de *Western-blot* (68). Estos resultados sugieren que la cadherina E tiene actividad supresora, cuya pérdida se asocia a la desdiferenciación tumoral y a la capacidad metastásica.

NME1, NM23

El interés en el gen supresor de metástasis *NME1*, localizado en 17q22, radica en que, en el cáncer de colon, las deleciones alélicas, detectadas mediante estudios de pérdida de heterocigosis, se asocian al hallazgo de metástasis (69). Nuestro grupo también demostró una asociación con un periodo libre de enfermedad más corto y una supervivencia menor (70). El grupo de Scholnick (66) investigó la pérdida de heterocigosis para *NME1* en cánceres supraglóticos, observando una baja prevalencia (7%), sin poder demostrar relación con la diseminación metastásica ni la supervivencia, aunque el tamaño de la muestra (37 pacientes) quizás era escaso.

AGRADECIMIENTOS

Los trabajos relacionados en este manuscrito han sido financiados por las ayudas a la investigación SAF1195/93 de la DGICYT, SAF 96/61 de la CICYT, Ministerio de Educación y Ciencia, FIS 93/1012, y FIS 95/0862, Ministerio de Sanidad; P.J., M.C. y S.B., becarios del Ministerio de Educación y Ciencia; L.H., becario de la Fundació Rius i Virgili; M.P., becaria de Marató TV3 Cáncer; S.H., becaria de la Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica (CIRIT), Generalitat de Catalunya.

BIBLIOGRAFÍA

1. Yamamoto T, Kamata N, Kawano H y cols. *High incidence of amplification of the epidermal growth factor receptor gene in human squamous cell carcinoma cell lines*. Cancer Res 1986; 46: 414-416.
2. Weichselbaum RR, Dumphy EJ, Beckett MA y cols. *Epidermal growth factor receptor gene amplification and expression in head and neck cancer cell lines*. Head Neck 1989; 11: 437-442.
3. Ishitoya J, Toriyama M, Oguchi N y cols. *Gene amplification and overexpression of EGF receptor in squamous cell carcinomas of the head and neck*. Br J Cancer 1989; 59: 559-562.
4. Scambia G, Panici PB, Battaglia F y cols. *Receptors for epidermal growth factor and steroid hormones in primary laryngeal tumors*. Cancer 1991; 67: 1347-1351.
5. Wong DTW, Biswas DK. *Expression of c-erbB protooncogene during dimethylbenzanthracene-induced tumorigenesis in hamster cheek pouch*. Oncogene 1987; 2: 67-72.
6. Cohen S. *Isolation of a submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal*. J Biol Chem 1962; 237: 1555-1562.
7. Reiss M, Stash EB, Vellucci VF, Zhou Z. *Activation of the autocrine transforming growth factor pathway in human squamous carcinoma cells*. Cancer Res 1991; 51: 6254-6262.
8. Craven JM, Pavelic ZP, Stambrook PJ y cols. *Expression of c-erbB-2 gene in human head and neck carcinoma*. Anticancer Res 1992; 12: 2273-2276.
9. Field JK, Spandidos DA, Yiagnisis M, Gosney JR, Papadimitriou K, Stell PM. *C-erbB-2 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck*. Anticancer Res 1992; 12: 613-620.
10. Fracchiolla NS, Pignataro L, Capaccio P y cols. *Multiple genetic lesions in laryngeal squamous cell carcinomas*. Cancer 1995; 75(6): 1292-1301.
11. Anwar K, Nakakuki K, Naiki H, Inuzuka M. *ras gene mutations and HPV infection are common in human laryngeal carcinoma*. Int J Cancer 1993; 53: 22-28.
12. Liu S, Lin D, Hong B, Huang G. *Analysis of C-Ha-ras gene amplification and mutation in laryngeal carcinoma*. Chin Med Sci J (China) 1995; 10: 59-60.
13. Yang Q. *Studies on ras p21 expression and mutation at 12th codon of C-Ha-ras oncogene in squamous cell carcinoma of the larynx*. Chung Hua Erh Pi Yen Hou Ko Tsa Chih (China) 1993; 28: 209-212.
14. Scambia G, Catozzi L, Benedetti Panici P y cols. *Expression of ras oncogene p21 protein in normal and neoplastic laryngeal tissues: Correlation with histopathological features and epidermal growth factor receptors*. Br J Cancer 1994; 69: 995-999.
15. Yarbrough WG, Shores C, Witsell DL, Weissler MC, Fidler ME, Gilmer TM. *ras mutations and expression in head and neck squamous cell carcinomas*. Laryngoscope 1994; 104: 1337-1347.
16. Sheng ZM, Barrois M, Kljanienko J, Micheau C, Richard JM, Riou G. *Analysis of the c-Ha-ras-1 gene for deletion, mutation, amplification and expression in lymph node metastases of human head and neck carcinomas*. Br J Cancer 1990; 62: 398-404.
17. Wynford-Thomas D. *Oncogenes and anti-oncogenes; the molecular basis of tumour behaviour*. J Pathol 1991; 165: 187-201.
18. Shiga C, Shiga K, Sasano H, Mori S. *A point mutation of c-K-ras gene was found in human esophageal carcinoma cell lines but not in primary esophageal carcinomas*. Biochem Biophys Res Commun 1992; 187: 515-521.
19. Leonard JH, Kearsley JH, Chenevix-Trench G y cols. *Analysis of gene amplification in head-and-neck squamous-cell carcinomas*. Int J Cancer 1991; 48: 511-515.
20. Sommers K, Cartwright S, Schechter G. *Amplification of the int-2 gene in human head and neck squamous cell carcinomas*. Oncogene 1990; 5: 915-920.
21. Berenson JR, Yang J, Mickel RA. *Frequent amplification of the bcl-1 locus in head and neck squamous cell carcinomas*. Oncogene 1989; 4: 1111-1116.
22. Zhou DJ, Casey G, Cline MJ. *Amplification of human int-2 in breast cancers and squamous carcinomas*. Oncogene 1988; 2: 279-282.
23. Motokura T, Bloom T, Kim HG y cols. *A novel cyclin encoded by bcl-1-linked candidate oncogene*. Nature 1991; 350: 512-515.
24. Jares P, Fernández PL, Campo E y cols. *PRAD-1/Cyclin D1 gene amplification correlates with messenger RNA overexpression and tumor progression in human laryngeal carcinomas*. Cancer Res 1994; 54(17): 4813-4817.

25. Saranath D, Panchal RG, Nair R y cols. *Oncogene amplification in squamous cell carcinoma of the oral cavity*. Jpn J Cancer Res 1989; 80: 430-437.
26. Field JK, Spandidos DA, Stell PM y cols. *Elevated expression of the c-myc oncoprotein correlates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma*. Oncogene 1989; 4: 1463-1468.
27. Lane DP, Crawford LV. *T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells*. Nature 1979; 278: 261-263.
28. Linzer DIH, Levine AJ. *Characterization of a 54 K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40 transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells*. Cell 1979; 17: 43-52.
29. Waterman MJ, Waterman JLF, Halazonetis TD. *An engineered four-stranded coiled coil substitutes for the tetramerization domain of wild-type p53 and alleviates transdominant inhibition by tumor-derived p53 mutants*. Cancer Res 1996; 56: 158-163.
30. Hachiya M, Chumakov A, Miller CW, Akashi M, Said J, Koeffler HP. *Mutant p53 proteins behave in a dominant, negative fashion in vivo*. Anticancer Res 1994; 14: 1853-1860.
31. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. *p53 mutations in human cancers*. Science 1991; 253: 49-53.
32. Maestro R, Dolcetti R, Gasparotto D y cols. *High frequency of p53 gene alterations associated with protein overexpression in human squamous cell carcinoma of the larynx*. Oncogene 1992; 1159-1166.
33. 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: 80-83.
34. Hubbert NL, Sedman SA, Schiller JT. *Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human keratinocytes*. J Virol 1992; 66: 6237-6241.
35. Scheffner M, Werness BA, Hulbregtse JM, Levine AJ, Howley PM. *The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53*. Cell 1990; 63: 1129-1136.
36. Pavelic ZP, Li Y, Stambrook PJ y cols. *Overexpression of p53 protein is common in premalignant head and neck lesions*. Anticancer Res 1994; 14: 2259-2266.
37. Shin DM, Kim J, Ro JY y cols. *Activation of p53 gene expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis*. Cancer Res 1994; 54: 321-326.
38. Dolcetti R, Doglioni C, Maestro R y cols. *p53 overexpression is an early event in the development of human squamous-cell carcinoma of the larynx: Genetic and prognostic implications*. Int J Cancer 1992; 52: 178-182.
39. Gusterson BA, Anbazhagan R, Warren W y cols. *Expression of p53 in premalignant and malignant squamous epithelium*. Oncogene 1991; 6: 1785-1789.
40. Nadal A, Campo E, Pinto J y cols. *p53 expression in normal, dysplastic, and neoplastic laryngeal epithelium, absence of a correlation with prognostic factors*. J Pathol 1995; 175(2): 181-188.
41. Nadal A, Jares P, Cazorla M y cols. *p21^{WAF1/Cip1} expression is associated with cell differentiation but not with p53 mutations in squamous cell carcinoma of the larynx*. J Pathol 1997; 183: 156-163.
42. Villuendas R, Piris MA, Algara P y cols. *The expression of p53 protein in non-Hodgkin's lymphomas is not always dependent on p53 gene mutations*. Blood 1993; 82: 3151-3156.
43. Rubio M, von Deimling A, Yandell DW, Wiestler OD, Gusella JF, Louis DN. *Accumulation of wild type p53 protein in human astrocytomas*. Cancer Res 1993; 53: 3465-3467.
44. Xu L, Chen Y, Huvos AG y cols. *Overexpression of p53 protein in squamous cell carcinomas of head and neck without apparent gene mutations*. Diagn Mol Pathol 1994; 3: 83-92.
45. Xiong Y, Zhang H, Beach D. *D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA*. Cell 1992; 71: 505-514.
46. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE y cols. *WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression*. Cell 1993; 75: 817-825.
47. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. *The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases*. Cell 1993; 75: 805-816.
48. Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. *The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA*. Nature 1994; 369: 574-578.
49. Michieli P, Chedid M, Lin D, Pierce JH, Mercer WE, Givol D. *Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway*. Cancer Res 1994; 54: 3391-3395.
50. Parker SB, Eichele G, Zhang P y cols. *p53-independent expression of p21^{Cip1} in muscle and other terminally differentiating cells*. Science 1995; 267: 1024-1027.
51. Chen YQ, Cipriano SC, Arenkiel JM, Miller FR. *Tumor suppression by p21^{WAF1}*. Cancer Res 1995; 55: 4536-4539.
52. Shiohara M, El-Deiry WS, Wada M y cols. *Absence of WAF1 mutations in a variety of human malignancies*. Blood 1994; 84: 3781-3784.
53. Bhatia K, Fan S, Spangler G y cols. *A mutant p21 cyclin-dependent kinase inhibitor isolated from a Burkitt's lymphoma*. Cancer Res 1995; 55: 1431-1435.
54. Balbin M, Hannon GJ, Pendás AM y cols. *Functional analysis of a p21^{WAF1/Cip1/SD11} mutant (Arg94Tyr) identified in a human breast carcinoma*. J Biol Chem 1996; 271(26): 15782-15786.
55. Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H y cols. *Cloning of p27^{Kip1}, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals*. Cell 1994; 78: 59-66.
56. Lee MH, Reynisdottir I, Massague J. *Cloning of p57^{Kip2}, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution*. Genes Dev 1995; 9(6): 639-649.
57. Hannon GJ, Beach D. *p15^{INKB} is a potential effector of TGF-induced cell cycle arrest*. Nature 1994; 371: 257-261.
58. Guan KL, Jenkins CW, Li Y y cols. *Growth suppression by p18, a p16^{INK4/MTS1}- and p14^{INK4b/MTS2}- related CDK6 inhibitor; correlates with wild-type pRb function*. Genes Dev 1994; 8(24): 2939-2952.
59. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. *A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4*. Nature 1993; 366(6456): 704-707.
60. Knudson AG. *Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma*. Proc Natl Acad Sci USA 1971; 68: 820-823.
61. Jares P, Fernández PL, Nadal A y cols. *P16^{MTS1/CDK4i} mutations and concomitant loss of heterozygosity at 9p21-23 are frequent events in squamous cell carcinoma of the larynx*. Oncogene 1997; 15(12): 1445-1453.
62. Zhang SY, Klein-Szanto AJ, Sauter ER y cols. *Higher frequency of alterations in the p16/CDKN2 gene in squamous cell carcinoma cell lines than in primary tumors of the head and neck*. Cancer Res 1994; 54(19): 5050-5053.
63. Merlo A, Herman JG, Mao L y cols. *5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers*. Nat Med 1995; 1(7): 686-692.

64. Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, Sherr CJ. *Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest.* Cell 1995; 83(6): 993-1000.
65. Yandell DW, Campbell TA, Dayton SH y cols. *Oncogenic point mutations in the human retinoblastoma gene: Their application to genetic counseling.* N Engl J Med 1989; 321: 1689-1695.
66. Scholnick SB, Sun PC, Shaw ME, Haughey BH, El-Mofty SK. *Frequent loss of heterozygosity for Rb, TP53, and chromosome arm 3p, but not NME1 in squamous cell carcinomas of the supraglottic larynx.* Cancer 1994; 73: 2472-2480.
67. Lee NK, Ye Y, Chen J, Li X, Waber PG, Nisen PD. *p53, retinoblastoma, and human papillomavirus in squamous cell carcinoma and adjacent normal mucosa of the upper aerodigestive tract.* Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1993; 119: 1125-1131.
68. Schipper JH, Frixen UH, Behrens J, Unger A, Jahnke K, Birchmeier W. *E-Cadherin expression in squamous cell carcinomas of the head and neck: Inverse correlation with tumor differentiation and lymph node metastases.* Cancer Res 1991; 51: 6328-6337.
69. Cohn K, Wang F, DeSoto-Lapaix F y cols. *Association of NM23-H1 allelic deletions with distant metastases in colorectal carcinomas.* Lancet 1991; 338: 722-724.
70. Campo E, Miquel R, Jarés P y cols. *Prognostic significance of the loss of heterozygosity of NM23-H1 and p53 genes in human colorectal carcinomas.* Cancer 1994; 73(12): 2913-2921.