

TRABAJOS ORIGINALES

Metilación de *p16* en pacientes intervenidos de cáncer colorrectal tras un largo periodo de seguimiento

Silvia Veganzones de Castro¹, Sara Rafael Fernández¹, Marta Vidaurreta Lázaro¹, Virginia de la Orden¹, Beatriz Mediero Valeros¹, Cristina Fernández² y María Luisa Maestro de las Casas¹

¹Unidad de Genómica, Análisis Clínicos. ²Unidad de Investigación. Hospital Clínico San Carlos. Madrid

RESUMEN

Introducción: el gen *p16* está implicado en la regulación del ciclo celular y se considera un importante gen supresor de tumores.

Objetivos: se han descrito diferentes mecanismos de inactivación génica, en este estudio nos hemos centrado en la metilación del promotor del gen *p16*. En el cáncer colorrectal la metilación de *p16* es una alteración frecuente.

Material y métodos: se incluyeron 326 pacientes con cáncer colorrectal esporádico. El ADN se extrajo de muestras tumorales obtenidas durante la cirugía. La metilación del promotor se analizó mediante un proceso de modificación con bisulfito y posterior PCR cuantitativa específica para metilación. Se analizó la frecuencia de la metilación de *p16* y se comparó con las variables clinicopatológicas.

Resultados: la metilación del gen *p16* se detectó en el 24,8% de los pacientes. La metilación de *p16* se relacionó con el grado de diferenciación y con la localización tumoral: la metilación fue más frecuente en los tumores pobremente diferenciados y tuvo una baja frecuencia en el colon distal. La metilación del promotor de *p16* discrimina un subgrupo de pacientes con mejor pronóstico en los tumores pobremente diferenciados.

Conclusiones: la metilación de *p16* es un evento frecuente en nuestra población y es capaz de inducir diferencias en la supervivencia global de los pacientes con tumores moderadamente diferenciados.

Palabras clave: Gen *p16*. Mutación. Cáncer colorrectal. Pronóstico.

ABSTRACT

Introduction: *p16* gene plays an important role in the cell cycle regulation and is considered an important tumor suppressor gene. Several mechanisms of gene inactivation have been described; in this study we have focused on *p16* gene promoter methylation. In colorectal cancer *p16* gene methylation is a frequent event.

Methods: 326 patients with sporadic colorectal cancer were included. DNA was extracted from tumor tissue samples obtained during the surgical procedure. Promoter methylation was analyzed using bisulfite modification and was detected by quantitative methylation-specific PCR. Frequency of *p16* methylation was analyzed and compared with other clinicopathological variables.

Results: *p16* gene methylation was detected in 24,8% of patients. Methylation was associated with differentiation grade and with tumor location: methylation was frequent in poorly differentiated tumors and had low frequency in distal colon. The *p16* promoter methylation discriminated a subgroup of patients with better prognosis in poorly differentiated tumors.

Conclusions: *p16* methylation was a frequent event in our population and was able to induce differences in the overall survival of patients with poorly differentiated tumors.

Key words: *p16* gene. Methylation. Colorectal cancer. Prognosis.

Veganzones de Castro S, Rafael Fernández S, Vidaurreta Lázaro M, de la Orden V, Mediero Valeros B, Fernández C, Maestro de las Casas ML. Metilación de *p16* en pacientes intervenidos de cáncer colorrectal tras un largo periodo de seguimiento. *Rev Esp Enferm Dig* 2012; 104: 111-117.

INTRODUCCIÓN

Se han realizado grandes esfuerzos para intentar predecir el pronóstico de los pacientes con cáncer colorrectal (1-3). Las investigaciones se han dirigido hacia el conocimiento de los mecanismos genéticos implicados en el desarrollo de la tumorigénesis del cáncer colorrectal. El gen *p16*^{INK4a} actúa como un gen supresor asociado a la tumorigénesis

Recibido: 31-05-2011.
Aceptado: 21-10-2011.

Correspondencia: M.^a Luisa Maestro de las Casas. Departamento de Análisis Clínicos. Hospital Clínico San Carlos. C/ Martín Lagos, s/n. 28040 Madrid.
e-mail: mmaestro.hcsc@salud.madrid.org

cuando se produce su inactivación (4). La inactivación de este gen ocurre con mucha frecuencia por metilación de la región promotora. Aún no está claro el papel de la metilación de *p16* en el pronóstico de los pacientes con cáncer colorrectal.

El gen *p16* es también conocido como CDKN2, MTS1, INK4a y CDK4I. *p16* y está implicado en el control del ciclo celular, actuando como un gen supresor de tumores (4). Este gen está localizado en la región 9p21, comprende 3 exones y codifica para una proteína de 16 kDa. *P16* inhibe el complejo ciclina quinasa D1-CDK4/6, responsable de la fosforilación de la proteína Rb, causando la parada del ciclo celular en la fase G1 (5).

Las alteraciones en la región 9p21 son frecuentes en diferentes tumores en humanos (6). Se han descrito diferentes mecanismos de inactivación del gen *p16*: delección, metilación del promotor y mutaciones puntuales, pero estas alteraciones dependen del tipo de tumor (7). Las mutaciones en *p16* son una alteración poco frecuente en los tumores humanos y una de las causas más frecuentes de inactivación del gen es la pérdida de heterocigosidad en 9p21 (8).

Las regiones de dinucleótidos CG localizadas en la región promotora son llamadas islas CpG. Estas regiones son zonas específicas de metilación y constituyen un importante mecanismo de regulación de la transcripción (9,10). La metilación de la región promotora juega un importante papel en el silenciamiento de los genes supresores de tumores y otros genes implicados en la tumorigénesis. La metilación de novo en la región promotora CpG de los genes *p16*, *CDH1*, *MGMT* y *APC* ha sido descrita en aproximadamente un 30% de tumores colorrectales (11-14).

El objetivo de nuestro estudio fue determinar la prevalencia y analizar la relevancia en el pronóstico de la metilación del promotor del gen *p16* usando una PCR cuantitativa específica de metilación (qMSP) en una amplia cohorte de pacientes operados de cáncer colorrectal (CCR) con un largo seguimiento.

PACIENTES Y MÉTODOS

Obtención de las muestras y extracción del ADN

Nuestra cohorte de pacientes se compuso de 326 pacientes operados consecutivamente en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid entre 1995 y 2000. Se trata de un estudio de cohortes prospectivo. Todos los pacientes fueron intervenidos por el mismo cirujano, que realizó una cirugía radical oncológica en función de la localización del tumor. La cirugía se definió como curativa cuando no se observó tumor macroscópico residual después de la resección. De acuerdo con este criterio, en 269 pacientes (82,5%) se realizó cirugía curativa y en 57 pacientes (17,5%) la cirugía fue paliativa. Fueron excluidos de este estudio los pacientes con tumores metacrónicos, poliposis familiar, enfermedad inflamatoria intestinal y aquellos que cumplían los criterios de poliposis familiar no hereditaria. Ninguno de los pacien-

tes incluidos habían recibido terapia neoadyuvante. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación Clínica del hospital y todos los pacientes firmaron consentimiento informado previo a su inclusión. El seguimiento clínico de los pacientes fue realizado de acuerdo con el protocolo diseñado en nuestro hospital (15). El estadiaje de los tumores se realizó de acuerdo con la clasificación de Dukes. Se definieron como proximales los tumores localizados entre el ciego y el colon transversal y como distales los localizados entre la flexura esplénica el inicio del recto. Los pacientes con tumores en estadios B y C recibieron tratamiento adyuvante con 5-Fluoracilo y leucovorin (75% de los pacientes fueron incluidos). Los pacientes en estadios D fueron tratados de acuerdo con distintos protocolos en función de los criterios del Servicio de Oncología.

Las muestras tumorales y no tumorales fueron obtenidas durante la cirugía y fueron sumergidas inmediatamente en Nitrógeno líquido para su posterior almacenaje a -80 °C. Todas las muestras fueron analizadas de forma independiente por dos patólogos para verificar la presencia de más del 80% de células tumorales.

El ADN para los análisis posteriores, fue extraído de las muestras de tejido empleando el kit DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante.

qMSP

Un µg de ADN genómico fue sometido a modificación con bisulfito empleando el kit Epiect Bisulfito (Qiagen, Hilden, Alemania). El ADN tratado con bisulfito fue amplificando utilizando la técnica qMSP, que se realizó en un termociclador a tiempo real (Smart Cycler, CEPHEID). La calidad de las muestras de ADN y la eficiencia de la reacción fueron comprobadas empleando como referencia interna el gen de diferenciación miogénica 1 (MYOD). También se seleccionó una región de islas CpG sin metilación como control de la reacción de amplificación, independiente del estado de metilación. La relación entre el valor de Ct del gen objeto del estudio y el valor del gen control interno, MYOD, fue utilizado para medir el nivel de metilación relativa (RML = Ct *p16*/Ct MYOD), como había sido descrito anteriormente (16-18). La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 25 µl usando el kit QuantiTect Probe PCR (Qiagen, Hilden, Alemania). Se utilizó 1 µl de ADN modificado con bisulfito, 10 pmol de cada cebador y 5 pmol de cada sonda específica. Los cebadores usados para esta reacción fueron: 5'-TGGAGTTTTTCGGTTGATTGGTT-3' (*p16* sentido), 5'-TCCTCCACGCCCGCAACAA-3' (*p16* antisentido), 5'-CGCCAAGCCCCAGCCCA-3' (sonda *p16*), 5'-GGATTATATTTATGTGGTGGGTGG-3' (MYOD sentido), 5'-TATCTCTCCCCCTAAACCTCAACC-3' (MYOD antisentido) y 5'-TAGGGGATAGAGGGAGGTGTTTAGGTTG-3' (sonda MYOD). Los cebadores y las sondas elegidas para la amplificación de *p16* incluyen 7 islas CpG y 9 puntos para la detección de la modificación con bisulfito

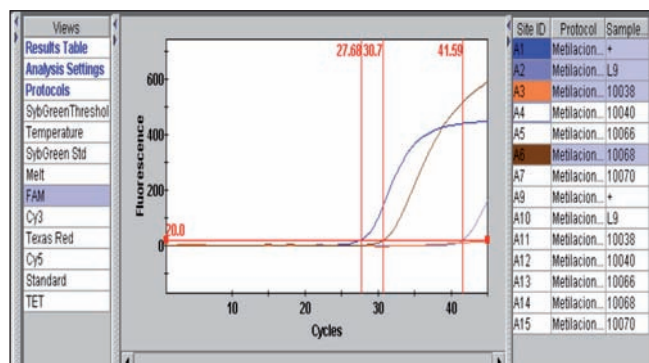


Fig. 1. Curva de desnaturalización que muestra metilación positiva para control positivo (+): azul y muestra 10068 (10068: marrón) y negativa para control negativo: leucocito (L9: gris) y muestra 10038 (10038: naranja).

(9 citosinas no incluidas en islas CpG). Las islas CpG discriminan el estado de metilación del gen. En cada reacción de amplificación se incluyeron un control negativo para metilación (leucocitos de hombres sanos) y un control positivo (CpGenome™ Universal Methylated DNA [Chemicon]) (Fig. 1). El punto de corte RML en este estudio se fijó en 1.0 para la metilación de *p16*. Se analizaron muestras no tumorales pertenecientes a 30 pacientes con metilación en la muestra tumoral y en ningún caso se encontró metilación para *p16*.

Análisis estadístico

Las variables cualitativas se presentan con su distribución de frecuencias. Las variables cuantitativas se resumen en su media, desviación estándar (DE) y rango. Se evaluó la asociación entre variables cualitativas con el test de χ^2 y, en el caso de que más de un 25% de los esperados fuera menor de 5, por la prueba exacta de Fisher.

Se estimaron las funciones de supervivencia global (SG) y de la supervivencia libre de enfermedad (SLE) por el método de Kaplan-Meier, y se compararon las funciones de supervivencia de los distintos grupos mediante el test exacto de Breslow. Se incluye como definición del evento en la SG aquellos fallecimientos producidos como consecuencia del tumor y quedando censurados los pacientes vivos y fallecidos por otra causa. La SG fue calculada como el tiempo transcurrido entre la fecha de la cirugía y la del éxito o última revisión. En la SLE se define el evento como el diagnóstico de una recidiva locorregional o a distancia en pacientes previamente libres de enfermedad, es decir, en solo en aquellos en los que se realizó cirugía curativa. La SLE fue calculada como el tiempo transcurrido entre la fecha de la cirugía y la del diagnóstico de la primera recidiva. Se ajustó un modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox. En todos los contrastes de hipótesis se rechazó la hipótesis nula con un error de tipo I menor a 0,05. El paquete informático utilizado para el análisis fue SPSS para Windows versión 11.5.

Tabla I. Análisis de la relación del estado de metilación de *p16* con las variables clinicopatológicas en 326 pacientes de cáncer colorrectal. Descripción de frecuencias de las variables

Variable	n (%)	<i>p16</i> metilado	<i>p16</i> no metilado	p
Sexo	Hombres: 174 (53,4%) Mujeres: 152 (46,6%)	44 (26,2%) 35 (23,3%)	124 (73,8%) 115 (76,7%)	0,55
Edad	≥ 71 años: 170 (52,1%) < 71 años: 156 (47,9%)	48 (29,1%) 31 (20,3%)	117 (70,9%) 122 (79,7%)	0,06
Dukes	A + B: 174 (53,4%) C: 81 (24,8%) D: 71 (21,8%)	38 (22,1%) 18 (23,4%) 23 (33,3%)	134 (77,9%) 59 (76,6%) 46 (66,7%)	0,12
Localización tumoral	Proximal: 104 (31,9%) Distal: 101 (31%) Recto: 121 (37,1%)	33 (32,4%) 16 (16,0%) 30 (25,9%)	69 (67,6%) 84 (84%) 86 (74,1%)	0,02
Grado *	I: 212 (72,8%) II: 66 (22,7%) III: 13 (4,5%)	45 (21,7%) 16 (24,6%) 9 (69,2%)	162 (78,3%) 49 (75,4%) 4 (30,8%)	0,04
Tipo histológico	Adenocarcinoma: 298 (91,4%) Mucoide: 28 (8,6%)	74 (25,3%) 5 (19,2%)	218 (74,6%) 21 (80,8%)	0,50

*En 35 pacientes el grado no pudo ser establecido. El estado de metilación solo fue analizado en 318 pacientes.

RESULTADOS

De los 326 pacientes incluidos en el estudio, el 53,4% fueron hombres y el 46,6% mujeres y la media de edad fue de $71 \pm 10,83$ años (35-95 años). La edad se estratificó en función de la mediana. La tabla I muestra las frecuencias de las variables clinicopatológicas de la población. El 62,9% de los tumores se localizaron en el colon y el 37,1% en el recto. El 8,6% de los tumores fueron adenocarcinomas mucoides. En 34 pacientes no pudo determinarse el grado de diferenciación.

En 8 pacientes no pudo analizarse el estado de la metilación de *p16*. La metilación fue positiva en el 24,8% de las muestras (79/318). En el análisis de *p16* y las variables clinicopatológicas (Tabla I), se encontró relación estadísticamente significativa entre la metilación de *p16* y el grado de diferenciación ($p = 0,04$). En los tumores pobremente diferenciados la frecuencia de la metilación de *p16* fue mayor que en los moderadamente diferenciados y que en los bien diferenciados (24,6 y 21,7% respectivamente). También se encontró relación entre la metilación de *p16* y la localización tumoral ($p = 0,02$). La frecuencia de la metilación fue menor en los tumores localizados en colon distal (16%) que en los localizados en colon proximal o recto (32,4 y 25,9%, respectivamente). No se observó relación significativa con el resto de las variables.

Tabla II. Análisis univariable de SG y SLE referido a la mediana del tiempo de seguimiento (92 meses) en relación con las variables clinicopatológicas en los 315 pacientes de cáncer colorrectal estudiados. Análisis Cox

Variables	Categorías	SG (%)	HR	IC 95%	p	SLE (%)	HR	IC 95%	p
Sexo	Hombres	59,5			0,12	70,3	1,2	0,7-1,9	0,45
	Mujeres	67,2	1,3	0,9-1,9		73,0			
Edad	≥ 71 años	58,8			0,06	69,9	1,1	0,7-1,8	0,49
	< 71 años	67,7	1,4	0,9-2,0		73,4			
Dukes	A + B	89,0			<i>p</i> < 0,001	84,2			<i>p</i> < 0,001
	C	60,9	4,2	2,3-7,8		54,1	3,7	2,2-6,3	
	D	6,3	24,7	14,0-43,3		20,5	8,2	3,9-17,2	
Localización tumoral	Proximal	57,7	1,6	1,0-2,5	0,12	74,9	1,1	0,5-2,1	0,10
	Distal	62,3	1,3	0,8-2,1		62,0	1,7	1,0-3,0	
	Recto	68,6				77,1			
Grado	I	66			0,08	72,8			0,24
	II	56	1,59	1,0-2,5		73,0	1,0	0,5-1,9	
	III	43	1,86	0,7-4,6		55,6	2,7	0,9-7,6	
Tipo histológico	Adenocarcinoma	65,3	0,57	0,3-1,0	0,07	73,0	0,55	0,2-1,1	0,14
	Mucoide	44,1				54,0			
Metilación p16	Metilado	62,6			0,61	78,2	0,73	0,3-1,3	0,32
	No metilado	64,0	0,91	0,58-1,42		70,3			

SG: supervivencia global. SLE: supervivencia libre de enfermedad. HR: hazard ratio. IC: intervalo de confianza. Significación estadística: *p* < 0,05. Los HR están ajustados para cada variable de la tabla.

Evolución postoperatoria. Supervivencia global

La mediana de seguimiento fue de 92 meses, con un rango intercuartilico de 75 a 111 meses. La tasa de SG en nuestra población de estudio en ese periodo de tiempo fue del 63%. Todos los análisis de supervivencia fueron referidos a la mediana de seguimiento. Durante el seguimiento murie-

ron 142 pacientes, de los cuales 106 fueron a consecuencia del tumor y en un paciente no se pudo realizar el seguimiento. Los resultados del análisis univariable de la SG se muestran en la tabla II.

No se observaron diferencias en la SG en relación con el estado de metilación de *p16*, la supervivencia a las 92 meses en los pacientes que mostraron metilación de *p16* fue del 62,6% y en los pacientes sin esta alteración fue del 64% (Hazard ratio (HR) = 0,91; intervalo de confianza (IC 95% = 0,58-1,42). En el análisis estratificado de la SG, en función de los factores pronóstico clásicos, el sexo mostró diferencias significativas (Tabla III). Los hombres con metilación en *p16* tuvieron una menor SG que las mujeres (50,2 vs. 63,6%; *p* = 0,04). En el mismo análisis, se encontró una tendencia con efecto negativo en la SG en relación con el grado de diferenciación. En los pacientes con tumores en grado II, la SG fue del 43,8% para aquellos con metilación en *p16* y del 59,2% para los pacientes sin metilación en el gen (*p* = 0,06) (Fig. 2). En el análisis multivariable no se encontraron resultados estadísticamente significativos par ala metilación de *p16*, el estadio de Dukes fue el único factor pronóstico independiente. Se realizó un análisis exploratorio y el HR ajustado para la ausencia de metilación de *p16* fue 0,88 (IC 95% = 0,56-1,39).

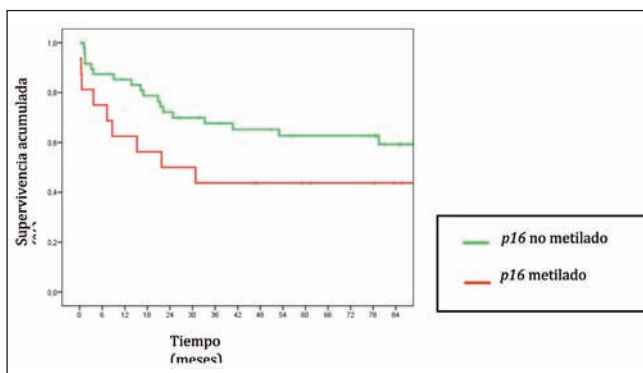


Fig. 2. Curva de Kaplan-Meier para la supervivencia global, en pacientes con tumores moderadamente diferenciados, en función del estado de metilación del promotor del gen *p16*.

Tabla III. Análisis estratificado de SG y SLE en la mediana de seguimiento en los 318 pacientes con cáncer colorrectal

Variable	Metilación <i>p16</i>	SG (92 meses)	<i>p</i>	SLE (92 meses)	<i>p</i>
Sexo					
Hombres	Metilado	50,2	0,04	69,0	0,71
	No metilado	63,6		71,2	
Mujeres	Metilado	78,1	0,23	86,0	0,13
	No metilado	64,3		69,5	
Edad					
> 71 años	Metilado	67,4	0,85	79,3	0,29
	No metilado	56,2		67,0	
< 71 años	Metilado	57,0	0,24	76,2	0,89
	No metilado	70,5		73,0	
Dukes					
A + B	Metilado	96,9	0,10	88,1	0,42
	No metilado	86,5		100	
C	Metilado	75,5	0,45	70,6	0,49
	No metilado	58,3		50,1	
D	Metilado	6,9	0,26	25	0,53
	No metilado	9,8		25	
Localización tumoral					
Proximal	Metilado	62,3	0,57	90,5	0,16
	No metilado	56,4		68,4	
Distal	Metilado	55,6	0,25	54,5	0,43
	No metilado	64,6		64,1	
Recto	Metilado	69,6	0,72	79,5	0,79
	No metilado	69,3		77,6	
Tipo histológico					
Adenocarcinoma	Metilado	64,9	0,76	78,8	0,43
	No metilado	65,9		72,2	
Mucoide	Metilado	40,0	0,22	66,7	0,88
	No metilado	43,7		47,6	
Grado					
I	Metilado	71,5	0,44	78,4	0,56
	No metilado	64,8		71,1	
II	Metilado	43,8	0,06	75	0,96
	No metilado	59,2		71,8	
III	Metilado	57,1	0,37	100	0,005
	No metilado	25,0		0	

SG: supervivencia global. SLE: supervivencia libre de enfermedad. Significación estadística: $p < 0,05$.

Evolución postoperatoria. Supervivencia libre de enfermedad

La tasa de SLE en la población estudiada fue del 71,6%. Durante el seguimiento se detectó recurrencia del tumor 69 pacientes. La recurrencia fue locoregional en 14 pacientes (20%) y a distancia en 49 pacientes (80%). Los resul-

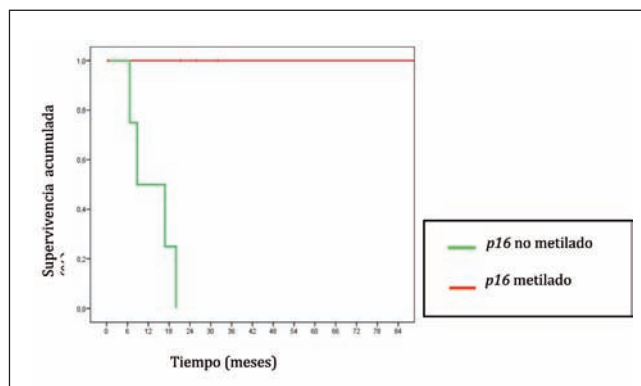


Fig. 3. Curva de Kaplan-Meier para la supervivencia libre de enfermedad, en pacientes con tumores pobremente diferenciados, en función del estado de metilación del promotor del gen *p16*.

tados del análisis univariable de la SLE se muestran en la tabla II.

En los pacientes con *p16* metilado la SLE fue del 78,2 y del 70,3% en aquellos que no la tenían ($p = 0,3$). El análisis estratificado de la SLE se realizó en función de los factores pronóstico clásicos para la predicción de recurrencia de pacientes con cáncer colorrectal (Tabla III). Solo se observó un efecto significativo en el grado de diferenciación. Los tumores pobremente diferenciados mostraron un 0% de recurrencia cuando tenían metilación de *p16*, mientras que en ausencia de metilación la recurrencia fue del 100% ($p = 0,005$) (Fig. 3). En el análisis multivariable para la SLE el efecto de la metilación de *p16* no actúa como factor pronóstico independiente.

DISCUSIÓN

El CCR es la segunda causa de muerte asociada a cáncer en EE. UU. y Europa (19). Es una de las neoplasias en las que están mejor caracterizados los mecanismos genéticos implicados en la tumorigénesis, uno de los más frecuentes es la metilación del ADN (20). La metilación del promotor provoca el silenciamiento de genes supresores de tumores en un elevado número de tumores (21,22). *p16* actúa como regulador negativo del ciclo celular, actuando como supresor de tumores (23).

Los estudios previos realizados en *p16* no mostraron un tamaño poblacional amplio con un periodo de seguimiento tan largo y en una cohorte homogénea y sin tratamiento previo (24-29). Los únicos estudios que presentaron poblaciones mayores que la nuestra con análisis del pronóstico; bien presentaron menor mediana de tiempo de seguimiento (23); bien se trataron de estudios multicéntricos que presentan mayor variabilidad debido a las diferencias en el análisis en diferentes laboratorios y en el manejo clínico de los pacientes y también debido a la inclusión de pacientes con antecedentes familiares (25). En este trabajo se analizó la frecuencia de metilación en el promotor de *p16* en una

cohorte de 326 pacientes con CCR esporádico. Las frecuencias de metilación descritas en CCR mostraron mucha variabilidad con un rango entre 18 y 61% (30-36). Esta variabilidad podría ser explicada por el uso de diferentes métodos para la detección de la metilación. Nuestro grupo determinó previamente la metilación de *p16* empleando PCR convencional, con un 18,3% de resultados positivos (33). Sin embargo, con la tecnología empleada en este estudio (qMSP), se aumentó el porcentaje de resultados positivos hasta el 24,8%. El empleo de qMSP permite obtener resultados cuantitativos y una mayor sensibilidad, incluso en muestras con cantidades reducidas de ADN, esta técnica es capaz de detectar la metilación presente en el 0,1% de los alelos en una región conocida de islas CpG (37).

La metilación del promotor de *p16* es un evento frecuente en pacientes con CCR. En la literatura previa existen discrepancias en cuanto a la relación de la metilación de *p16* con las variables clinicopatológicas. Aunque algunos autores no encontraron ninguna asociación de *p16* con ninguna de las variables (28-38), otros sí encontraron algunas relaciones significativas: con estadio de Dukes e invasión linfáticas (35); y con edad, sexo, localización del tumor, grado de diferenciación y tipo histológico (36). La metilación del promotor de *p16* en nuestra cohorte se relacionó con los tumores pobremente diferenciados y con localización proximal. Shima y cols. también detectaron mayor frecuencia de metilación de *p16* en tumores pobremente diferenciados y en los tumores proximales (25). Previamente, algunos autores habían descrito un aumento de metilación en tumores con alta inestabilidad de microsátélites (MSI-H), que se localizan con elevada frecuencia en tumores proximales (39). El estado de MSI no se incluyó en nuestro estudio, pero podría estar implicado en las diferencias en la frecuencia de metilación en función de la localización. La pérdida de función de *p16*, frecuentemente asociada a la metilación del promotor, está relacionada con la pobre diferenciación en otras patologías (40-41). Esta ausencia de expresión provoca la desregulación del ciclo celular y favorece el proceso de dediferenciación.

El perfil de metilación de la célula y la metilación específica del gen *p16* han sido asociados con la edad, pero en nuestra cohorte, esta relación aparece solo como tendencia (25-42). Otros autores no detectaron asociación de *p16* con la edad, lo que concuerda con la ausencia de metilación detectada en las muestras de mucosa normal analizadas (43).

Algunos estudios muestran el análisis de la metilación de *p16* con la supervivencia de los pacientes con CCR (25,26,28,29). En los estudios que analizan pronóstico es importante trabajar con poblaciones homogéneas y con seguimiento prolongado para aumentar el valor de la información obtenida (la mediana de seguimiento en nuestro estudio fue de 92 meses). Aunque la metilación de *p16* no se relacionó con pronóstico en algunos trabajos, otros autores sí asociaron la presencia de metilación de *p16* con la reducción en la SG (25,28). En este trabajo no se detectó un efecto significativo de *p16* en el pronóstico. Sin embargo, cuando se realizó el análisis multivariable, se observó

un efecto negativo en la SG que no pudo ser demostrado debido al tamaño poblacional. Shima y cols. demostraron en su análisis multivariable la asociación de la presencia de metilación en *p16* con una disminución de la SG (25).

No se encontraron diferencias en la SLE en función del estado de metilación de *p16*. Algunos han observado menor SLE asociada a metilación (29). Sin embargo, en el grupo de tumores pobremente diferenciados (grado III), la presencia de *p16* mostró efecto protector en la SLE: ninguno de los pacientes de este grupo con metilación tuvo recidiva. La influencia de *p16* en este subgrupo de pacientes no ha sido analizada por otros autores. El efecto protector de *p16* en el pronóstico había sido descrito previamente en tumores gástricos (29).

En conclusión, la metilación de *p16* es un evento frecuente en nuestra cohorte e induce diferencias en la SLE de los pacientes con tumores pobremente diferenciados. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales, con un tamaño de población mayor, para verificar su efecto en nuestra población.

BIBLIOGRAFÍA

- Vidaurreta M, Maestro ML, Rafael S, Veganzones S, Sanz-Casla MT, Cerdán J, Arroyo M. Telomerase activity in colorectal cancer, prognostic factor and implications in the microsatellite instability pathway. *World J Gastroenterol* 2007;13(28):3868-72.
- Maestro ML, Vidaurreta M, Sanz-Casla MT, Rafael S, Veganzones S, Martínez A, Aguilera C, Herranz MD, Cerdán J, Arroyo M. Role of the BRAF mutations in the microsatellite instability genetic pathway in sporadic colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2007;14(3):1229-36.
- Vidaurreta M, Sánchez-Muñoz R, Veganzones S, Rafael S, Gutiérrez M, de-la-Orden V, Fernández C, Arroyo M, Cerdán FJ, Maestro de las Casas ML. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in patients with colorectal cancer. *Rev Esp Enferm Dig* 2010;102(1):20-31.
- Liggett WH and Sidransky D. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *J Clin Oncol* 1998;16:1197-206.
- Serrano M, Hannon GJ and Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993;366:704-7.
- Nobori P, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K and Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 1994;368:753-6.
- Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, et al. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 1995;55:4525-30.
- Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, et al. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS-1 in human cancers. *Nature Med* 1995;1:686-92.
- Bird A. The essentials of DNA methylation. *Cell* 1992;70:5-8.
- Perea J, Lomas M, Hidalgo M. Bases moleculares del cáncer colorrectal: ¿Hacia un manejo individualizado? *Rev Esp Enferm Dig* 2011;103:29-35.
- Esteller M, Corn PG, Baylin SB and Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001;61:3225-9.
- Lind GE, Thorstensen L, Løvig T, Meling GI, Hamelin R, Rognum TO, et al. A CpG island hypermethylation profile of primary colorectal carcinomas and colon cancer cells lines. *Mol Cancer* 2004;3:28.
- Lee S, Hwang KS, Lee HJ, Kim JS and Kang GH. Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in colorectal neoplasia. *Lab Invest* 2004;84:884-93.
- Noda H, Mashima R, Kamiyama H, Okada S, Kawamura YJ and Konishi F. Promoter hypermethylation of tumor-related genes in sporadic

- colorectal cancer in young patients. *J Exp Clin Cancer Res* 2007;26:251-6.
15. Cerdán J. Recidiva locorregional en el cáncer de recto. *Cir Esp* 2003;73:63-7.
 16. Topaloglu O, Hoque MO, Tokumaru Y, Lee J, Ratovitski E, Sidransky D and Moon CS. Detection of promoter hypermethylation of multiple genes in the tumor and bronchoalveolar lavage of patients with lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:2284-8.
 17. Hoque MO, Begum S, Topaloglu O, Jeronimo C, Mambo E, Westra WH, et al. Quantitative detection of promoter hypermethylation of multiple genes in the tumor, urine and serum DNA of patients with renal cancer. *Cancer Res* 2004;64:5511-7.
 18. Carvalho AL, Jeronimo C, Kim MM, Henrique R, Zhang Z, Hoque MO, et al. Evaluation of promoter hypermethylation detection in body fluids as a screening/diagnosis tool for head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008;14:97-107.
 19. Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2001;2:533-43.
 20. Jones PA and Laird PV. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 1999;21:163-7.
 21. Jones PA and Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002;3:415-28.
 22. Noda H, Miyaji Y, Nakanishi A, Konishi F and Miki Y. Frequent reduced expression of alpha-1B-adrenergic receptor caused by aberrant promoter methylation in gastric cancers. *Br J Cancer* 2007;96:383-90.
 23. Sharpless NE. *INK4a/ARF* A multifunctional tumor supresor locus. *Mutat Res* 2005;576:22-38.
 24. Norrie MW, Hawkins NJ, Todd AV, Meagher AP, O'Connor TW and Ward RL. Inactivation of p16INK4a by CpG hypermethylation is not a frequent event in colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2003;84:143-50.
 25. Shima K, Nosho K, Baba Y, Cantor M, Meyerhardt JA, Giovannucci EL, et al. Prognostic significance of CDKN2A (p16) promoter methylation and loss of expresión in 902 colorectal cancers: Cohort study and literatura review. *Int J Cancer* 2011;128:1080-94.
 26. Ward RL, Cheong K, Ku SL, Meagher A, O'Connor T and Hawkins NJ. Adverse prognostic effect of methylation in colorectal cancer is reversed by microsatellite instability. *J Clin Oncol* 2003;21:3729-36.
 27. Nosho K, Irahara N, Shima K, Kure S, Kirkner GJ, Schernhammer ES et al. Comprehensive biostatistical analysis of CpG island methylator phenotype in colorectal cancer using a large population-based sample. *PLoS ONE* 2008;3:e3698.
 28. Kamiyama H, Noda H, Takata O, Suzuki K, Kawamura Y and Konishi F. Promoter hypermethylation of tumor related genes in peritoneal lavage and the prognosis of patients with colorectal cancer. *Journal of Surgical Oncology* 2009;100:69-74.
 29. Mitomi H, Fukui N, Tanaka N, Kanazawa H, Saito T, Matsuoka T, Yao T, et al. Aberrant p16INK4a methylation is a frequent event in colorectal cancers: prognostic value and relation to mRNA expression and immunoreactivity. *J Cancer Clin Oncol* 2010;136:323-31.
 30. Esteller M, Tortola S, Toyota M, Capella G, Peinado MA, Baylin SB and Herman JG. Hypermethylation-associated inactivation of p14ARF is independent of p16INK4a methylation and p53 mutational status. *Cancer Res* 2000;60:129-33.
 31. Guan RJ, Fu Y, Holt PR and Pardee AB: Association of k-ras with p16 methylation of the p16 gene in human colon cancer. *Gastroenterology* 1999;116:1063-71.
 32. Kanai Y, Ushijima S, Kondo Y, Nakanishi Y and Hirohashi S. DNA methyltransferase expression and DNA methylation of CpG islands and peri-centromeric satellite regions in human colorectal and stomach cancer. *In J Cancer* 2001;91:2005-212.
 33. Sanz-Casla MT, Maestro ML, Vidaurreta M, Maestro C, Arroyo M and Cerdán J. p16 gene methylation in colorectal tumors: correlation with clinicopathological features and prognostic value. *Dig Dis* 2005;23:151-5.
 34. Winencke JK, Zheng S, Lafuente A, Lafuente MJ, Grudzen C, Wrensch MR et al. Aberrant methylation of p16INK4a in anatomic and gender-specific subtypes of sporadic colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 1999;8:501-6.
 35. Ogino S, Odze RD, Kawasaki T, Brahmandam M, Kirkner GJ, Laird PW et al. Correlation of pathologic features with CpG island methylator phenotype (CIMP) by quantitative DNA methylation analysis in colorectal carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2006;30:1175-83.
 36. Iacopetta B, Grieu F, Li W, Ruzskiewicz A, Caruso M, Moore J, et al. APC gene methylation is inversely correlated with features of the CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2006;119:2272-8.
 37. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD and Baylin SB. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9821-6.
 38. Brücher B, Geddert H, Langner C, Höfler H, Fink U, Siewert JR and Sarbia M. Hypermethylation of hMLH1, HPP1, p14ARF, p16INK4A and APC in primary adenocarcinomas of the small bowel. *In J Cancer* 2006;119:1298-302.
 39. Ahuja N, Mohan AL, Li Q, Stolker JM, Herman JG, Hamilton SR, Baylin SB, Issa JP. Association between CpG island methylation and microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1997;57:3370-4.
 40. Kawabuchi B, Moriyama S, Hironaka M, Fujii T, Koike M, Moriyama H, Nishimura Y, Mizuno S, Fukayama M. p16 inactivation in small-sized lung adenocarcinoma: its association with poor prognosis. *Int J Cancer* 1999;84:49-53.
 41. Tsujie M, Yamamoto H, Tomita N, Sugita Y, Ohue M, Sakita I, Tamaki Y, Sekimoto M, Doki Y, Inoue M, Matsuura N, Monden T, Shiozaki H, Monden M. Expression of tumor suppressor gene p16(INK4) products in primary gastric cancer. *Oncology* 2000;58(2):126-36.
 42. Holliday R. The inheritance of epigenetic defects. *Science* 1987;238:163-70.
 43. Ahuja N, Li Q, Mohan AL, Baylin SB, Issa JP. Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Res* 1998;58:5489-94.