

# EVALUACIÓN DE ONCÓGENES Y MOLÉCULAS DE PROLIFERACIÓN CELULAR EN CARCINOMA ESCAMOSO DE CAVIDAD ORAL

JOSÉ GREGORIO PONCE, MARÍA CORRENTI, HELEN RIVERA, MAYRA ÁVILA, HENRY LARES, DENISE MATTAR, SARA MAISSI

INSTITUTO ONCOLÓGICO "DR. LUIS RAZETTI". INSTITUTO DE ONCOLOGÍA Y HEMATOLOGÍA, UCV. INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN ODONTOLÓGICA DR. "RAÚL VILLANUEVA", UCV HOSPITAL ONCOLÓGICO "PADRE MACHADO"

## RESUMEN

**OBJETIVO:** El cáncer de la cavidad oral comprende el 30 % de los cánceres de cabeza y cuello, de los cuales el 95 % son carcinoma escamoso. Se han descrito numerosos factores de riesgo y en los últimos años han surgido una serie de moléculas de proliferación celular y de oncógenes en los cuales su expresión podría estar aumentada en los pacientes con cáncer escamoso de la cavidad oral. El objetivo de esta investigación es evaluar los marcadores de proliferación celular Ki-67 y PCNA y los oncógenes p53, p21 y c-erbB2, en pacientes con carcinoma escamoso localizado en la cavidad oral y correlacionarlo con los factores clínicos y patológicos en el grupo evaluado. **MÉTODOS:** A las biopsias de 52 pacientes con carcinoma escamoso de cavidad oral, vistos en el Hospital Oncológico "Padre Machado" entre 1995 y 1999, se les evaluó, con técnicas de inmunohistoquímica, las moléculas de proliferación celular PCNA y Ki-67 y los oncógenes p53, p21 y c-erbB2. **RESULTADOS:** La proporción de resultados positivos en inmunohistoquímica fue el siguiente: PCNA 90,4 %, p21 63,5 %, Ki-67 53,8 %, p53 48,1 % y el c-erbB2 con 3,8 %. La permeación vascular y el grado de diferenciación fue significativo en este estudio en correlación con la presencia de p53, p21, c-erbB2, PCNA y Ki-67. **CONCLUSIONES:** El PCNA y p21, fueron los biomarcadores encontrados más frecuentemente. La permeación vascular, el grado histológico tienen relación estadísticamente significativa con todos los biomarcadores en estudio.

**PALABRAS CLAVE:** Proteína, p53, neoplasias, carcinoma, células escamosas.

## SUMMARY

**OBJECTIVE:** The oral cavity cancer account for 30 % of all of head and neck cancers, among which 95 % are squamous cell type carcinoma. There are described many risk factors involved, and in the last few years there is been a wide a series development of cell proliferation molecules and oncogenes, in which can be over expressed in the patients with squamous cell cancer of the oral cavity. The objective of this investigation is to evaluate the proliferation cells marker Ki-67 and PCNA and the p53, p21 oncogenes and the c-erbB2 in patients with squamous cell carcinoma, localized in oral cavity and his correlation with clinical and pathological factors in the evaluated group. **METHODS:** To the biopsies of 52 patients with squamous cell carcinoma of oral cavity seen in the Oncology Hospital "Padre Machado" between 1995 and 1999 there were evaluated with immunohistochemistry techniques to determine Ki-67 and PCNA cell-proliferation markers and p53, p21, c-erbB2 oncogenes. **RESULTS:** The proportion of positive results found were: In the immunohistochemistry: 90.4 % PCNA, 63.5 % p21, 53.8 % Ki-67, 48.1 % p53 and 3.8 % in c-erbB2. In our study, the vascular permeability and the differentiation degree were significant in this study with the correlation of the presence of the p53, p21, c-erbB2, PCNA and Ki-67. **CONCLUSIONS:** The PCNA and p21 were the most common found biomarkers. The vascular permeability and the histological grade show a significant statistic relation with all study biomarkers.

**KEY WORDS:** Protein, p53, neoplasm, carcinoma, squamous cell.

---

Recibido: 05/06/2007 Revisado: 02/07/2007  
Aceptado para publicación: 04/07/2007

---

---

Correspondencia: Dr. José G Ponce.  
Instituto Oncológico "Dr. Luis Razetti".  
Calle Real de Cotiza. San José. Caracas. Venezuela  
Teléfono: 0(0414)3388334. E-mail:henryrla@cantv.net

---

## INTRODUCCIÓN

E

l cáncer es ahora considerado como un proceso que depende de múltiples factores, entre ellos un sin número de eventos de aberraciones genéticas que culminan en transformación maligna.

El cáncer de la cavidad oral comprende el 30 % de los cánceres de cabeza y cuello, de los cuales el 95 % son carcinoma escamoso y representan el 3,4 % de todos los cánceres <sup>(1-24)</sup>.

En nuestro país se reportan un promedio de 250 casos anuales de tumores malignos de la cavidad oral, siendo más frecuente en hombres y con edades comprendidas entre los 45 y 65 años.

Se han descrito numerosos factores de riesgo tales como el alcohol, el tabaco, déficit nutricional y genéticos <sup>(1,5)</sup>. Algunos estudios han sugerido al virus de papiloma humano (VPH) como probable factor etiológico para desarrollar cáncer de cavidad oral, encontrándose presente entre 60 % y 90 % de los casos, predominando en los pacientes menores de 40 años <sup>(1-27)</sup>. Otros factores asociados son la pobre higiene bucal y bajos estatus socioeconómico <sup>(1-5)</sup>.

En los últimos años se han descrito una serie de moléculas de proliferación celular y de oncógenes, su expresión podría estar aumentada en los pacientes con cáncer escamoso de cavidad oral.

Así se han descrito mutaciones del p53 en más de 51 tipos de cáncer correspondientes a diferentes tejidos del cuerpo humano. El patrón mutado de esta proteína se correlaciona a una mayor agresividad tumoral, metástasis y una menor sobrevida a los 5 años <sup>(10-14)</sup>.

Tales resultados se aplican a cánceres de colon, pulmón, cuello uterino, vejiga, próstata, mama, piel y más recientemente tumores de la cavidad oral, es por ello que el estatus del gen p53 es un

buen indicador pronóstico <sup>(10-14)</sup>.

Ante diversos daños celulares el gen p53 favorece la expresión de la proteína inhibidora de las cinasas dependientes de las ciclinas. El p21 es capaz de detener la replicación del ADN en la fase S del ciclo celular, a través de la inhibición de la proteína PCNA sobre la ADN polimerasa delta <sup>(10-14,22,23)</sup>.

La familia del gen ras (h-ras, k-ras y n-ras), contienen genes que están estructuralmente relacionados y codificadas por la proteína ras p21. Estas son homólogas de proteínas G y poseen actividad GTPasa y están localizados en la parte interna de la membrana citoplasmática. Las mutaciones de la familia del gen ras, juega un papel importante en la evolución de un gran número de neoplasias en los humanos <sup>(16,17,22,23)</sup>.

Altos niveles de mutaciones se observan en el adenocarcinoma de páncreas (90 %), colon (50 %), tiroides (50 %), y pulmón (30 %). En el área de cabeza y cuello se ha demostrado la incidencia de mutaciones ras. En la India, el 35 % de los carcinomas escamosos presentan mutaciones ras. En un reciente estudio de Europa y EE.UU estas mutaciones están presentes en un 5 % de los tumores de cabeza y cuello <sup>(22,26)</sup>.

El alto consumo de tabaco y alcohol están asociados a la alta tasa de mutaciones del gen ras y sobre expresión del p53 <sup>(10-19,20,22,23,26)</sup>.

Se ha demostrado recientemente que la sobre expresión de la proteína p21 está correlacionada con carcinoma escamoso y una mejor sobrevida libre de enfermedad y quizás intervenga en eventos tempranos de este tipo histopatológico de cáncer de cabeza y cuello.

El proto oncogén c-erbB2, es una proteína de membrana con función tirosin cinasa. El gen c-erbB2 está situado en el cromosoma 17q. La amplificación se ha detectado en un 10 % a 34 % en cáncer de mama, así como en estómago, pulmón y ovario. Se ha demostrado que la amplificación del c-erbB2 se asocia a sobrevida reducida y a recurrencia tumoral. Esta

afirmación se aplica a carcinomas mamarios, pero en carcinomas escamosos del área de cabeza y cuello, está en discusión <sup>(10,18,21,26)</sup>.

Estudios pioneros de moléculas de proliferación en cáncer oral, detectadas por inmunohistoquímica, concluyeron que la actividad proliferativa se incrementa secuencialmente con la severidad de la displasia en lesiones precancerosas, así como puede incrementar el grado histológico en cáncer invasivo <sup>(10,26,27)</sup>.

El marcaje celular de Ki-67 está asociado con el estatus nodal. La expresión de Ki-67 y el incremento del PCNA pueden asociarse con pobre respuesta a la quimioterapia <sup>(17,20,26)</sup>.

El objetivo de la presente investigación es evaluar los marcadores de proliferación celular (Ki-67 y PCNA) y los oncógenes p53, p21 y c-erbB2, en pacientes con carcinoma escamoso localizado en la cavidad oral y correlacionarlo con factores clínico patológicos en el grupo evaluado.

## MÉTODOS

Se revisaron 197 historias de los pacientes ingresados al servicio de cabeza y cuello del Hospital Oncológico "Padre Machado" en el período comprendido desde enero de 1995 y diciembre de 1999. De estos se seleccionaron 92 pacientes con carcinoma escamoso de cavidad oral (labios, mucosa oral, reborde alveolar, trigono retromolar, piso de la boca, lengua móvil y paladar duro) y se registraron las variables clínicas (síntomatología, localización, edad, sexo, procedencia, hábitos tabáquicos, hábitos alcohólicos, y estadio clínico), histopatológicas (grado histológico, presencia de necrosis, grado nuclear, permeación vascular) y de tratamiento.

A los bloques de parafina de las biopsias de 52 pacientes se les evaluó, con técnicas de inmunohistoquímica, las moléculas de proliferación celular PCNA y Ki-67 y los

oncógenes p53, p21 y c-erbB2. El diagnóstico histopatológico fue examinado en doble ciego por patólogos experimentados en el área.

Se utilizó el método del complejo estreptavidina biotina peroxidasa. De los 52 bloques seleccionados, se procedió a realizar cortes de tejidos de 3 mm a 4 mm de espesor, que se colocaron en láminas portaobjetos previamente cubiertas con poli-L-lisina. Se desparafinaron las secciones de los tejidos con dos xiloles consecutivos durante 10 a 15 minutos cada uno, se removieron los residuos de xilol lavándolos en tres alcoholes al 100 % consecutivos durante 3 a 5 minutos y luego se realizaron lavados con agua destilada durante 5 minutos. Cada una de las láminas se colocó en la solución target retrieval y se llegó a hervir por 10 minutos en cuatro ciclos de 2 minutos cada uno; se lavó por 5 minutos con PBS1X y posteriormente se procedió al bloqueo de la peroxidasa endógena incubando las láminas en una solución de peróxido de hidrógeno al 3 % en metanol. Se lavaron las láminas en buffer fosfato salino (PBS) por 5 minutos y se incubaron los cortes de tejido con el anticuerpo primario empleando p53 Protein Clone DO-7, c-erbB2 oncoproteína, Human p21 ras oncoproteína, Ki-67 antígeno clone Ki-67 y PCNA proliferating cell nuclear antígeno clone PC 10 (DAKO®). Los anticuerpos primarios se emplearon a una dilución 1:25 incubando durante 1 hora, se lavó el anticuerpo primario con PBS durante 5 minutos, se incubaron con el anticuerpo secundario con PBS durante 5 minutos y se expusieron al complejo estreptavidina biotina peroxidasa (AEC) durante 10 a 20 minutos. Se lavó el exceso del complejo con PBS durante 15 minutos. Posteriormente se lavó al cromógeno AEC con abundante agua corriente durante 5 minutos.

Los cortes se contrastaron con hematoxilina de Mayer por 1 a 3 minutos y luego se lavó con agua. Se procedió a montar las secciones de tejido en láminas con medio de montaje sintético (Maxtex macrosearch)®, se colocaron cubreobjetos

evitando la formación de burbujas. Todo el procedimiento se realizó en cámara húmeda para evitar el secado de los tejidos. Paralelamente a los casos problemas se emplearon controles positivos de reactividad previamente conocida y controles negativos que se incubaron de igual forma sin el anticuerpo.

Posterior a la obtención de láminas con inmunotinción a p53, p21, c-erbB2, Ki-67 y PCNA se realizó la observación al microscopio de luz para proceder al análisis de los resultados de expresión de estos biomarcadores y la intensidad de la tinción en el campo examinado.

Para el análisis de los resultados, se calculó la frecuencia y porcentaje de las medidas discretas y la media y la desviación típica para las medidas continuas. Para correlacionar las variables de los oncógenes y moléculas de proliferación con cada una de las variables del estudio se aplicó la prueba de Chi cuadrado. En el caso donde la frecuencia de las celdas era menor de 5 se aplicó la misma prueba pero con corrección de Yates y aquellas matrices cuyos valores cero excedían del 50 % se aplicó la prueba exacta de Fisher.

Se consideró un valor estadístico significativo si  $P < 0,05$  y altamente significativo si  $P < 0,01$ .

Todos los datos fueron procesados con el programa SPSS 9.0<sup>®</sup> para Microsoft<sup>®</sup> Windows 95.

## RESULTADOS

Del total de 92 casos registrados en el registro de datos para carcinoma escamoso, sólo 52 (56,52 %) se consideraron para el análisis. La proporción de hombres fue de 84 % (81 hombres) y de mujeres 11,96 %. La edad promedio de los pacientes del estudio fue de  $51,3 \pm 11,6$  años. De los 92 pacientes que participaron en el estudio 82,61 % manifestó tener hábitos alcohólicos, mientras que 95,47 % manifestó tener hábitos tabáquicos.

Más de 1/3 de las lesiones (34,78 %) se ubicó en el piso de la boca, esto seguido por 31 (33,7 %) en la lengua móvil, 13 (14,13 %) en el trigono retro molar y 17,39 % en otras localizaciones. La frecuencia de resultados positivos en la inmunohistoquímica fue el siguiente: PCNA: 47 pacientes (90,4 %), p21: 33 pacientes (63,5 %), Ki-67: 28 pacientes (53,8 %), p53: 25 pacientes (48,1 %) y por último el c-erbB2 con 2 pacientes (3,8 %).

El tamaño tumoral fue más frecuente el T3 (44,8 %), la menor proporción se encontró en T1 (8,7 %). Un tercio de la muestra tuvo tamaño tumoral T de (33,3 %).

Un 39,6 % de los pacientes presentó enfermedad ganglionar N2, N3 estuvo en 9,8 % de los 92 pacientes y N0 en 27,1 %.

A pesar de que hubo mucha proporción de pacientes que manifestaron tener hábitos de alcohol y consumo de tabaco, en la molécula de proliferación PCNA, no hubo relación estadísticamente significativa (60,8 % y 66,7 % respectivamente). Dicha proporción descende para p21 (44,9 % y 51 %) y el Ki-67 (36,7 % y 40,8 %). El p53 es similar la proporción (34,6 %), mientras que apenas un 1,9 % de los pacientes que ingería alcohol resultó positivo para el c-erbB2.

Más del 60 % de los pacientes se presentó en estadios IV, 16,1 % estadio III, 13,2 % estadio I y 10,2 % estadio II.

En relación al tratamiento recibido un 82,4 % fue sometido a cirugía, 79,5 % a radioterapia y un 66,9 % a quimioterapia. De las combinaciones del tratamiento, un 10,9 % recibió las tres modalidades de tratamiento en forma combinada.

Un 59,8 % de las muestras histopatológicas tenían un grado de diferenciación moderado, mientras que sólo un 6,6 % poco diferenciado. El resto 33,6 %, tuvo un buen grado de diferenciación. El grado nuclear que predominó fue el G2 (73,5 %), G3 16,8 % y sólo 9,7 % para G1. Un 55,6 % de los casos tuvo necrosis del

tumor, mientras que 26,6 % tuvo necrosis escasa. La necrosis severa estuvo presente en el 17,8 % de los pacientes. La relación con las variables está representada en el (Cuadro 1).

## DISCUSIÓN

La localización del carcinoma escamoso en la cavidad oral en los pacientes del Hospital Oncológico “Padre Machado” fue el piso de la boca (34,6 %) seguido de la lengua móvil (32,7 %) y la modalidad terapéutica más empleada fue la cirugía. La edad promedio para estos pacientes fue de 51 años y el sexo masculino fue el predominante.

En el presente estudio, la expresión de la proteína p53 en pacientes con carcinoma escamoso de la cavidad oral fue del 48,1 %.

En la literatura el gen p53 fue reportado en un rango de 40 % -80 % en tumores de cabeza y cuello <sup>(13)</sup>.

La expresión de este biomarcador en relación con antecedentes de consumo de tabaco está por el orden del 34,6 % con una  $P = 0,3346$  no significativa. Sin embargo, existe una fuerte asociación entre la sobre expresión de p53 y hábito tabáquico en cáncer de cabeza y cuello. También existe la asociación de este gen y el consumo de alcohol. La presencia de p53 en nuestros pacientes estuvo por el orden del 34,6 % ( $P = 0,3346$ ).

En cuanto a la relación del estadio clínico y la presencia de p53 en el presente estudio tampoco representó ser una variable significativa ( $P = 0,8177$ ) y la mayoría estaba en los estadios III y IVA. Lam reporta la mayor frecuencia en estadio IV con una ( $P = 0,21$ ) <sup>(24)</sup>.

**Cuadro 1.** Relación de las variables con los oncógenes y moléculas de proliferación

| Variables               | p53    | CerbB2 | Valor de P<br>p21 | Ki-67  | PCNA   |
|-------------------------|--------|--------|-------------------|--------|--------|
| Sexo                    | 0,4229 | 0,7064 | 0,3038            | 0,2356 | 0,9813 |
| Hábito tabáquico        | 0,3346 | 0,5868 | 0,8840            | 0,5977 | 0,5977 |
| Hábito alcohólico       | 0,8662 | 0,5630 | 0,6023            | 0,4429 | 0,4429 |
| Localización            | 0,1437 | 0,2934 | 0,0922            | 0,1543 | 0,2152 |
| Estadio                 | 0,8177 | 0,7435 | 0,1780            | 0,9538 | 0,9700 |
| Permeación vascular     | 0,0003 | 0,0000 | 0,0142            | 0,0146 | 0,0996 |
| Grado de diferenciación | 0,0026 | 0,0144 | 0,0000            | 0,0037 | 0,0015 |
| Necrosis                | 0,1357 | 0,1016 | 0,8969            | 0,3257 | 0,2930 |
| Grado nuclear           | 0,0959 | 0,2570 | 0,7015            | 0,2570 | 0,6958 |

Estos resultados también lo corrobora una revisión de varios estudios de esta proteína como predictor <sup>(10)</sup>.

Otro punto importante para la proteína p53 y su expresión en el presente trabajo fue su relación con la presencia de permeación vascular ( $P = 0,0003$ ) y el grado de diferenciación ( $P = 0,0026$ ). Estos factores son también predictivos, en forma independiente, en cáncer oral en relación con márgenes tumorales infiltrados <sup>(26)</sup>.

La expresión de la proteína p21 en pacientes con cáncer escamoso de la cavidad oral en el Hospital Oncológico "Padre Machado" fue de 63,5 %. Recientemente se ha reportado que este oncogén fue expresado en cáncer de la cavidad oral en un rango del 70 % -80 % y en displasias epiteliales orales en un rango de 60 % - 90 %; esto sugiere que la expresión de esta proteína está asociada con la iniciación de la diferenciación en mucosa oral normal <sup>(22)</sup>.

La asociación de este gen con el consumo de alcohol y tabaco en el grupo de pacientes estudiados en este trabajo de investigación no fue significativa ( $P = 0,6023$  y  $P = 0,8840$  respectivamente). Sin embargo en la literatura, el alto consumo de tabaco y alcohol está correlacionado con expresión de la proteína p21. La incidencia de las mutaciones ras p21 está presente en aproximadamente 5 % de los pacientes con carcinoma escamoso de cabeza y cuello en EE.UU y Europa Occidental. En la India, la prevalencia fue de 35 % y está en relación directa con consumo de alcohol y tabaco.

El estadio clínico en correlación con la presencia de p21 en este trabajo no fue significativo ( $P = 0,1780$ ), pero se relaciona con un pronóstico favorable en carcinoma escamoso de cabeza y cuello y quizás represente un importante evento en estadios tempranos <sup>(16)</sup>.

La permeación vascular y el grado de diferenciación fue significativa en este estudio ( $P = 0,0142$  y  $P = 0,0000$ ) respectivamente, en correlación con la presencia de p21 en pacientes con tumores de la cavidad oral. La presencia

del oncogén c-erbB2 en esta investigación fue de 3,8 % (apenas 2 pacientes de 52 en estudio). En series revisadas, este oncogén estuvo presente en 60 % de los especímenes, pero no hubo correlación entre el c-erbB2 y los parámetros clínico-patológicos de sobrevida y su interpretación en el marcaje citoplasmático en carcinomas escamosos de cavidad oral se pone en duda <sup>(16,21)</sup>. En este estudio, la minoritaria muestra de pacientes que marcaron este oncogén (2/52) hace realmente difícil emitir un juicio en relación a la aplicación clínica de esta proteína en especímenes de bloques de parafina.

Las moléculas de proliferación celular que se evaluaron en este trabajo son el PCNA y Ki-67 y la presencia de estos marcadores fue de 90,4 % y 53,8 % respectivamente. La correlación con variables como consumo de tabaco e ingesta de alcohol no fue estadísticamente significativa.

En un estudio japonés, el marcaje de Ki-67 fue asociado con estatus nodal y fue un fuerte pronosticador en el modelo multivariable <sup>(10)</sup>. En este trabajo el estatus nodal fue estadísticamente significativo en pacientes que presentaron marcaje para Ki-67 y PCNA. La presencia de Ki-67 fue indicador de sobrevida para aquellos pacientes que se trataron con quimioterapia y radioterapia <sup>(10)</sup>. En contraste, la expresión del PCNA fue asociado con pobre respuesta a la quimioterapia en un estudio reciente de 32 pacientes con cáncer oral <sup>(10)</sup>.

La permeación vascular y el grado histológico representan factores pronósticos independientes para metástasis a distancia en pacientes con cáncer de cabeza y cuello. Esto lo revela un estudio de 1 268 pacientes realizado en la Universidad de Québec, Canadá. Se concluyó que aquellos pacientes con grado histológico moderado con cuello N3 o pacientes con grado histológico III y N1 son pacientes de alto riesgo para metástasis a distancia <sup>(18)</sup>.

Como conclusión: La molécula de proliferación PCNA y el oncogén p21, fueron los biomarcadores que con mayor frecuencia

se presentaron en el grupo de estudio. La permeación vascular y el grado histológico representan datos estadísticamente significativos para todos los biomarcadores en estudio. El marcaje del oncogén c-erbB2 no es adecuado en los corte de parafina para los pacientes con carcinoma escamoso de la cavidad oral. El estatus nodal fue un factor pronóstico estadísticamente significativo con la presencia de moléculas de proliferación PCNA y Ki-67. La edad más frecuente fue la quinta década de la vida. El sexo

masculino representó 2/3 aproximadamente del grupo en estudio. La localización más frecuente de estas neoplasias fue el piso de la boca seguido de la lengua móvil.

El hábito alcohólico y tabáquico representaron alto porcentaje de presentación, pero no representó un dato estadísticamente significativo cuando se correlacionó con los oncógenes p21, p53, y c-erbB2 y las moléculas de proliferación celular PCNA y Ki67.

## REFERENCIAS

1. Thawley P. Comprehensive Management of head and neck cancer. 2ª edición. Filadelfia: Lippincott; 1999;1:345.
2. David S. Molecular biology of head and neck cancer. En: De Vita J, Hellmann S, Rosenberg S, editores. Cancer Principles and Practice of Oncology. 6ª edición. Filadelfia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.p.789-796.
3. Alvarez V. First World Congress on Head and Neck Oncology. Madrid, España. Noviembre, 1998.
4. Myers S. Cancer of the head and neck. 3ª edición. Nueva York, NY: D Publisher; 1996.
5. Larson S. Management of the mandible in oral cancer. Semin Surg Oncol. 1995;11:190-199.
6. Byers A. Factor affecting of the initial the radiotherapy in oral cancer. Semin Surg Oncol. 1995;11:183-189.
7. Cancer of the head and neck. A collection of selected paper from the head and neck service 1976-1994. Memorial Sloan-Kettering Center New York. 1995.
8. Burns J, Claek L, Mirchell G, Soutar D, Parkinson E. Maintenance of identical p53 mutations throughout progression of squamous cell carcinomas of the tongue. Oral Oncol. 1994;30(5):335-337.
9. Chang K, Lins S, Kwan P, Wong Y. Association of aberrant p53 and p21 Waf1 immunoreactivity with the outcome of oral verrucous leukoplakia in Taiwan. J Oral Pathol Med. 2000;29:56-62.
10. Dijkema I, Struikmans H, Pullens H, Kal H, Van der Tweel I, Battermann J. Influence of p53 and bcl-2 on proliferative activity and treatment outcome in head and neck cancer patients. Oral Oncol. 2000;36:54-60.
11. Shilitoe EJ, Scully C. Oral Cancer research in the new millennium. Oral Oncol. 2000;36:1-2.
12. Min B, Baek J, Shin K, Guyuluva C, Cherrick H, Park N. Inactivation of the p53 gene by either mutation or HPV infection is extremely frequent in human oral squamous cell carcinoma cell line. Oral Oncol. 1994;30(5):338-345.
13. Field J. Oncogenes and tumor suppressor genes in squamous cell carcinoma of the head and neck. Oral Oncol. 1992; 288 (1): 67-76.
14. Casado S, Dominguez S, Abad T, Del Campo J, Forteza J, Lopez R. Prognostic value of the expression of p53, Bax and bcl-2 oncoproteins in assessing the response of neoadjuvant chemo radiotherapy in advanced head and neck cancer. Proc Am Soc Clin Oncol. 2000;19:416a, (abstr 1644).
15. Fortin A, Albert M, Eric V, Josee A. Histological grade as an independent predictor of distant metastases in head and neck cancer. Proc Am Soc Clin Oncol. 2000;19:416a, (abstr 1647).
16. Hittelman W, Shin D, Mad L, Papadimitra V, Lee J, El-Naggar A, et al. Pretreatment biomarkers predict response of advanced head and neck premalignant lesions to biochemoprevention. Proc Am Soc Clin Oncol. 2000; 19:414a, (abstr 1636).

17. Pivot X, Poissonet G, Dassonville O, Guardiola E, Jean R, Foa C, et al. Analysis of overall survival clinical prognostic factor for patients with locally recurrent or metastasis head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Am Soc Clin Oncol*. 2000;19: 414a, (abstr 1634).
18. Werkmeister R, Brandt B, Joos U. Clinical relevance of ErbB-1 and -2 oncogenes in oral carcinomas. *Oral Oncol*. 2000;36:100-105.
19. Harada K, Ogden G. An overview of the cell cycle arrest protein p21. *Oral Oncol*. 2000;36:3-7.
20. Castle J, Cardinal M, Kratochuil F, Abbondanzo S, Kessler H, Auclair P, et al. P53 and cyclin D1 staining patterns of malignant and premalignant oral lesions in age-dependent populations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1999;88(3):326-332.
21. McDonald CJ. Cancer Statistics 1999: Challengers in minority populations. *Ca Cancer J Clin*. 1999;49(1):6-31.
22. Kusakawa J, Suefuji Y, Ryu F, Noguchi R, Iwamoto A, Kasmeyana T. Dissemination of cancer cell into circulation occurs by incision biopsy of oral squamous cell carcinomas. *Oral Pathol Med*. 2000; 29:303-307.
23. Bankfalvi A, Piffko J. Pronostic and predictive factors in oral cancer: The role of the invasive tumor front. *Oral Pathol Med*. 2000;29:291-298.
24. Lam K, Ng I, Yuen A, Kwong D, Wei W. Cyclin D1 expression in oral squamous cell carcinomas: Clinic pathological relevance and correlation with p53 expression. *Oral Pathol Med*. 2000;29:167-172.
25. Carter G. The association of human papilloma virus and oral cancer in a Greek study group. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 2000; 87(4):457-458.
26. Moret Y, Rivera H, Menolascino F, Abreu C. Immunohistochemical analysis of protein p53 in oral mucosal epithelial dysplasia in Venezuelans. *J Oral Pathol Med*. 1999; 29:352.
27. Zheng X, Hu L, Chen F, Christensson B. Expression of Ki67 antigen, epidermal growth factor receptor and Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein (LMP1) in nasopharyngeal carcinoma. *Oral Oncol*. 1994;30(5):290-295.