

Preinvaziv Servikal Lezyonlar ve İnvazif Skuamoz Hücreli Kanserlerde P16^{Ink4a}'nın Ekspresyonu ve Klinik Önemi

p16^{Ink4a} Expression in Preinvasive Cervical Lesions and Invasive Cancer, and its Clinical Value

Gonca Çoban¹, Halis Özdemir², Özlem Özen³,
Asuman Nihan Haberal³, Polat Dursun⁴, Ali Ayhan⁵

ABSTRACT

Object: To evaluate the clinical significance of p16^{Ink4a} expression in preinvasive cervical lesion and cervical cancer.

Materials And Methods: Between February 2007 and September 2009 in Baskent University Department of Obstetrics and Gynecology, 48 patients with histopathologic examination of LSIL and 46 HSIL who had undergone LEEP, and 30 squamous cell cervical cancer cases as a control group retrospective p16 immunohistochemically evaluated the relationship between staining pattern and lesion grade.

Results: Positivity of p16^{Ink4a} is significantly increases with lesion grade and HPV DNA positivity, indicate the severity of the lesion.

Keywords: p16^{Ink4a}, preinvasive cervical lesions

ÖZET

Amaç: Preinvaziv servikal lezyon ve serviks kanserinde p16^{Ink4a} ekspresyonunun klinik önemini saptamak.

Gereç ve Yöntem: Başkent Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Ana Bilim Dalı Jinekolojik Onkoloji Bölümü'nde Şubat 2007 ile Eylül 2009 tarihleri arasında LEEP yapılan histopatolojik inceleme sonucu LSIL olan 48 vaka ile, 46 HSIL olarak raporlanmış toplam 94 hasta ve kontrol grubu olarak da 30 skuamoz hücreli servikal kanser olgusu retrospektif p16 ile immunohistokimyasal olarak boyanma paterninin lezyon derecesi ile ilişkisi değerlendirilmiştir.

Sonuç: p16^{Ink4a} pozitifliği, lezyonun derecesi ve HPV DNA pozitifliği ile anlamlı olarak artmaktadır ve lezyonun ciddiyetini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: p16^{Ink4a}, preinvaziv servikal lezyon

Geliş Tarihi: 07/02/2018

Kabul Tarihi: 04/09/2019

¹Başkent Üniversitesi Tıp fakültesi, İzmir Zübeyde Hanım Uygulama ve Araştırma Merkezi, Kadın Hast. ve Doğum AD, İzmir-Türkiye

²Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hast. ve Doğum AD Ankara, Türkiye

³Başkent Üniversitesi Tıp fakültesi, Ankara Uygulama ve Araştırma Merkezi, Patoloji AD Ankara-Türkiye

⁴Serbest hekim, Ankar

⁵Başkent Üniversitesi Tıp fakültesi, Ankara Uygulama ve Araştırma Merkezi, Kadın Hastalık AD Ankara-Türkiye

İletişim: Dr. Gonca Çoban

Adres: ¹Başkent Üniversitesi Tıp fakültesi, İzmir Zübeyde Hanım Uygulama ve Araştırma Merkezi, Kadın Hast. ve Doğum AD, İzmir-Türkiye

Tel: +90 532 630 72 50

E-posta: drgoncacoban@yahoo.com

Giriş

Yirminci yüzyılın ilk yarısında, Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde serviks kanserinden ölüm, diğer kanser türlerinden daha fazla olarak görülmekteydi. 1940'larda papanicolaou yönteminin uygulamaya girilmesiyle preinvaziv lezyonların tanısı ve tedavisi mümkün hale gelmiştir. Bu gelişmelerle 20. yüzyılın sonlarına doğru ABD'de sıklık ve mortalite oranları %75'e varan oranlarda azalma göstermiştir¹. İnvaziv servikal kanser intraepitelyal bir fazdan sonra meydana gelir (Prekürsör servikal lezyon/intraepitelyal neoplazi/CIN) ve prekürsör lezyonlu kadınların tümünde gelecekte invaziv kanser gelişmeyecektir. HPV enfeksiyonu,dünyadaki seksüel geçişli en sık rastlanan hastalık olup, CIN ve servikal kanserin ana sebebini oluşturmaktadır.²

Farklı HPV tipleri, E6 ve E7 viral genlerini kodlayan onkoproteinlerin düzeylerini etkileyerek farklı derecelerde servikal kanser ile ilişkilidir.³ P16^{INK4a}, pRb'nin hipofosforilasyonuna, E2F'in serbest kalmasına sebep olan ve G1 fazından S fazına geçişini hızlandıran CK4 ve CDK6'ya bağlanarak hücre siklusunu azaltan, siklin bağımlı kinaz inhibitörü bir proteindir. Yüksek riskli HPV E7 onkoproteinleri, p16 düzeyini negatif olarak regüle eden pRb'yi inaktive ederek yüksek riskli HPV ile enfekte neoplastik hücrelerde p16 'nın artmasına neden olmaktadır.²

Bu çalışma ile p16 ekspresyonunun intraepitelyal servikal lezyonlar ve invaziv servikal kanserdeki yerini ve klinik önemini değerlendirmektedir.

Gereç ve Yöntem

Başkent Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Ana Bilim Dalı Jinekolojik Onkoloji Bölümü'nde Şubat 2007 ile Eylül 2009 tarihleri arasında histopatolojik inceleme sonucu LSIL olan 48 vaka ile, 46 HSIL olarak raporlanmış toplam 94 hasta ve kontrol grubu olarak da 30 squamoz hücreli servikal kanser olgusu retrospektif olarak seçilmiş ve çalışmaya dahil edilmiştir. Bu çalışma KA09/414 proje numarası ile etik kurul onayı alınarak yapılan bir tez çalışmasıdır. Hastane bilgisayar veri tabanı ve yazılı patoloji raporlarından, 96 adet LEEP materyali ve 28 adet Tip III histerektomi materyali olmak üzere toplam 124 histopatolojik incelemeye ait kayıtlar incelemek patolojik kayıtlarına, materyallerine ve demografik bilgilerine ulaşılmıştır.

Başkent Üniversitesi Patoloji Ana Bilim Dalı Laboratuvarında, olgulara ait cerrahi materyallerden (96 LEEP materyali (2 tanesi mikroinvaziv kanser), 28 adet Tip III Histerektomi materyali) seçilen parafin bloklardan hazırlanan örnekler, p16 immunohistokimsiyal boya ile boyanmıştır.

Formalin fiske, parafin gömülü blok halindeki biyopsi materyallerinden 4 mikronluk seri kesitler alındı ve bir tanesi histopatolojik tanının doğrulanması için H&E ile boyandı. İmmünohistokimyasal analiz için birbirini izleyen kesitler işleme tabi tutuldu. Kesitler deparafinizasyon işleminden sonra antijenin geri kazanılması için, mikrodalga fırında 110 o C'de, 10 mM trisodyum sitrat tampon çözeltisinde (pH 6.0) 10 dakika kaynatılmıştır. Endojen peroksidaz aktivitesi, kesitlerin PBS içinde %1 hidrojen peroksizde 5 dakika inküasyonu ile bloke edilmiştir. Nonspesifik bağlanmaların %1,5'lük normal at serumu ile 30 dk preinkübe edilerek bloke edilmesinin ardından primer antikor (Mouse anti-human p16^{INK4a} Antikoru, CINtec Histology Kit, mtm laboratories AG, Germany), oda ısısında 45 dakika uygulandı. Daha sonra, biotinlenmiş at anti-mouse veya anti-rabbit serum sekonder antikorları damlatılarak oda ısısında 30 dakika bekletildi. Takiben avidin-biotin kompleksi ile 30 dakika inkübe edildikten sonra kesitlere DAB (3,3'-diaminobenzidin) kromojen damlatıldıktan sonra çeşme suyunda yıkandı ve hemotoksilen ile 10 saniye zıt boyama yapıldı.

Pozitif kontrol olarak p16 antikoru pozitif olduğu bilinen bir serviks invaziv karsinomu kullanıldı. Negatif kontrol olarak bir kesite primer antikor uygulanmaksızın immunohistokimyasal boyama yapıldı.

İmmünohistokimyasal bulgular, tek bir patolog tarafından değerlendirildi ve nükleer boyanma ile birlikte sitoplazmik boyanma pozitif reaksiyon olarak kabul edildi. Negatif; <%1 hücre pozitifliği,sporadik ;izole hücreler pozitif fakat <%5, fokal; küçük hücre kümeleri fakat hücrelerin <%25 pozitif ve diffüz; boyanan hücreler >%25 olarak sınıflandırılmıştır.

İstatistiksel Analiz

Çalışma verileri,SPSS versiyon 17.0 istatistik paket programına (Statistical Package for the Social Sciences,version 17.0, SPSS Inc,Chicago, III, USA) aktarılarak analiz edilmiştir. Hastaların yaşı ortalama; HPV varlığı; p16^{INK4a} varlığı sayısı ve yüzde açısından sunulmuştur. Tanıya göre HPV ve p16^{INK4a} boyanma miktarı karşılaştırılmasında Ki-kare analizi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi p<0.05 olarak kabul edilmiştir.

Bulgular

Doksan altı LEEP , 28 Tip III histerektomi materyalinin histopatolojik sonuçlarına göre toplam 124 olgu değerlendirildiğinde; LSIL histopatolojik tanısı olan 48 hastalık grubun yaş ortalaması 39.3 (minimum 24 – maksimum 61), HSIL tanılı 46 olgunun yaş ortalaması 39.9 (minimum 23- maksimum 82), invaziv skuamoz hücreli servikal kanser tanısı alan 30 hastanın yaş orta-

Tablo 1. Histopatolojik Tanılara Göre P16 Boyanma Paternleri

Histolojik tanı	p16 boyanma paterni				
	Negatif n (%)	Sporadik n (%)	Fokal n (%)	Toplam (%)	Diffüz n (%)
LSIL	10 (20.8)	12 (25)	12 (25)	14 (29.2)	48
HSIL	1 (1.9)	2 (4.3)	9 (19.5)	34 (74.3)	46
Kanser	1 (3.3)	0 (0)	0 (0)	29 (96.7)	30
Toplam	12 (9)	14 (11)	21 (18)	77 (62)	124

LSIL; low grade squamous lesion, HSIL; high grade squamous lesion

laması 55.4 (minimum 35-maksimum 84) olup, gruplar arasında invaziv skuamoz hücreli servikal kanser tanılı olgular anlamlı olarak daha yaşlı idi. (p<0.001)

Immunohistokimyasal boyama sonuçları incelendiğinde HSIL tanılı 46 vakadan sadece 1 vakada p16^{INK4a} negatif idi. Histopatolojik tanılarına göre olgular sınıflandırıldığında p16^{INK4a}'nın boyanma paternlerine göre dağılımı Tablo 1'de sunulmuştur.

Invaziv skuamoz hücreli servikal kanser olan 30 hastadan sadece 1 olguda p16^{INK4a} negatif saptandı. Ki-kare analizi ile değerlendirildiğinde istatistiksel olarak LSIL ve HSIL olgularının p16^{INK4a} pozitiflikleri arasında anlamlı düzeyde farklılık saptanmıştır. (p<0.001) LSIL ve kanser olguları arasında da aynı istatistiksel farklılık bulunmuştur, ancak HSIL ve kanser olguları arasında p16^{INK4a} pozitifliği açısından anlamlı bir fark yoktur. (p<0.219)

Ki-kare analizinde LSIL ve HSIL vakaları arasındaki p16^{INK4a} dağılımı Tablo 2'de gösterilmiştir.

Çalışmamızdaki LSIL ve HSIL tanılı olan hastaların dosyaları incelendiğinde; 48 vakayı içeren LSIL grubundan 33'ünün (%70) ve 46 olgudan oluşan HSIL grubundan 33 tanesi (%70) olmak üzere toplam 66 hastanın HPV PCR verilerine ulaşıldı. Olguların HPV

PCR sonuçları ile patolojik tanıların verileri Tablo 3'te sunulmuştur.

Histolojik tanıları ile HPV PCR sonuçları ve p16 boyanma paternleri arasındaki ilişki Tablo 4'te özetlenmiştir.

Çalışmada Ki-Kare istatistik analizi ile p16^{INK4a} pozitifliği /negatifliği ve HPV DNA pozitifliği/negatifliği arasında anlamlı derecede ilişki bulunmuştur. p16^{INK4a} pozitif olan 47 vakadan 30'unda (%64) HPV DNA pozitif iken, 17'sinde (%36) negatif idi. p16^{INK4a} negatif olan grupta ise 13 hastada (%68) HPV DNA negatif iken sadece 6 vakada pozitif saptanmıştır. (p<0.017)

Tartışma

Çalışmalarımızın bulguları ışığında LSIL, HSIL, invaziv skuamoz hücreli servikal kanser vakalarının p16^{INK4a} ile boyanma düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. (p<0.001) HSIL tanılı olguların %74.3'ünde diffüz p16^{INK4a} pozitifliği saptanırken invaziv kanser olgularının %96.4'ünde p16^{INK4a} diffüz pozitifliği saptanmıştır. İstatistiksel olarak LSIL vakaları ile HSIL ve invaziv skuamoz hücreli kanser vakaları arasında anlamlı fark saptanırken (p<0.001), HSIL ve kanser vakaları arasındaki fark anlamsız bu-

Tablo 2. LSIL ve HSIL Vakaları Arasındaki p16^{INK4a} Dağılımı

	p16 boyanma paterni	
	LSIL n (%)	HSIL n (%)
p 16 negatif	22 (88)	3 (12)*
p16 pozitif	26 (38)	43 (62)*

*p<0.001; LSIL; low grade squamous lesion, HSIL; high grade squamous lesion

Tablo 3. HPV PCR Sonuçları ile Histopatolojik Tanılar

	p16 boyanma paterni		HPV	
	Yüksek riskli HPV n (%)	Düşük riskli HPV n (%)	Negatif n (%)	Toplam n
LSIL	13 (39)	1 (3)	19 (58)	33
HSIL	22 (67)	0 (0)	11 (33)	33

LSIL; low grade squamous lesion, HSIL; high grade squamous lesion

lunmuştur ($p < 0.219$). Bu sonuç, Klaes ve arkadaşları⁴ ile Wang ve arkadaşlarının⁵ çalışmalarında CIN3 vakalarının %100 'nün diffüz p16^{INK4a} pozitifliğine yakın bir değer oluşturmaktadır.

LSIL, HSIL, invaziv skuamöz hücreli karsinom arasında p16^{INK4a} pozitifliği ve boyanma paternleri açısından anlamlı düzeyde farklılık saptanmıştır ($p < 0.001$). Bu sonuçlar literatürle uyumlu olmakla birlikte, 1 invaziv kanser vakasında p16^{INK4a} negatifliği bulunması çalışmada kullanılan dokuların parafin bloklardan eldesi nedeniyle olabilir. p16^{INK4a} HPV-DNA yoğunluğuna bağlı bir belirteç olduğundan, parafin bloklardan elde edilen örnekler sensitiviteyi düşürebilir. Kaldı ki HPV DNA tespitinin en sağlıklı sonuçlarının taze dokular üzerindeki incelemeler ile elde edilebileceğini bildiren yayınlar 6 olduğunu gözönüne alarak bunun p16^{INK4a} düzeyinin de etkilenmesine neden olabileceğini düşünebilir.

Özellikle LSIL vakalarının değerlendirmesinde engel oluşturan inflamatuvar hücreler, preinvaziv servikal

lezyonun takibi ve uygulanacak prosedürün kararında önem arz etmektedir. p16^{INK4a}'nın HSIL ve servikal kanser tanısındaki etkinliği bir çok çalışmada gösterilmekle birlikte, bu belirteçin LSIL'i değerlendirmedeki etkisi hala tartışmalıdır.^{2,7-30} Bu konuda NTCC'nin LSIL'de HPV DNA ile p16^{INK4a} 'yı karşılaştırdığı randomize kontrollü çalışmasında, ikisinin kombinasyonu konvensiyonel sitoloji ile karşılaştırıldığında sensitivite anlamlı olarak artmakla birlikte kolposkopiye refere edilen hasta sayısında anlamlı bir azalma saptanmamıştır.³¹

Bizim çalışmamızın da gösterdiği gibi p16^{INK4a} pozitifliği, lezyonun derecesi ve HPV DNA pozitifliği ile anlamlı olarak artmaktadır ve lezyonun ciddiyetini göstermektedir. Ancak, literatürde yapılan çok sayıda çalışma kıyaslandığında boyanma paterninin değerlendirilmesinde farklı sınıflandırmalar kullanılmıştır. Bu da p16^{INK4a} değerlendirilmesi için bir cut-off belirlenmesinin önemini ortaya koymaktadır.³²

Tablo 4. HPV PCR Sonuçları ve p16 Boyanma Paternleri

HPV	Histoloji	P16 Negatif n (%)	P16 Sporadik pozitif n (%)	P16 Fokal pozitif n (%)	P16 Diffüz pozitif n (%)
Yüksek riskli	LSIL	1 (8)	2 (23)	3 (23)	6 (46)
Pozitif	HSIL	1 (4)	0 (0)	3 (13)	18 (83)
Düşük riskli	LSIL	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Pozitif	HSIL	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
HPV	LSIL	4 (21)	7 (37)	5 (26)	3 (16)
Negatif	HSIL	0 (0)	2 (18)	1 (9)	8 (73)

LSIL; low grade squamous lesion, HSIL; high grade squamous lesion

Olgu sayısının az olması ve retrospektif olması çalışmamızın zayıf taraflarını oluşturmaktadır.

Sonuç olarak histolojik materyallerde diffüz p16^{INK4a} pozitifliği, hastalığın progresyonu için prediktör olabilir.^{5,9,12,33} p16^{INK4a} pozitifliği, lezyonun derecesi ve HPV DNA pozitifliği ile anlamlı olarak artmaktadır ve lezyonun ciddiyetini göstermektedir. Özellikle düşük dereceli lezyonlar olmak üzere için preinvaziv servikal lezyonların tedavi, triaj ve takibinde p16^{INK4a}'nın kullanılması için daha fazla hasta sayısı ve uzun izlem süresine sahip prospektif randomize kontrollü çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kaynaklar

1. Rock JA, Jones HW, Te Linde RW. Te Linde's operative gynecology. 10th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
2. Focchi GR, Silva ID, Nogueira-de-Souza NC, Dobo C, Oshima CT, Stavale JN. Immunohistochemical expression of p16(INK4A) in normal uterine cervix, nonneoplastic epithelial lesions, and low-grade squamous intraepithelial lesions. *J Low Genit Tract Dis.* 2007 Apr;11(2):98-104.
3. Godoy AE, Mandelli J, Oliveira FH, Calegari S, Moura LB, Serafini EP. p16INK4 expression in precursor lesions of squamous cell cervical cancer related to the presence of HPV-DNA. *Braz J Med Biol Res.* 2008 Jul;41(7):583-8
4. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, et al. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer.* 2001 Apr 15;92(2):276-84.
5. Wang SS, Trunk M, Schiffman M, Herrero R, Sherman ME, Burk RD, et al. Validation of p16INK4a as a marker of oncogenic human papillomavirus infection in cervical biopsies from a population-based cohort in Costa Rica. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004 Aug;13(8):1355-60.
6. Lukaszuk K, Liss J, Gulczynski J, Nowaczyk M, Nakonieczny M, Piatkowski M, et al. Predictive value of HPV DNA in lymph nodes in surgically treated cervical carcinoma patients--a prospective study. *Gynecol Oncol.* 2007 Mar;104(3):721-6.
7. Guimaraes MC, Goncalves MA, Soares CP, Bettini JS, Duarte RA, Soares EG. Immunohistochemical expression of p16INK4a and bcl-2 according to HPV type and to the progression of cervical squamous intraepithelial lesions. *J Histochem Cytochem.* 2005 Apr;53(4):509-16
8. Ozgul N, Cil AP, Bozdayi G, Usubutun A, Bulbul D, Rota S, et al. Staining characteristics of p16INK4a: is there a correlation with lesion grade or high-risk human papilloma virus positivity? *J Obstet Gynaecol Res.* 2008 Oct;34(5):865-71
9. Yildiz IZ, Usubutun A, Firat P, Ayhan A, Kucukali T. Efficiency of immunohistochemical p16 expression and HPV typing in cervical squamous intraepithelial lesion grading and review of the p16 literature. *Pathol Res Pract.* 2007;203(6):445-9.
10. Omori M, Hashi A, Nakazawa K, Yuminamochi T, Yamane T, Hirata S, et al. Estimation of prognoses for cervical intraepithelial neoplasia 2 by p16INK4a immunoppression and high-risk HPV in situ hybridization signal types. *Am J Clin Pathol.* 2007 Aug;128(2):208-17.
11. Nam EJ, Kim JW, Kim SW, Kim YT, Kim JH, Yoon BS, et al. The expressions of the Rb pathway in cervical intraepithelial neoplasia; predictive and prognostic significance. *Gynecol Oncol.* 2007 Jan;104(1):207-11.
12. Iaconis L, Hyjek E, Ellenson LH, Pirog EC. p16 and Ki-67 immunostaining in atypical immature squamous metaplasia of the uterine cervix: correlation with human papillomavirus detection. *Arch Pathol Lab Med.* 2007 Sep;131(9):1343-9.
13. Hariri J, Oster A. The negative predictive value of p16INK4a to assess the outcome of cervical intraepithelial neoplasia 1 in the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol.* 2007 Jul;26(3):223-8.
14. Eleuterio Junior J, Giraldo PC, Cavalcante DI, Goncalves AK, Eleuterio RM. [Association between high risk HPV viral load, p16ink4a expression and intra-epithelial cervical lesions]. *Rev Assoc Med Bras.* 2007 Nov-Dec;53(6):530-4.
15. Bahnassy AA, Zekri AR, Saleh M, Lotayef M, Moneir M, Shawki O. The possible role of cell cycle regulators in multistep process of HPV-associated cervical carcinoma. *BMC Clin Pathol.* 2007;7:4.
16. Queiroz C, Silva TC, Alves VA, Villa LL, Costa MC, Travassos AG, et al. P16(INK4a) expression as a potential prognostic marker in cervical pre-neoplastic and neoplastic lesions. *Pathol Res Pract.* 2006;202(2):77-83.
17. Lambert AP, Anschau F, Schmitt VM. p16INK4A expression in cervical premalignant and malignant lesions. *Exp Mol Pathol.* 2006 Apr;80(2):192-6.
18. Ishikawa M, Fujii T, Saito M, Nindl I, Ono A, Kubushiro K, et al. Overexpression of p16 INK4a as an indicator for human papillomavirus oncogenic activity in cervical squamous neoplasia. *Int J Gynecol Cancer.* 2006 Jan-Feb;16(1):347-53.
19. Ekalaksananan T, Pientong C, Sriamporn S, Kongyingyoes B, Pengsa P, Kleebkaow P, et al. Usefulness of combining testing for p16 protein and human papillomavirus

- (HPV) in cervical carcinoma screening. *Gynecol Oncol*. 2006 Oct;103(1):62-6.
20. Bulten J, van der Avoort IA, Melchers WJ, Massuger LF, Grefte JM, Hanselaar AG, et al. p14ARF and p16INK4A, two products of the same gene, are differently expressed in cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol*. 2006 Jun;101(3):487-94.
 21. Benevolo M, Mottolese M, Marandino F, Vocaturo G, Sindico R, Piperno G, et al. Immunohistochemical expression of p16(INK4a) is predictive of HR-HPV infection in cervical low-grade lesions. *Mod Pathol*. 2006 Mar;19(3):384-91.
 22. Andersson S, Wangsa D, Flores-Staino C, Safari H, Mints M, Hjerpe A, et al. Expression of p16(INK4a) in relation to histopathology and viral load of 'high-risk' HPV types in cervical neoplastic lesions. *Eur J Cancer*. 2006 Nov;42(16):2815-20.
 23. Qiao X, Bhuiya TA, Spitzer M. Differentiating high-grade cervical intraepithelial lesion from atrophy in postmenopausal women using Ki-67, cyclin E, and p16 immunohistochemical analysis. *J Low Genit Tract Dis*. 2005 Apr;9(2):100-7.
 24. Nieh S, Chen SF, Chu TY, Lai HC, Lin YS, Fu E, et al. Is p16(INK4A) expression more useful than human papillomavirus test to determine the outcome of atypical squamous cells of undetermined significance-categorized Pap smear? A comparative analysis using abnormal cervical smears with follow-up biopsies. *Gynecol Oncol*. 2005 Apr;97(1):35-40.
 25. Lorenzato M, Caudroy S, Bronner C, Evrard G, Simon M, Durlach A, et al. Cell cycle and/or proliferation markers: what is the best method to discriminate cervical high-grade lesions? *Hum Pathol*. 2005 Oct;36(10):1101-7.
 26. Lin Z, Gao M, Zhang X, Kim YS, Lee ES, Kim HK, et al. The hypermethylation and protein expression of p16 INK4A and DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase in various uterine cervical lesions. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2005 Jun;131(6):364-70.
 27. Kim HJ, Kim MH, Song MH, Song DE, Yu E. [Immunohistochemical study of p53 mutation and p16, p14 alterations encoded by INK4a-ARF in mucin-hypersecreting bile duct tumor]. *Korean J Gastroenterol*. 2005 Mar;45(3):189-94.
 28. Kalof AN, Evans MF, Simmons-Arnold L, Beatty BG, Cooper K. p16INK4A immunorexpression and HPV in situ hybridization signal patterns: potential markers of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol*. 2005 May;29(5):674-9.
 29. Yuan JR, Li Y, Hu SJ, Li P. [Methylation and aberrant expression of the p16 gene in cervical carcinoma]. *Yi Chuan*. 2005 Jan;27(1):39-43.
 30. Dray M, Russell P, Dalrymple C, Wallman N, Angus G, Leong A, et al. p16(INK4a) as a complementary marker of high-grade intraepithelial lesions of the uterine cervix. I: Experience with squamous lesions in 189 consecutive cervical biopsies. *Pathology*. 2005 Apr;37(2):112-24.
 31. Carozzi F, Confortini M, Dalla Palma P, Del Mistro A, Gillio-Tos A, De Marco L, et al. Use of p16-INK4A overexpression to increase the specificity of human papillomavirus testing: a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2008 Oct;9(10):937-45.
 32. Tsoumpou I, Arbyn M, Kyrgiou M, Wentzensen N, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, et al. p16(INK4a) immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev*. 2009 May;35(3):210-20.
 33. Negri G, Vittadello F, Romano F, Kasal A, Rivasi F, Girlando S, et al. p16INK4a expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. *Virchows Arch*. 2004 Dec;445(6):616-20.