

# p53 codon 72 polymorphism association with head and neck squamous cell carcinoma

*Associação entre carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço e polimorfismo no p53 (códon 72)*

Zahra Mojtahedi <sup>1</sup>, Seyed Basir Hashemi <sup>2</sup>, Bijan Khademi <sup>3</sup>, Morteza Karimi <sup>4</sup>, Mohammad Reza Haghshenas <sup>5</sup>, Mohammad Javad Fattahi <sup>6</sup>, Abbas Ghaderi <sup>7</sup>

## Keywords:

genes,  
head and neck  
neoplasms,  
prognosis,  
tumor suppressor.

## Abstract

**P**<sub>53</sub> tumoral suppressor gene harbors a functional polymorphism which codes either arginine (Arg) or proline (Pro) in the protein p53 of codon 72. Such polymorphism has been associated with the development or prognosis of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). **Aim:** we assessed codon 72 p53 allelic frequencies and genotypes in HNSCC Iranian patients. **Study design:** Case Study. **Materials and Methods:** a total of 132 HNSCC patients and 123 healthy controls were genotyped. DNA source was from mononuclear cells of the peripheral blood. DNA amplification was done by means of the allele-specific polymerase chain reaction. **Results:** genotypes and allele distribution were not significantly different between patients and controls. Moreover, no statistically significant association was found between the 72 and p53 codon tumor location, gender or age at the time of diagnosis. However, the Pro/Pro genotype was significantly increase in stage IV patients (30.8%) when compared to stages I-III of the disease (11.1%) (p=0.03), and a significantly higher percentage of patients with the Pro allele had and a risk increase in stage IV disease (OR=2.2, 95% CI=1.2-4.2, p=0.01). **Conclusion:** data revealed that the p53 polymorphism do not impact the risk of HNSCC in Iranians, nonetheless, it can affect tumor progression to a higher tumor stage.

## Palavras-chave:

genes,  
neoplasias de cabeça e  
pescoço,  
prognóstico,  
supressor tumoral

## Resumo

**O** gene supressor tumoral p53 abriga um polimorfismo funcional que codifica ou arginina (Arg) ou prolina (Pro) no códon 72 da proteína p53. Este polimorfismo tem sido considerado associado com o desenvolvimento e prognóstico do carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECP). **Objetivo:** Foram avaliados genótipo e freqüências alélicas do códon 72 do p53 em pacientes iranianos com CECP. **Tipo de Estudo:** Estudo de Caso. **Materiais e Métodos:** Um total de 132 pacientes com CECP e 123 controles saudáveis foram genotipados. A fonte de DNA foi composta de células mononucleares do sangue periférico. A amplificação do DNA foi realizada através da reação em cadeia da polimerase específica para alelos. **Resultados:** A distribuição dos alelos e genótipos não foi significativamente diferente entre os pacientes e controles. Além disso, nenhuma associação estatisticamente significativa foi encontrada entre o polimorfismo do códon 72 do p53 e localização, sexo ou idade no momento do diagnóstico. No entanto, o genótipo Pro/Pro estava significativamente aumentado em pacientes no estágio IV (30,8%) quando comparado ao estágio I-III da doença (11,1%) (p=0,03), e um número significativamente maior de doentes com o alelo Pro teve um aumento no risco de desenvolver doença no estágio IV (OR=2,2, IC= 95% =1.2-4.2, p=0,01). **Conclusão:** Os dados revelaram que o polimorfismo do p53 não afeta o risco de CECP em iranianos; porém, pode afetar a progressão para um estágio superior tumor.

<sup>1</sup> Dr. (Professor Assistente - Instituto Shiraz de Pesquisa do Câncer - Universidade de Ciências Médicas de Shiraz, Shiraz, Iran.)

<sup>2</sup> Dr. (Professor Assistente, Departamento de Cirurgia de Ouvidos, Nariz e Garganta - Hospital Khalili, Universidade de Ciências Médicas de Shiraz, Shiraz, Iran.)

<sup>3</sup> Professor. (Professor, Departamento de Cirurgia de Ouvidos, Nariz e Garganta - Hospital Khalili, Universidade de Ciências Médicas de Shiraz, Shiraz, Iran.)

<sup>4</sup> Dr. (PhD, Departamento de Cirurgia de Ouvidos, Nariz e Garganta - Hospital Khalili, Universidade de Ciências Médicas de Shiraz, Shiraz, Iran.)

<sup>5</sup> Mestrado - (MSc, Instituto Shiraz de Pesquisa do Câncer - Universidade de Ciências Médicas de Shiraz, Shiraz, Iran.)

<sup>6</sup> Mestrado (MSc, Instituto Shiraz de Pesquisa do Câncer - Universidade de Ciências Médicas de Shiraz, Shiraz, Iran.)

<sup>7</sup> Professor. (Diretor do Instituto Shiraz de Pesquisa do Câncer - Universidade de Ciências Médicas de Shiraz, Shiraz, Iran.)

Este artigo foi submetido no SGP (Sistema de Gestão de Publicações) da BJORL em 17 de abril de 2009. cod. 6357

Artigo aceito em 24 de agosto de 2009.

---

## INTRODUÇÃO

---

Carcinomas de cabeça e pescoço representam um grupo de tumores malignos originários do trato aerodigestivo superior, incluindo a cavidade oral, faringe e laringe. Mais de 90% dos carcinomas de cabeça e pescoço são carcinomas espinocelulares e originam dos tecidos epiteliais dessas regiões<sup>1</sup>.

A incidência de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECP) exibe ampla variação geográfica, com 500.000 novos casos em todo o mundo, sendo mais frequente em países em desenvolvimento. O tabagismo e a ingestão de bebida alcoólica são reconhecidos como os mais comuns carcinógenos para CECP. Entretanto, fatores ambientais podem ser amplamente influenciados pela carga genética do paciente<sup>1,2</sup>.

O gene supressor tumoral p53 é um fator de transcrição de ligação específico de uma sequência de DNA que age como principal controle celular de crescimento e divisão. Células normais expressam baixa concentração dessa proteína nuclear em forma inativa; entretanto, em resposta a uma ampla variedade de estresse celular, tais como danos ao DNA, hipóxia ou depleção de grupos de ribonucleosídeos-trisfosfato o p53 é ativado e expressado em excesso. Após ativação, o p53 media ou 1) interrupção do ciclo celular para permitir o reparo do DNA, ou 2) apoptose para remover células com danos irreparáveis<sup>3</sup>.

O Gene p53, localizado na banda cromossômica 17p13.1, é susceptível à mutação somática que estimase ocorrer em 50% de todos os cânceres em humanos<sup>3</sup>. A maioria dessas mutações causa dramáticos defeitos funcionais no p53. Contrastando a isso, espera-se que apenas uma pequena fração de polimorfismos hereditários causem distúrbios detectáveis à função do p53<sup>3,4</sup>. O polimorfismo no exon 4 do Códon 72 é o polimorfismo de p53 mais comumente estudado, é aquele que codifica ou arginina (Arg) ou prolina (Pro). Especula-se que essas variações alteram a estrutura e a função da proteína p53. Por exemplo, o alelo Pro induz apoptose com cinética mais lenta e reprime transformações menos eficientes quando comparado ao alelo Arg<sup>5</sup>.

Tentativas de definir as associações do polimorfismo do códon 72 do p53 com a susceptibilidade ou progressão do câncer têm levado a resultados inconsistentes em diferentes etnias e diferentes tipos de câncer, incluindo CECP<sup>6-11</sup>. Já que não há dados para pacientes iranianos com CECP, investigamos a associação entre a susceptibilidade CECP e o polimorfismo no códon 72 do p53 em um estudo caso-controle. Além disso, avaliamos a associação entre esse polimorfismo e gênero, localização do tumor, idade e estágio da doença quando do diagnóstico.

---

## PACIENTES E MÉTODOS

---

### Pacientes

Todos os participantes foram informados que amostras de sangue seriam usadas para genotipagem, e consentiram em participar do estudo. O Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Shiraz aprovou esse estudo. A Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Shiraz é uma instituição terciária financeiramente mantida pelo Ministério da Saúde e Educação Médica do Iran.

Recrutamos um total de 132 pacientes com CECP (97 homens e 35 mulheres; idade média de 56,6±14,1 anos) no Hospital Universitário (Hospital Khalili) da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Shiraz, Iran. O diagnóstico de CEC foi confirmado para todos os pacientes pela histopatologia. Obtivemos as características dos pacientes, incluindo gênero, localização tumoral, idade ao diagnóstico, metástases e estadiamento clínico TNM a partir de seus registros médicos. O tumor estava localizado na cavidade oral em 52 casos (39,4%), na faringe em 15 casos (11,4%) e na laringe em 65 casos (49,2%). A idade média de início da doença foi 55,9±13,1 anos, variando entre 19 e 83 anos. O estágio da doença foi determinado de acordo com a classificação TNM. O grupo-controle envolveu 123 voluntários saudáveis (93 homens e 30 mulheres; idade média 58,7±12,4 anos), que residiam na mesma região dos pacientes. Os indivíduos do grupo controle não tinham qualquer tipo de câncer ou parente de primeiro grau com história de câncer. Todos os participantes falavam persa como língua nativa.

### Preparação do DNA e Reação em Cadeia da Polimerase

Amostras sanguíneas foram coletadas em tubos contendo EDTA e o DNA genômico foi extraído de leucócitos através do método de salting out<sup>12</sup>. Brevemente, as células sanguíneas foram primeiro tratadas com uma solução de lise de hemáceas (155 mM NH<sub>4</sub>Cl e 10 mM NaHCO<sub>3</sub>) e separadas dos leucócitos por centrifugação. Posteriormente, os leucócitos foram lisados em uma solução tampão de lise nuclear (10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl e 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8,2). O lisado celular foi digerido à noite a 37°C por 10% SDS e uma solução de proteinase K (1 mg proteinase K em 1% SDS e 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA). NaCl saturado (aproximadamente 6M) foi então acrescentado aos tubos que foram agitados vigorosamente, seguido de centrifugação. A proteína precipitada foi deixada, e o sobrenadante contendo o DNA foi transferido para outro tubo e misturado a etanol. Esses tubos foram invertidos várias vezes até o DNA precipitar. As fitas de DNA precipitado foram transferidas para uma micro-centrífuga de 1,5 ml contendo tampão TE (10 mM Tris-HCl, 0,2 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7,5). O DNA ficou 2 horas dissolvendo a 37°C antes da quantificação.

Amplificamos o DNA através do método de reação em cadeia da polimerase alelo-específico, como previamente descrito<sup>13</sup>. Usamos dois conjuntos de primers para

detectar os alelos Pro e Arg. As seqüências de nucleotídeos para os primers específicos para p53-Arg foram 5'- TCC CCC TTG CCG TCC CAA-3' (primer dianteiro) e 5'-CTG GTG CAG GGG CCA CGC-3' (primer reverso). As seqüências de primers para amplificação do alelo Pro foram 5'-GCC AGA GGT TGC TCC CCC-3' (primer dianteiro), e 5'-CGT GCA AGT CAC AGA CTT-3' (primer reverso).

Cada amostra foi amplificada por cada conjunto de primers em tubos separados contendo 0,3 mmol/L dNTPs, 1,5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 2 U Taq polimerase, e 1× tampão (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8,4, e 50 mmol/L KCl) (volume total de 25 µL). A amplificação foi feita em 35 ciclos, através de um programa de touch-down: desnaturação a 94°C durante 30 segundos, recozimento a 68-62°C por 10 ciclos e 62-58°C para os 25 ciclos remanescentes, com extensão a 72°C por 30 segundos em cada ciclo. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% (invitrogen, UK) e corados com brometo de etídio. O produto da PCR foi 177 bp para o alelo Pro e 141 bp para o alelo Arg.

### Análise estatística

As freqüências genotípicas foram testadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Adaptação ao equilíbrio foi verificada através do teste qui-quadrado. Os dados foram analisados através do software SPSS (versão 11.5.0; SPSS, Chicago, IL, EUA). As diferenças na idade média dos pacientes com diferentes genótipos no códon 72 do p53 foram calculadas através da análise de variância de uma via (ANOVA). Outras análises foram feitas através do teste de qui-quadrado. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas a um valor de P menor do que 0,05. O odds ratio (OR) e o intervalo de confiança (IC) de 95% foram calculados através do método de Mantel-Haenszel para estimar o risco relativo associado aos alelos.

## RESULTADOS

As freqüências de genótipos não diferiram significativamente daquelas esperadas, de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg em pacientes ou indivíduos do grupo controle. As freqüências dos genótipos Arg/Arg, Arg/Pro, e Pro/Pro foram: 37,1%, 47,7%, e 15,2% em pacientes com CECP; e 35,8%, 51,2%, e 13,0% em controles, respectivamente (Tabela 1). A freqüência do alelo Arg foi de 61,0%, e 61,4% em pacientes e controles, respectivamente. A freqüência do alelo Pro foi de 39,0% em pacientes e 38,6% em controles. Não houve diferença estatisticamente significativa na freqüência genotípica entre o grupo de pacientes e o grupo controle (p=0,82). As freqüências de alelos não foram significativamente diferentes entre os dois grupos (p=0,92).

As associações entre genótipos do códon 72 do p53 e gênero, idade ao diagnóstico, localização do tumor, metástases e estadiamento clínico TNM estão resumidos

na Tabela 2. A única associação significativa com a distribuição de diferentes genótipos foi encontrada para estadiamento tumoral (p=0,03). O genótipo Pro/Pro foi mais frequentemente encontrado em pacientes no estágio IV do que naqueles com doença no estágio (I-III) (p=0,032). Apesar da freqüência desse genótipo estar aumentada

**Tabela 1.** Freqüências alélicas e genótipo do polimorfismo no códon 72 do p53 em 132 pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço e 123 controles saudáveis.

	Pacientes	Controles
	n (%)	n (%)
<b>Alelos</b>		
Arginina	161 (61.0)	151 (61.4)
Prolina	103 (39.0)	95 (38.6)
<b>Genótipos</b>		
Arginina/Arginina	49 (37.1)	44 (35.8)
Arginina/Prolina	63 (47.7)	63 (51.2)
Prolina/Prolina	20 (15.2)	16 (13.0)

Não encontramos diferença estatisticamente significativa entre pacientes e controles em qualquer uma das comparações, calculados a partir dos testes qui-quadrados em tabelas 2 × 3 ou 2 × 2.

**Tabela 2.** Associação entre as características clínico-patológicas de 132 pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço e genótipos de polimorfismo do códon 72 do gene p53

Características	Genótipos			Valor p <sup>a</sup>
	Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro	
Idade média ± DP (anos)	57,4 ± 12,5	55 ± 14,7	54,6 ± 9,8	0,63
Gênero, n (%)				0,98
Homens	36 (37,1)	46 (47,4)	15 (15,5)	
Mulheres	13 (37,1)	17 (48,6)	5 (14,3)	
Localização tumoral				0,27
Cavidade oral	16 (30,8)	30 (57,7)	6 (11,5)	
Faringe	4 (26,7)	8 (53,3)	3 (20,0)	
Laringe	29 (44,6)	25 (38,5)	11 (16,9)	
Metástases <sup>b</sup>				0,07
Negativo	37 (38,9)	46 (48,5)	12 (12,6)	
Positivo	3 (30,0)	3 (30,0)	4 (40,0)	
Estágio tumoral <sup>p</sup>				0,03
I-III	35 (43,2)	37 (45,7)	9 (11,1)	
IV	6 (23,1)	12 (46,1)	8 (30,8)	

<sup>a</sup>O valor p das diferenças em média de idade foi calculado pelo ANOVA; outros valores p foram calculados através do teste do qui-quadrado.

<sup>b</sup>A soma não é igual a 100% por cause de alguns poucos valores faltosos.

em pacientes com metástases, o aumento não alcançou significado estatístico ( $p=0,07$ ).

Como mostrado na Tabela 3, as frequências dos alelos Pro e Arg foram 28 (53,8%) e 24 (46,2) nos pacientes do estágio IV, e 55 (34,0%) e 107 (66,9) em pacientes com doença no estágio I-III; essa diferença foi também significativa ( $p=0,01$ ), e portadores do alelo Pro tiveram risco 2,2 vezes maior de serem diagnosticados com estágio IV (95% IC = 1,2-4,2).

**Tabela 3.** Frequência alélica do polimorfismo do códon 72 do gene p53 em relação ao estágio tumoral

Alelo	Estágio I-III	Estágio IV	Valor de p	OR (95% CI)a
Arg	107 (66.0)	24 (46.2)	0.01	2.2 (1.2-4.2)
Pro	55 (34.0)	28 (53.8)		

aOdds ratio com intervalo de confiança de 95% calculado através do método Mantel-Haenszel.

## DISCUSSÃO

O gene supressor tumoral p53 participa do reparo do DNA, do ciclo celular, da transcrição gênica e da apoptose<sup>3,4</sup>; assim, ele representa um importante fator na tentativa de explicar a susceptibilidade ao CECP e variações inter-individuais no tocante a prognóstico. O polimorfismo no códon 72 Arg/Pro do p53 é um polimorfismo funcional cuja distribuição genotípica é significativamente diferente entre diferentes grupos étnicos. Já foi demonstrado que a frequência do alelo Pro varia de 17% em Saamis Suecos a 63% em Negros Africanos (Nigerianos), e a proporção dos portadores do alelo Arg é mais alta em populações que vivem mais longe do equador da Terra<sup>14</sup>. A associação desse polimorfismo com câncer, incluindo o CECP em diferentes etnias é ainda muito controversa<sup>6-11</sup>. Por exemplo, o polimorfismo do códon 72 do gene p53 esteve significativamente associado ao CECP em populações Italianas<sup>8</sup>, mas não em populações Indianas<sup>9</sup>. A alta variabilidade do polimorfismo Arg/Pro do códon 72 do p53 entre populações tem sido mencionado para explicar diferenças observadas no códon 72 em pessoas com câncer de diferentes etnias<sup>7</sup>. Parece que a correlação entre o códon 72 e o câncer deveria ser determinada em cada população.

Comparamos as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo Arg/Pro do códon 72 do p53 em pacientes com CECP e indivíduos saudáveis em uma população do Irã meridional. Pelo nosso conhecimento, essa é a primeira tentativa de identificar associações entre esse polimorfismo e características clínicas e prognósticas na população iraniana. Não encontramos diferenças significativas em genótipo ou frequência alélica entre os pacientes e os controles saudáveis. Entretanto, o genótipo Pro/Pro e o alelo Pro, associados à cinética mais lenta da apoptose e supressão menos eficiente da transformação do que o

alelo Arg5, estavam significativamente aumentados em pacientes com doença mais avançada. Segundo nossos resultados, poder-se-ia argumentar que o efeito do alelo Pro pode ser mais pronunciado na progressão do câncer do que na formação deste. Apesar dos alelos Pro e Arg terem algumas diferenças em suas capacidades de induzir apoptose e supressão de transformação, eles não diferem em atividades de ligação específica de sequência de DNA5. Curiosamente, mutações no p53 encontradas em 50-55% de todos os cânceres em humanos com importante papel na formação do câncer selecionam fortemente para proteínas p53 com defeitos para se ligar ao DNA3. Concordando com nossos resultados, Tu et al. em uma população tailandesa não encontraram associação entre polimorfismo no códon 72 do p53 e susceptibilidade ao carcinoma espinocelular oral, mas descobriu que o polimorfismo no códon 72 do p53 estava associado ao estágio da doença, e à sobrevida geral e livre de doença de pacientes irradiados<sup>10</sup>.

Em nossa população estudada, a distribuição do polimorfismo no códon 72 do p53 não diferiu significativamente entre os pacientes segundo gênero, idade ao diagnóstico ou localização tumoral. As relatadas associações de características do CECP com esse polimorfismo também variam largamente na literatura<sup>10,11</sup>. Por exemplo, enquanto o alelo Pro esteve associado à idade precoce de início do CECP em pacientes caucasianos não-hispânicos<sup>11</sup>, nenhuma associação foi encontrada entre esse polimorfismo e a idade de início da doença em pacientes tailandeses<sup>10</sup>. A via do p53 é composta de muitos genes e uma ampla variedade de sinais de estresse celular que ativam o p53 podem resultar na transcrição de distintos genes<sup>3</sup>. Diferenças em genes p53 que interagem, e também diferenças em sinais de estresse entre várias populações podem representar outras explicações para os diferentes resultados.

## CONCLUSÃO

Em conclusão, detectamos uma significativa associação positiva entre o alelo Pro do códon 72 do p53 e o estágio tumoral, um importante fator prognóstico para CECP. Entretanto, não encontramos associação significativa entre esse polimorfismo e o risco de desenvolvimento de CECP em pacientes iranianos. Precisamos de mais dados de um número maior de pacientes para determinar a possível associação entre o polimorfismo Arg/Pro no códon 72 do p53 e o risco de CECP.

## AGRADECIMENTOS

Esse estudo foi financiado por verbas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Shiraz (Verba num. 83-2102) e do Instituto de Pesquisa de Câncer de Shiraz (Verba num. ICR-82-93). Agradecemos K. Shashok (Autor AID no Leste do Mediterrâneo) pela ajuda na melhoria do manuscrito em inglês.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. Hardisson D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2003;260:502-8.
2. Marur S, Forastiere AA. Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin Proc.* 2008;83:489-501.
3. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 1997;88:323-31.
4. Whibley C, Pharoah PD, Hollstein M. p53 polymorphisms: cancer implications. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(2):95-107.
5. Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol.* 1999;19:1092-100.
6. Khadang B, Fattahi MJ, Talei A, Dehaghani AS, Ghaderi A. Polymorphism of TP53 codon 72 showed no association with breast cancer in Iranian women. *Cancer Genet Cytogenet.* 2007;173:38-42.
7. Hiyama T, Yoshihara M, Tanaka S, Chayama K. Genetic polymorphisms and head and neck cancer risk (Review). *Int J Oncol.* 2008;32:945-73.
8. Perrone F, Mariani L, Pastore E, Orsenigo M, Suardi S, Marcomini B, et al. p53 codon 72 polymorphisms in human papillomavirus-negative and human papillomavirus-positive squamous cell carcinomas of the oropharynx. *Cancer.* 2007;109:2461-5.
9. Tandle AT, Sanghvi V, Saranath D. Determination of p53 genotypes in oral cancer patients from India. *Br J Cancer.* 2001;84:739-42.
10. Tu HF, Chen HW, Kao SY, Lin SC, Liu CJ, Chang KW. MDM2 SNP 309 and p53 codon 72 polymorphisms are associated with the outcome of oral carcinoma patients receiving postoperative irradiation. *Radiother Oncol.* 2008;87:243-52.
11. Shen H, Zheng Y, Sturgis EM, Spitz MR, Wei Q. P53 codon 72 polymorphism and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control study. *Cancer Lett.* 2002;183:123-30.
12. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16:1215.
13. Soultzis N, Sourvinos G, Dokianakis DN, Spandidos DA. p53 codon 72 polymorphism and its association with bladder cancer. *Cancer Lett.* 2002; 179: 175-83.
14. Beckman G, Birgander R, Sjölander A, Saha N, Holmberg PA, Kivela A, et al. Is p53 polymorphism maintained by natural selection?. *Hum Hered.* 1994;44:266-70.