

Inactivación del gen CDKN2A (p16) en cáncer de la vesícula biliar

Juan Carlos Roa S¹, Quynh Vo², Juan Carlos Araya O¹, Miguel Villaseca H¹, Pablo Guzmán G¹, Gilda Ibacache S¹, Xabier de Aretxabala U³, Iván Roa E¹.

Inactivation of CDKN2A gene (p16) in gallbladder carcinoma

Background: The CDKN2A gene encodes a cyclin dependent kinase inhibitor, p16, which promotes cell cycle arrest. Methylation of the promoter region transcriptionally inactivates the gene. **Aim:** To study the relationship between methylation status of the promoter region of p16 gene, the immunohistochemical expression of p16 and clinical and morphological features of gallbladder carcinoma. **Material and methods:** We analyzed the methylation status of the promoter region of the CDKN2A gene in gallbladder adenocarcinomas using methylation specific PCR (MSP). We also used microsatellite markers near the CDKN2A gene to detect allelic imbalance (AI) and examined the tumors by immunohistochemistry (IHC) for p16 expression. **Results:** Of 38 gallbladder adenocarcinomas analyzed by IHC, 11 cases (29%) were negative for p16 protein. Nine (24%) had methylation of the promoter region of the CDKN2A gene. Twenty nine cases were negative for methylation, but four (14%) of these 29 exhibited AI at one or more of the microsatellite markers. CDKN2A promoter methylation was not associated with microsatellite instability (MSI-H). **Conclusions:** The inactivation of CDKN2A by methylation and/or deletion might play an important role in gallbladder carcinogenesis (Rev Méd Chile 2004; 132: 1369-76).

(Key Words: Gallbladder neoplasms; Genes, CDKN2; Genes, p16; Immunohistochemistry)

Recibido el 4 de marzo, 2004. Aceptado en versión corregida el 31 de agosto, 2004.

Trabajo financiado por Fondecyt # 1010253 y Diufro # 1900.

¹Departamento de Anatomía Patológica, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

²Louisiana State University Health Sciences Center, New Orleans, LA.

³Departamento de Cirugía y Traumatología, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

El cáncer de la vesícula biliar es la principal causa de muerte por cáncer en Chile en mujeres sobre 40 años. Esta enfermedad tiene una tasa de mortalidad de 35,2/100.000 habitantes en este grupo, y de 11,8/100.000 en la población general¹⁻⁴.

Correspondencia a: Dr. Juan Carlos Roa. Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de la Frontera. Manuel Montt 112. Código Postal 478-1176. Temuco, Chile. E mail: Jcroa@ufro.cl

El gen CDKN2A es un gen supresor de tumores, que codifica una proteína conocida como p16, que es un inhibidor de una ciclina dependiente de quinasa^{5,6}. La expresión reducida de p16 resulta en una mayor actividad de la ciclina D dependiente de quinasa, y por lo tanto en una fosforilación aberrante del gen retinoblastoma (RB), la cual subsecuentemente acelera el crecimiento celular^{7,8}. La acción de la inactivación del gen CDKN2A en la carcinogénesis ha sido

intensamente estudiada en una variedad de tumores, buscando básicamente delección homocigota o mutaciones puntuales genómicas⁹. Sin embargo, estos dos mecanismos no han podido explicar completamente la extensa pérdida de la expresión inmunohistoquímica de p16 en algunos de estos tumores. La hipermetilación de los islotes de CpG (secuencias repetidas de citocinas y guaninas) del gen CDKN2A en su área promotora, ha sido demostrada como un mecanismo alternativo para la pérdida de expresión de p16.

En este estudio determinamos la relación entre la metilación del área promotora, el desbalance alélico como mecanismo de inactivación del gen p16 y la expresión inmunohistoquímica de p16 en los cánceres de vesícula biliar con aspectos clínicos y morfológicos de estos tumores; además de examinar el estatus de metilación del gen p16 usando un test de metilación específica mediante PCR (MSP), y estudios inmunohistoquímicos y de desbalance alélico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras. Se seleccionaron 38 casos de cáncer de vesícula biliar de los archivos del Departamento de Anatomía Patológica de la Universidad de La Frontera, correspondiente a material fijado en formalina y embebido en parafina, además de 21 casos de colecistitis crónica inespecífica, como control.

Se registraron antecedentes generales como raza, edad, sexo de los pacientes, y datos morfológicos de los tumores, los cuales fueron obtenidos de los registros médicos o de los informes de biopsia.

Para la etapificación se utilizó los criterios estándar de la TNM («*American Joint Committee on Cancer*»), 1997^{10,11}. Todas las muestras y la información de los pacientes fueron obtenidas con la aprobación del Comité de Ética Institucional de la Universidad de La Frontera y del Servicio de Salud regional.

Selección de muestras y extracción de ADN. Se realizaron secciones de 6 micras de espesor, las cuales fueron procesadas en una manera diseñada para evitar contaminación cruzada en la zona de técnica histológica¹¹. Para la disección mecánica,

las láminas fueron desparafinadas previo a su disección y luego digeridas con proteinasa K¹¹ y usado como un ADN blanco para PCR sin purificación adicional.

Análisis de microsatélites para desbalance alélico. Los partidores usados para el análisis de desbalance alélico fueron el D9S1748 y el D9S171 (número de acceso Genbank X62928). Se realizó el análisis del ADN proveniente de células tumorales y de células no tumorales pareadas de cada caso. Estos correspondieron a linfocitos del infiltrado inflamatorio asociados a las colecistitis crónicas inespecíficas y los tumores de cada paciente en estudio. Uno de los iniciadores de cada par fue marcado con γ -³²P-ATP con una polinucleótido-kinasa (PNK). Las mezclas de PCR contenían 100 nM (nanomoles) de cada iniciador, 200 μ M (micromoles) de cada dinucleótido y una concentración de cloruro de magnesio de 1,5 mM. Las temperaturas de hibridación de cada marcador fueron de 60° y de 57°, respectivamente. Las amplificaciones fueron realizadas mediante 40 ciclos. Los productos PCR fueron mezclados con un colorante denaturante (Formamida) e incubado por 5 min a 95°.

Para la detección de desbalance alélico, los productos PCR fueron sometidos a electroforesis y los geles fueron revelados mediante autorradiografía¹². Se consideró a un caso como informativo en el cual se pudo reconocer 2 grupos principales de bandas en los geles para cada caso, indicando que el individuo tenía 2 alelos diferentes en cada locus (heterocigoto), la relativa intensidad de las bandas fue determinada mediante inspección visual (Figura 1).

Los tumores de vesícula biliar en este estudio fueron previamente categorizados por las recomendaciones del taller en inestabilidad microsatelital del Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos de Norteamérica (USA)¹³. Siguiendo estas directrices, se usaron 5 marcadores recomendados por la convención, BAT25, BAT26, D2S123, D5S346 y D17S250. Los casos fueron designados como de alta frecuencia de inestabilidad microsatelital (MSI-H) o de baja frecuencia de inestabilidad microsatelital (MSI-L) o sin inestabilidad microsatelital (MSS), dependiendo de si la amplificación de ADN de los tumores producía bandas con movilidad alterada en la electroforesis en más o menos de 30% o ninguno de los marcadores usados, respectivamente.

Modificación del ADN con bisulfito y test de metilación específica mediante PCR (MSP). El principio de la modificación de ADN con la técnica de bisulfito de sodio se basa en su capacidad de convertir a todos los residuos de citosina (C) no metiladas en uracilos (U), mediante deaminación, pero cuando la citosina está metilada es resistente a la reacción y permanece como citosina¹⁴. Los

iniciadores de PCR descritos por Herman et al¹⁵ aprovechan estas diferencias para discriminar entre aquellas frecuencias metiladas y no metiladas (Figura 2). Uno de los iniciadores de cada par fue marcado con γ^{32} -ATP con polinucleótido-kinasa (PNK). Las mezclas de PCR contenían 100 nm de cada primer, 200 mM de cada dinucleótido y una concentración de magnesio de 1,5 mM. Las temperaturas óptimas de hibridación fueron de 60°C y 63°C para los iniciadores que detectaban el ADN no metilado y metilado, respectivamente. Las amplificaciones se realizaron mediante 40 ciclos.

Inmunohistoquímica. Se utilizó una técnica estándar de streptavidina-biotina, previamente descrita¹⁶. Previamente a la incubación del anticuerpo primario (anticuerpo monoclonal 16 clon F-12 1/100, Santa Cruz, San Diego, CA), las secciones histológicas fueron pre-tratadas con recuperación antigénica mediante microondas en buffer EDTA. La ausencia de tinción en el área con lesión fue considerada como un resultado positivo. Se utilizó control interno de patrón inmunohistoquímico alterados (Figura 3).

Estadística. La relación entre el estatus de metilación del p16 y las variables categóricas, tales como género, sitio y grado de diferenciación, fueron analizadas utilizando el test del chi-cuadrado, o el test exacto de Fisher. Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier curve fueron construidas con *Winstat software* (Robert K Fitch software).

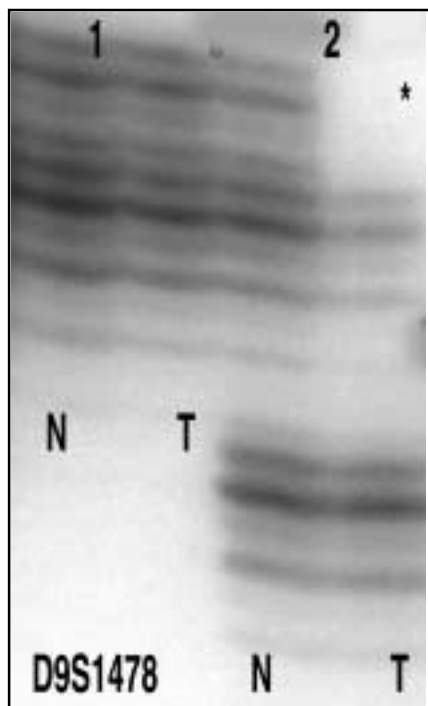


FIGURA 1. Film de autorradiografía para el microsatélite D9S1478 que muestra en el segundo caso la ausencia de un grupo de bandas correspondientes al alelo superior cuando es comparado con el ADN normal (N) adyacente (desbalance alélico) en el otro caso se observa la ausencia del alelo inferior tanto en el ADN tumoral como normal.

RESULTADOS

Inactivación del gen CDKN2A. Los resultados del análisis de metilación del área promotora de CDKN2A en los cánceres de la vesícula biliar se muestran en la Tabla 1. La reacción específica para la secuencia no metilada promotora fue amplifica-

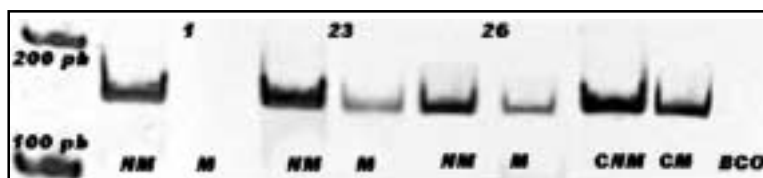


FIGURA 2. Test de metilación específica por PCR donde se observan 2 líneas por cada caso para ADN metilado y no metilado. El gel no diferencia entre 150 y 151 pares de bases, sin embargo, son reacciones de PCR con pares de iniciadores diferentes.

da en todos los tumores produciendo una banda de 151 Pb. La amplificación del ADN tumoral por los iniciadores específicos para las secuencias metiladas fue detectada en 24% de los 38 cánceres de vesícula biliar produciendo una banda de 150 pb (Figura 2). El desbalance alélico en uno o más marcadores microsatelitales fue detectado en 11%

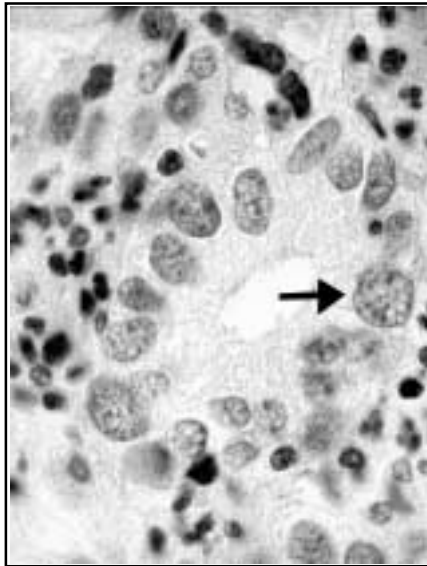


FIGURA 3. Inmunohistoquímica para p16 donde se observa la ausencia de tinción nuclear en las células tumorales y su presencia en el infiltrado inflamatorio peritumoral.

de los 38 tumores de vesícula biliar (Tabla 1). Ejemplos de los resultados de análisis de desbalance alélico son mostrados en la Figura 1. Ninguno de los adenocarcinomas de vesícula biliar mostró ya sea desbalance alélico y metilación en el área promotora, simultáneamente.

Evaluación inmunohistoquímica en la expresión de p16. En las inmunotinciones, la mayoría de los carcinomas de vesícula biliar mostraron una actividad nuclear que varió de intensidad, desde débil a intensa en un patrón en mosaico a través de todo los tumores estudiados. La proporción de células positivas varió desde 10% a 80%. Las secciones fueron examinadas para evidenciar la reacción nuclear más que la tinción citoplasmática. La tinción citoplasmática por sí misma no fue considerada. Si había tinción nuclear en un patrón difuso o mosaico a través de un tumor, ésta fue considerada positiva para p16, pero si la tinción nuclear fallaba, mientras ésta se encontraba entremezclada con células no neoplásicas que reaccionaban positivamente, la lesión fue considerada negativa, un subgrupo de cánceres de vesícula biliar tuvo un patrón de tinción heterogéneo con áreas claramente positivas y claramente negativas¹⁷.

Los resultados de la inmunohistoquímica se correlacionaron con los resultados de la inactivación de p16. Una alta y significativa asociación ($p=0,002$) fue detectada entre la ausencia de p16 por inmunohistoquímica, metilación del área pro-

Tabla 1. Mecanismos de inactivación de CDKN2A y IHC de p16 n=38

	IHC negativo	IHC positivo	Total
Metilación del área promotora			
Presente	8	1	9 (24%)
Ausente	4	25	29 (76%)
Desbalance alélico			
Presente	1	3	4 (10%)
Ausente	11	23	34 (89%)
Inactivación CDKN2A*			
Metilación + desbalance alélico			
Presente	9	4	13 (34%)
Ausente	3	22	25 (76%)

* $p= 0,002$

IHC = Inmunohistoquímica

motora del gen CDKN2A y de desbalance alélico en los locus estudiados. 78% de los adenocarcinomas de vesícula biliar que demostraron una inmunorreactividad negativa tuvieron ya sea metilación del área promotora o desbalance alélico, todos excepto uno de los tumores que demostraron tinción positiva para p16 fueron encontrados no metilados. En contraste el patrón de tinción inmunohistoquímica no estuvo asociado a la presencia o ausencia de desbalance alélico.

Correlación con los aspectos clínicos y patológicos. La inactivación de CDKN2A, ya sea por desbalance alélico o por metilación del área promotora mostró una tendencia no significativa a ser más frecuente en pacientes de raza mapuche y de sexo masculino. La inactivación de CDKN2A ya sea por metilación y/o delección alélica mostró una tendencia no significativa a peor pronóstico ($p=0,09$). No se encontró relación entre la inactivación del gen CDKN2A con otras características clínicas o morfológicas (Tabla 2).

Sobrevida. La supervivencia de los pacientes que mostraron inactivación del CDKN2A, ya sea a

través de desbalance alélico o metilación del área promotora, no tuvieron una significativa mejor supervivencia que aquellos pacientes que tuvieron tumores que no mostraron inactivación del gen. No se estratificaron los pacientes para descartar factores confundentes debido al tamaño de la muestra.

DISCUSIÓN

En el proceso de la progresión del cáncer en múltiples etapas, la expresión anormal de los genes puede ser controlada por mecanismos epigenéticos. Los mecanismos epigenéticos causan una expresión anormal génica sin un cambio en la secuencia del ADN. El gen supresor de tumores CDKN2A usualmente se inactiva mediante 3 mecanismos en las neoplasias en humanos: la delección homocigota, las mutaciones puntuales y la metilación de las áreas promotoras¹⁷⁻¹⁹. La hipermetilación en los islotes CpG en las áreas promotoras, produce una modificación en la configuración tridimensional del ADN, lo cual modifica los puntos de contacto específicos de las

Tabla 2. Metilación de CDKN2A y variables clínico patológicas (n=38)

	Metilado	No metilado	Total
Etnia			
Mapuche	2	11	13 (34%)
No mapuche	9	16	25 (66%)
Edad promedio			
<40	6	8	14 (37%)
>40	7	17	24 (63%)
Género			
Masculino	3	1	4 (11%)
Femenino	10	24	34 (89%)
Grado de diferenciación			
Bien	5	10	15 (40%)
Moderado	7	9	16 (42%)
Poco	1	6	7 (18%)
Etapa			
Incipiente	7	11	18 (47%)
Avanzado	6	14	20 (53%)
Inestabilidad microsatelital			
MSI-H (alto grado)	3	4	7 (18%)
MSI-L (bajo grado)	5	12	18 (47%)
MSS (estable)	3	7	13 (35%)

proteínas y factores transcripcionales que permiten la regulación y expresión del ADN causando silencio génico. La inhabilidad para transcribirse de los genes supresores de tumores resulta de una disfunción de los genes que induce al desarrollo de carcinomas^{20,21}.

La metilación de las áreas promotoras del gen CDKN2A están asociadas con un bloqueo transcripcional completo en tumores de cabeza y cuello, pulmón, cerebro, mama, colon, esófago y líneas celulares de cáncer de vejiga⁹. Más aún tales eventos de metilación son responsables por el silenciamiento de varios otros genes conocidos que codifican proteínas importantes en el desarrollo tumoral como la caderina E¹⁴, el gen de Von Hippel-Lindau (VHL)¹⁴, el gen supresor de tumores BRCA1, del cáncer de mamas²² y genes de reparación (MMR) del ADN con el gen hMLH1²³.

Muchas de las líneas celulares de sistema nervioso central, melanomas, osteosarcoma, carcinomas de mama, riñón, vejiga y ovario²⁴ demuestran frecuentes lesiones homocigotas del gen CDKN2A. Para los adenocarcinomas pancreáticos de los cuales el 98% de los tumores demuestra ausencia del p16, 48% de alteraciones genéticas en el gen CDKN2A son de lesiones homocigotas y 34% están asociadas con una pérdida de heterocigocidad (LOH), mientras el resto está relacionada con un silenciamiento mediante metilación de las áreas promotoras²⁵. Más aún la pérdida del cromosoma 9p21 es común en los carcinomas del tracto de vía biliar y de la vesícula biliar^{26,27}. En nuestro estudio encontramos que el 11% de los adenocarcinomas exhibían desbalance alélico en uno de los microsatélites que flanquean la región del cromosoma 9p en el cual el gen CDKN2A está localizado (Tabla 1).

La mutación es un mecanismo de inactivación que ha sido descrito entre el 24,5% y 30,7% de los carcinomas de vesícula biliar^{28,29}. Sin embargo, otros reportes han hecho referencia a altas frecuencias en los cánceres del tracto biliar y en sus líneas celulares pero no en los carcinomas de vesícula biliar^{26,27}.

Existen escasas comunicaciones acerca del estado de metilación del CDKN2A y cáncer de vesícula biliar. Una de ellas estudió 68 cánceres de vesícula biliar de una población china encontrando una frecuencia de metilación de 14,8% y de 72,7% de LOH del gen CDKN2A y otra serie de 54 casos de

tumores primarios de vesícula biliar incluyendo un subgrupo de pacientes chilenos con una frecuencia de metilación de 56% sin mostrar diferencias significativas con los otros pacientes estudiados^{29,30}. En este estudio demostramos que 24% de nuestros adenocarcinomas de vesícula biliar tienen metilación en la zona promotora del gen CDKN2A (Tabla 1). Tres estudios inmunohistoquímicos mostraron negatividad de p16 en porcentajes que variaron de 23% a 75%^{27,28,31}. Observamos en este estudio que 78% (8 de 11 de las muestras con ausencia de p16 mediante inmunohistoquímica) tuvo metilación de la zona promotora del gen CDKN2A (Tabla 1). Estos datos indican que un importante mecanismo en la pérdida de p16 es la metilación del promotor del gen CDKN2A.

Encontramos, ya sea metilación en el área promotora del gen o desbalance alélico en 3 de 7 (43%) de los tumores con inestabilidad microsatelital de alto grado, sin embargo esta tendencia no fue estadísticamente significativa.

Además, al correlacionar los mecanismos de inactivación con características clínico-patológicas, encontramos que hubo una tendencia no significativa a una menor inactivación en pacientes con raza mapuche (2 de 13= 18%) que el resto de la población 9/25, 56% (la mayoría de origen español) (Tabla 2). En un estudio previo nosotros encontramos diferencias significativas y una mayor frecuencia de inestabilidad microsatelital entre individuos mapuches (0%) y el resto de la población (19%) (Roa JC datos no publicados), estos son ejemplos de epidemiología molecular con diferentes predisposiciones genéticas para cierto tipos de cánceres entre diferentes grupos étnicos³²⁻³⁴.

Observamos que más hombres (75% 3/4), que mujeres (42% 10/24) tuvieron adenocarcinoma de vesícula biliar con inactivación del CDKN2A en nuestro estudio, pero la diferencia no fue significativa, factores hormonales pueden contribuir a esa tendencia (Tabla 2). Los factores hormonales juegan un importante rol en ciertas neoplasias, tales como el cáncer de mama³⁵. La incidencia del cáncer de vesícula biliar en mujeres, es 6 veces más alta que en los hombres³⁶. En general los presuntos mecanismos que generan esta diferencia son todavía desconocidos, pero claramente los estrógenos podrían jugar un importante rol influenciando el desarrollo de cálculos de la vesícula biliar en las primeras etapas de la

carcinogénesis misma³⁷. Más aún, los altos niveles de estradiol han sido correlacionados con un mayor riesgo a desarrollar cáncer de mama³⁸.

Nuestros resultados mostraron una tendencia no significativa de peor pronóstico en el grupo de pacientes con inactivación del gen CDKN2A (p=0,09) este hecho concuerda con estudios en tumores de vesícula biliar y de otros órganos^{29,39-41}.

Dos tumores en este estudio fueron p16 negativo mediante inmunohistoquímica pero no exhibieron ni desbalance alélico ni metilación del área promotora. Estos tumores pueden poseer otras anomalías tales como mutaciones puntuales del CDKN2A. Otra explicación podría ser una limitación técnica en los métodos empleados. No

podemos excluir la pérdida de la actividad de p16 incluso en algunos casos inmunohistoquímicamente positivos debido a que las mutaciones puntuales pueden dar origen a proteínas p16 no funcionales las cuales son aún detectables mediante IHC.

En conclusión, en 34% de los carcinomas de vesícula biliar encontramos la inactivación del gen CDKN2A principalmente con metilación del área promotora (24%) y una menor proporción mediante desbalance alélico (10%). La inactivación del gen CDKN2A no estuvo asociada con pronóstico. La hipermetilación del gen p16 o del gen CDKN2A es uno de los principales mecanismos que explica la pérdida de proteína de p16 en el cáncer de la vesícula biliar.

REFERENCIAS

- MEDINA E, KAEMPFER AM. Mortalidad del adulto en Chile. *Rev Méd Chile* 2000; 128: 1144-9.
- MEDINA E, KAEMPFER AM. Mortalidad por cáncer en Chile. Consideraciones epidemiológicas. *Rev Méd Chile* 2001; 129: 1195-202.
- MEDINA E, KAEMPFER AM, IRARRÁZVAL M, DE CROIZET VA, TOPOROWICZ M. Aspectos epidemiológicos de enfermedades de la vesícula biliar en Chile. *Bol Oficina Sanit Panam* 1976; 80: 220-8.
- ROA I, ARAYA JC, ARETXABALA X, SALINAS C, WISTUBA I. Enfermedades de la vesícula biliar en el área de Temuco. *Rev Méd Chile* 1989; 118: 889-94.
- SHERR CJ. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* 2000; 60: 3689-95.
- PALMERO I, PETERS G. Perturbation of cell cycle regulators in human cancer. *Cancer Surv* 1996; 27: 351-67.
- SCHAFFER KA. The cell cycle: a review. *Vet Pathol* 1998; 35: 461-78.
- HRUBAN RH, IACOBUIZIO-DONAHUE C, WILENTZ RE, GOGGINS M, KERN SE. Molecular pathology of pancreatic cancer. *Cancer J* 2001; 7: 251-8.
- LIGGETT WH JR, SIDRANSKY D. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16: 1197-206.
- The new TNM classification in gastroenterology (1997). *Endoscopy* 1998; 30: 643-9.
- BURTON MP, SCHNEIDER BG, BROWN R, ESCAMILLA-PONCE N, GULLEY ML. Comparison of histologic stains for use in PCR analysis of microdissected, paraffin-embedded tissues. *Biotechniques* 1998; 24: 86-92.
- SCHNEIDER BG, PULTIZER DR, BROWN RD, PRIHODA TJ, BOSTWICK DG, SALDÍVAR V ET AL. Allelic imbalance in gastric cancer: an affected site on chromosome arm 3p. *Genes Chromosomes Cancer* 1995; 13: 263-71.
- BOLAND CR, THIBODEAU SN, HAMILTON SR, SIDRANSKY D, ESHLEMAN JR, BURT RW ET AL. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5248-57.
- HERMAN JG, GRAFF JR, MYOHANEN S, NELKIN BD, BAYLIN SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9821-6.
- 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.
- ROA JC, VILLASECA MA, ROA I, ARAYA JC, OKAYASU I, FLORES P ET AL. Expresión inmunohistoquímica de la oncoproteína p53 en adenomas y adenocarcinomas del intestino grueso. *Rev Méd Chile* 1997; 125: 523-9.
- GERADTS J, HRUBAN RH, SCHUTTE M, KERN SE, MAYNARD R. Immunohistochemical p16INK4a analysis of archival tumors with deletion, hypermethylation, or mutation of the CDKN2/MTS1 gene. A comparison of four commercial antibodies. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2000; 8: 71-9.
- ROCCO JW, SIDRANSKY D. p16 (MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res* 2001; 264: 42-55.

19. PIEPKORN M. Melanoma genetics: an update with focus on the CDKN2A(p16)/ARF tumor suppressors. *J Am Acad Dermatol* 2000; 42: 705-22; 723-6.
20. ROBERTSON KD, JONES PA. DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis* 2000; 21: 461-7.
21. WAJED SA, LAIRD PW, DeMEESTER TR. DNA methylation: an alternative pathway to cancer. *Ann Surg* 2001; 234: 10-20.
22. ESTELLER M, SILVA JM, DOMÍNGUEZ G, BONILLA F, MATIAS-GUIU X, LERMA E ET AL. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 564-9.
23. KANE MF, LODA M, GAIDA GM, LIPMAN J, MISHRA R, GOLDMAN H ET AL. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res* 1997; 57: 808-11.
24. KAMB A, SHATTUCK-EIDENS D, EELES R, LIU Q, GRUIS NA, DING W ET AL. Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nat Genet* 1994; 8: 23-6.
25. SCHUTTE M, HRUBAN RH, GERADTS J, MAYNARD R, HILGERS W, RABINDRAN SK ET AL. Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res* 1997; 57: 3126-30.
26. YOSHIDA S, TODOROKI T, ICHIKAWA Y, HANAI S, SUZUKI H, HORI M ET AL. Mutations of p16Ink4/CDKN2 and p15Ink4B/MTS2 genes in biliary tract cancers. *Cancer Res* 1995; 55: 2756-60.
27. CACA K, FEISTHAMMEL J, KLEE K, TANNAPFEL A, WITZIGMANN H, WITTEKIND C ET AL. Inactivation of the INK4a/ARF locus and p53 in sporadic extrahepatic bile duct cancers and bile tract cancer cell lines. *Int J Cancer* 2002; 97: 481-8.
28. KIM YT, KIM J, JANG YH, LEE WJ, RYU JK, PARK YK ET AL. Genetic alterations in gallbladder adenoma, dysplasia and carcinoma. *Cancer Lett* 2001; 169: 59-68.
29. UEKI T, HSING AW, GAO YT, WANG BS, SHEN MC, CHENG J ET AL. Alterations of p16 and prognosis in biliary tract cancers from a population-based study in China. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 1717-25.
30. HOUSE MG, WISTUBA, II, ARGANI P, GUO M, SCHULICK RD, HRUBAN RH ET AL. Progression of gene hypermethylation in gallstone disease leading to gallbladder cancer. *Ann Surg Oncol* 2003; 10: 882-9.
31. SHI YZ, HUI AM, LI X, TAKAYAMA T, MAKUUCHI M. Overexpression of retinoblastoma protein predicts decreased survival and correlates with loss of p16INK4 protein in gallbladder carcinomas. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4096-100.
32. SOLIMAN AS, BONDY ML, EL-BADAWY SA, MOKHTAR N, EISSA S, BAYOUMY S ET AL. Contrasting molecular pathology of colorectal carcinoma in Egyptian and Western patients. *Br J Cancer* 2001; 85: 1037-46.
33. McCREDIE M. Cancer epidemiology in migrant populations. *Recent Results Cancer Res* 1998; 154: 298-305.
34. DONG M, NIO Y, TAMURA K, SONG MM, GUO KJ, GUO RX ET AL. Ki-ras point mutation and p53 expression in human pancreatic cancer: a comparative study among Chinese, Japanese, and Western patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 279-84.
35. THOMAS HV, REEVES GK, KEY TJ. Endogenous estrogen and postmenopausal breast cancer: a quantitative review. *Cancer Causes Control* 1997; 8: 922-8.
36. ROA I, ARAYA JC, WISTUBA I, VILLASECA M, DE ARETXABALA X, BURGOS L. Cáncer de la vesícula biliar en la IX región de Chile. Impacto del estudio anatomopatológico de 474 casos. *Rev Méd Chile* 1994; 122: 1248-56.
37. CHEN Z, KO A, YANG J, JORDAN VC. Methylation of CpG island is not a ubiquitous mechanism for the loss of oestrogen receptor in breast cancer cells. *Br J Cancer* 1998; 77: 181-5.
38. ADAMS JB. Enzymatic regulation of estradiol-17 beta concentrations in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 1992; 20: 145-54.
39. MARUYAMA R, TOYOOKA S, TOYOOKA KO, VIRMANI AK, ZOCHBAUER-MULLER S, FARINAS AJ ET AL. Aberrant promoter methylation profile of prostate cancers and its relationship to clinicopathological features. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 514-9.
40. QUAN ZW, WU K, WANG J, SHI W, ZHANG Z, MERRELL RC. Association of p53, p16, and vascular endothelial growth factor protein expressions with the prognosis and metastasis of gallbladder cancer. *J Am Coll Surg* 2001; 193: 380-3.
41. ESTELLER M, GONZÁLEZ S, RISQUES RA, MARCUELLO E, MANGUES R, GERMA JR ET AL. K-ras and p16 aberrations confer poor prognosis in human colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19: 299-304.