

Perbedaan Ekspresi P16INK4a dan HPV L1 pada *Cervical Intraepithelial Neoplasia 1, Cervical Intraepithelial Neoplasia 2, Cervical Intraepithelial Neoplasia 3* dan *Squamous Cell Carcinoma* Serviks Uteri

Arlene Elizabeth Padang¹, Luh Yeni Laksmi¹, Moestikaningsih¹, Gede Raka Widiana²
Patologi Anatomi¹, Ilmu Penyakit Dalam² Fakultas Kedokteran Universitas Udayana / Rumah Sakit Umum Pusat Sanglah, Denpasar

ABSTRAK

Human papillomavirus (HPV) memegang peranan penting dalam proses karsinogenesis kanker serviks uteri; namun hanya sebagian kecil wanita yang terinfeksi tersebut akan berkembang menjadi kanker serviks yang invasif. *Cervical intraepithelial neoplasia* (CIN) merupakan spektrum dari lesi servikal yang mewakili lesi prekursor dari *squamous cell carcinoma* (SCC) serviks uteri yang dikategorikan menjadi CIN1, CIN2, CIN3. Interaksi protein HPV (E6 dan E7) dengan protein pengatur selular (pRb dan p53) akan menyebabkan *up regulation* protein P16INK4a. P16INK4a merupakan tumor supresor protein *cyclin dependent kinase inhibitor* yang menghambat *cyclin dependent kinase 4* dan *6* yang merupakan produk dari gen INK4a yang terlibat dalam fosforilasi protein retinoblastoma (pRb). *Human papillomavirus-late 1* (HPV L1) merupakan protein kapsid yang terekspresi pada saat awal fase produktif karsinogenesis serviks uteri. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui perbedaan ekspresi protein P16INK4a dan HPV L1 pada CIN1, CIN2, CIN3, dan SCC serviks uteri, dimana ekspresi P16INK4a dapat membantu untuk membedakan berbagai derajat displasia serviks uteri dan ekspresi HPV L1 dapat membantu untuk memprediksi progresivitas dari berbagai derajat displasia serviks uteri, sehingga penanganan pasien menjadi lebih tepat. [MEDICINA 2013;44:77-81].

Kata kunci: HPV, CIN1, CIN2, CIN3, P16INK4a, HPV L1

Differences in the expression of P16INK4a and HPV L1 Cervical Intraepithelial Neoplasia 1, Cervical Intraepithelial Neoplasia 2, Cervical Intraepithelial Neoplasia 3 and Squamous Cell Carcinoma of Uterine Cervix

Arlene Elizabeth Padang¹, Luh Yeni Laksmi¹, Moestikaningsih¹, Gede Raka Widiana²
Department of Pathologic Anatomy¹, Internal Medicine² Medical School, Udayana University, Sanglah Hospital, Denpasar

ABSTRACT

Human papillomavirus (HPV) plays an important role in the carcinogenesis of uterine cervical cancer, and only a small proportion of infected women will develop into invasive cervical cancer. Cervical intraepithelial neoplasia (CIN) is a spectrum of cervical lesions represent precursor lesions of squamous cell carcinoma (SCC) uterine cervix that categorized as CIN1, CIN2, CIN3. Interactions of oncoprotein HPV (E6 and E7) with cellular regulatory proteins (pRb and p53) will cause up-regulation of protein P16INK4a. P16INK4a is a tumor suppressor protein cyclin dependent kinase inhibitor that inhibits cyclin dependent kinases 4 and 6, which is a product of the INK4a gene that involved in the phosphorylation of retinoblastoma protein (pRb). *Human papillomavirus-late 1* (HPV L1) capsid protein expressed at the beginning of the productive fase of carcinogenesis cervix uteri. The purpose of this study was to determine differences in protein expression of P16INK4a and HPV L1 in CIN1, CIN2, CIN3, and SCC uterine cervix. The expression of P16INK4a can help to distinguish various degrees of dysplasia of the uterine cervix and the expression of HPV L1 can help to predict the progression of various degrees of dysplasia of the uterine cervix, so the management of the patient becomes more appropriate. [MEDICINA 2013;44:77-81].

Keywords: HPV, CIN1, CIN2, CIN3, P16INK4a, HPV L1

PENDAHULUAN

Kanker serviks merupakan salah satu keganasan yang paling sering terjadi pada wanita di seluruh dunia. Sejak adanya program skrining *pap-*

smear, morbiditas dan mortalitas kanker serviks menurun secara drastis; namun, jumlah kasus baru di seluruh dunia masih tinggi yaitu mencapai 400000 kasus setiap tahun.¹ Berdasarkan data registrasi kanker berbasis

patologi pada tahun 2006 di Denpasar, terdapat 250 kasus kanker serviks yang menduduki peringkat pertama kanker terbanyak pada wanita, sedangkan pada tahun 2007 terdapat 226 kasus kanker serviks

dan merupakan kanker kedua terbanyak pada wanita setelah kanker payudara, dan pada tahun 2008, jumlah kasus meningkat menjadi 270 dan menduduki peringkat kedua terbanyak setelah kanker.²⁻⁴

Human papillomavirus (HPV) merupakan faktor penyebab utama lesi epitel pre-malignan (lesi displasia; lesi prekursor/preneoplastik; *cervical intraepithelial neoplasia*; CIN) dan malignan (*squamous cell carcinoma*; SCC) pada mukosa serviks.^{1,5} Genom dari HPV mengkode 8 gen, yaitu 6 nonstruktural protein awal (E1, E2, E4, E5, E6, E7) dan 2 protein akhir (L1 dan L2).⁶ Antigen kapsid virus L1 dipertimbangkan menjadi target mayor respon imun selular,⁷ sehingga berkurangnya atau hilangnya produksi antigen kapsid dapat merupakan berkurangnya respon imun selular. Hilangnya protein L1 pada awal proses transformasi dapat menyebabkan stimulasi respon imun yang tidak tepat, sehingga terjadi transformasi sel epitel imatur.⁸

Human papillomavirus berkontribusi dalam perkembangan lesi neoplastik melalui onkoprotein virus yang disebut dengan E6 dan E7.⁹ Inaktivasi pRB oleh protein E7 dari HPV dapat menyebabkan *upregulation* P16INK4a pada lesi servikal.¹⁰ Ekspresi P16INK4a tersebut mencetuskan kontrol *feedback* negatif terhadap pRB sehingga meningkatkan kadar P16INK4a yang biasanya akan menghambat fosforilasi pRB dan memblokir pelepasan *elongation 2 factor* (E2F).^{10,11} Meskipun demikian P16INK4a ini tidak dapat menetralkan pelepasan E2F yang diperantarai oleh E7 dari HPV, sehingga terdapat akumulasi yang berlebihan dari protein P16INK4a yang tidak efektif pada sel. Gangguan pengaturan jalur siklus sel pRB-P16INK4a menghasilkan

proliferasi sel yang tidak terbatas yang pada akhirnya berkontribusi terhadap transformasi sel ke arah keganasan.¹⁰

Dalam praktik sehari-hari, di laboratorium Patologi Anatomi RSUP Sanglah pada kasus-kasus karsinoma serviks uteri terdapat berbagai tingkatan lesi displasia yaitu CIN1, CIN2, CIN3 yang menyertai lesi invasif. Sementara pada sampling biopsi hanya sebagian kecil lesi yang terambil, bahkan hanya epitel permukaan saja tanpa stroma jaringan ikat subepitel sehingga belum tentu mendapatkan bagian jaringan yang mengalami perubahan morfologi yang berat yang menunjukkan gambaran displasia maupun proses invasif, sedangkan penilaian perubahan histomorfologi/diagnosis histologi sering menimbulkan kesulitan dan ketidaksepakatan di antara ahli patologi dengan hanya pewarnaan Hematoxililn dan Eosin (H&E) saja. Hal ini sesuai seperti yang dinyatakan oleh Klaes dkk¹² dalam penelitiannya bahwa terdapat ketidaksesuaian dalam interpretasi diagnostik menggunakan pewarnaan H&E khususnya untuk lesi yang *low grade*, nilai kappa adalah 0,60; sedangkan dengan menggunakan P16INK4a terdapat kesepakatan yang lebih baik secara signifikan dalam interpretasi derajat displasia serviks uteri, nilai kappa menjadi 0,91.

Berdasarkan hal tersebut di atas bahwa terdapat kesulitan diagnosis konvensional dalam menentukan berbagai derajat displasia serviks uteri dan kesulitan dalam menentukan lesi yang progresif dengan yang regresi, maka perlu dilakukan penelitian dengan menggunakan pulasan imunohistokimia P16INK4a dan HPV L1 yang bertujuan untuk mengetahui perbedaan ekspresinya pada berbagai derajat displasia (CIN1, CIN2, CIN3) dan SCC serviks uteri, membuktikan bahwa ekspresi P16INK4a lebih tinggi

pada SCC serviks uteri dibandingkan dengan CIN1, CIN2 dan CIN3 yang menegaskan proses karsinogenesis karsinoma serviks uteri yang berkaitan dengan infeksi HPV serta membuktikan bahwa ekspresi HPV L1 lebih tinggi pada CIN1 dibandingkan dengan CIN2, CIN3 dan SCC serviks uteri. Nilai pemeriksaan tersebut bermanfaat dalam memberikan informasi tambahan kepada klinisi sehingga penatalaksanaan pasien menjadi lebih tepat dan juga dapat digunakan sebagai salah satu parameter untuk memprediksi perangsang biologik lesi CIN serta lebih memudahkan identifikasi lesi CIN pada spesimen histologi.

BAHAN DAN METODE

I. Subjek

Penelitian ini merupakan penelitian *preliminary* dengan menggunakan metode analitik potong lintang yang dilakukan di Bagian/SMF Patologi Anatomi FK Unud/RSUP Sanglah, Denpasar dan di Bagian/SMF Patologi Anatomi FK Universitas Gajah Mada/RSUP Sardjito, Yogyakarta dari 1 Maret 2013-31 Mei 2013. Populasi penelitian adalah semua bahan biopsi dan kolposkopi dari blok parafin penderita CIN1, CIN2, CIN3 dan SCC serviks uteri. Sampel penelitian adalah semua bahan biopsi dan kolposkopi dari blok parafin penderita CIN1, CIN2, CIN3 dan SCC serviks uteri yang diperiksa secara histopatologi di Laboratorium Patologi Anatomi Swasta, Denpasar dari tanggal 1 Januari 2011-31 Desember 2012 yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Adapun kriteria inklusi adalah sampel didiagnosis sebagai CIN1, CIN2, CIN3 dan SCC serviks uteri. Kriteria eksklusi adalah kasus dengan diagnosis histopatologik belum pasti (misalnya meragukan antara CIN3 dengan *squamous metaplasia*, atau proses reaktif karena inflamasi) atau masih ada diagnosis banding, sediaan banyak

mengandung jaringan nekrosis atau perdarahan, blok parafin rusak atau berjamur. Besar sampel ditentukan sebanyak 10 sampel CIN1, 10 sampel CIN2, 10 sampel CIN3, dan 30 sampel SCC serviks uteri.

II. Cara

1. Sediaan preparat penderita yang didiagnosis sebagai CIN1, CIN2, CIN3 maupun SCC serviks uteri yang diperiksa secara histopatologi di Laboratorium Patologi Anatomi Swasta, Denpasar dari tanggal 1 Januari 2011 sampai 31 Desember 2012, dikumpulkan dan dilihat apakah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.
2. Preparat hasil pulasan Hematoksin dan Eosin sesuai nomor-nomor di atas dikumpulkan dan dievaluasi ulang. Hal yang dinilai adalah semua parameter patologik yaitu CIN1, CIN2, CIN3 dan SCC serviks uteri. Preparat yang sulit dievaluasi dilakukan potong ulang blok dan dipulas dengan pulasan rutin menggunakan Harris's Hematoksin dan Eosin dengan prosedur sebagai berikut sesuai dengan prosedur pulasan Hematoksin dan Eosin yang rutin dikerjakan di Bagian/SMF Patologi Anatomi FK UNUD/RSUP Sanglah, Denpasar:
 - a. Potong blok parafin menggunakan mikrotom Leica 2125 RM dengan ketebalan 4 μ m, kemudian ditempelkan pada gelas obyek merk Sail Brand dengan ukuran lebar 1 inchi, panjang 3 inchi dan tebal 1,2 mm.
 - b. Deparafinisasi dengan dicelupkan pada xilol sebanyak 4 kali masing-masing celupan selama 5 menit.
 - c. Hidrasi dengan alkohol bertingkat dengan konsentrasi menurun menggunakan alkohol 95%, alkohol 80%, alkohol 75% dan alkohol 50%, masing-masing celupan selama 2 menit.
 - d. Masukkan ke air selama 10 menit.
 - e. Celupkan ke cat utama yaitu Harris's Hematoksin selama 10 menit.
 - f. Cuci dengan air selama 10 menit.
 - g. Lihat di bawah mikroskop, inti sel akan terlihat biru sedangkan sitoplasma tidak berwarna.
 - h. Celupkan pada cat pembanding Eosin 1% selama 0,5-1 menit.
 - i. Dehidrasi dengan alkohol bertingkat dengan konsentrasi meningkat menggunakan alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 95% dan alkohol absolut, masing-masing celupan selama 2 menit.
 - j. Penjernihan dengan xilol sebanyak 4 kali celupan, lama masing-masing celupan selama 5 menit.
 - k. Tutup dengan *cover glass*.
3. Memilih preparat yang akan dipulas dengan P16INK4a dan HPV1. Preparat yang dipilih untuk pemeriksaan imunohistokimia P16INK4a dan HPV1 adalah preparat yang paling banyak mengandung bagian tumor dengan sedikit atau tidak ada area nekrosis maupun perdarahan.
4. Preparat yang dipilih kemudian dicari blok parafinnya.
5. Blok parafin dipotong setebal 4 dengan mikrotom untuk pulasan imunohistokimia.
6. Pulasan imunohistokimia untuk P16INK4a dengan menggunakan *monoclonal antibody* P16INK4a dari Abcan, dengan pengenceran 1:100, menggunakan metode ABC yang akan dikerjakan di Laboratorium Imunohistokimia FK UGM/RSUP Sardjito, Yogyakarta.

Prosedur Pulasan Imunohistokimia P16INK4a:

 - a. Potong blok parafin menggunakan mikrotom Leica 2125 RM dengan ketebalan 4 μ m, kemudian direkatkan pada gelas obyek yang telah dilapisi dengan *poly-L-lysine*, merk Sigma, dengan ukuran lebar 1 inchi, panjang 3 inchi dan tebal 1,2 mm.
 - b. Inkubasi dalam inkubator dengan suhu 37° C selama 1 malam.
 - c. Deparafinisasi dengan xilol, preparat dicelupkan ke dalam xilol sebanyak 3 kali, masing-masing celupan selama 3 menit.
 - d. Rehidrasi dengan alkohol bertingkat terdiri dari alkohol absolut 2 kali, alkohol 95%, alkohol 80%, dan alkohol 70%, masing-masing selama 3 menit.
 - e. Cuci dengan aquadest selama 10 menit.
 - f. Teteskan H₂O₂ dalam metanol 3% sampai menutupi seluruh permukaan jaringan selama 15 menit.
 - g. Cuci dengan aquadest selama 10 menit.
 - h. Cuci dengan PBS (*phosphate buffer saline*) sebanyak 2 kali, masing-masing selama 10 menit.
 - i. Rendam dengan buffer sitrat 0,01 M, pH 6,0, kemudian panaskan di dalam *oven microwave* selama 15 menit, mula-mula dengan pemanasan tinggi (80°C) sampai tepat mendidih kemudian dengan pemanasan sedang (50°C) selama 5 menit.
 - j. Dinginkan pada suhu kamar.
 - k. Cuci dengan PBS sebanyak 2 kali, masing-masing selama 10 menit.
 - l. Teteskan 100 μ l selama 10 menit.

- m. Teteskan 100 μ l *antibody* primer menggunakan *monoclonal antibody* P16INK4a dari Dako yang telah diencerkan (pengenceran 1:100) selama 30 menit pada suhu kamar atau semalam pada suhu 4°C.
 - n. Cuci dengan PBS sebanyak 2 kali, masing-masing selama 10 menit.
 - o. Teteskan *Biotinylated Anti Polyvalent* selama 10 menit.
 - p. Cuci dengan BS sebanyak 2 kali, masing-masing 10 menit.
 - q. Teteskan *Streptavidin Peroxidase* selama 10 menit.
 - r. Cuci dengan PBS sebanyak 2 kali, masing-masing selama 10 menit.
 - s. Teteskan dengan reagen DAB selama 10 menit.
 - t. Cuci dengan air mengalir.
 - u. *Counterstain* dengan Mayer Hematoksin selama 2 menit.
 - v. Cuci dengan air mengalir.
 - w. Dehidrasi dengan alkohol bertingkat terdiri dari alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 95%, dan alkohol absolut 2 kali, masing-masing selama 3 menit.
 - x. Celupkan ke dalam xilol sebanyak 3 kali, masing-masing selama 3 menit.
 - y. Tutup dengan *cover glass*. Pulasan imunohistokimia untuk HPV11 dengan menggunakan *prediluted antibody* HPV11 dari *Novocastra* menggunakan metode ABC yang akan dikerjakan di Laboratorium Imunohistokimia FK UGM/RSUP Sardjito, Yogyakarta. Prosedur Pulasan Imunohistokimia HPV11:
 - a. Potong blok parafin menggunakan mikrotom Leica 2125 RM dengan ketebalan 4 μ m, kemudian direkatkan pada gelas obyek yang telah dilapisi dengan *poly-L-lysine*, merk Sigma, dengan ukuran lebar 1 inchi, panjang 3 inchi dan tebal 1,2 mm.
 - b. Inkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 1 malam.
 - c. Deparafinisasi dengan xilol, preparat dicelupkan ke dalam xilol sebanyak 3 kali, masing-masing celupan selama 3 menit.
 - d. Rehidrasi dengan alkohol bertingkat terdiri dari alkohol absolut 2 kali, alkohol 95%, alkohol 80%, dan alkohol 70%, masing-masing selama 3 menit.
 - e. Cuci dengan aquadest selama 10 menit.
 - f. Teteskan H₂O₂ dalam methanol 3% sampai menutupi seluruh permukaan jaringan selama 15 menit.
 - g. Cuci dengan aquadest selama 10 menit.
 - h. Cuci dengan PBS sebanyak 2 kali, masing-masing selama 10 menit.
 - i. Rendam dengan buffer sitrat 0,01 M, pH 6,0. Kemudian panaskan di dalam *oven microwave* selama 15 menit, mulamula dengan pemanasan tinggi (80°C) sampai tepat mendidih kemudian dengan pemanasan sedang (50°C) selama 5 menit.
 - j. Dinginkan pada suhu kamar.
 - k. Cuci dengan PBS sebanyak 2 kali, masing-masing selama 10 menit.
 - l. Teteskan 100 μ l selama 10 menit.
 - m. Teteskan 100 μ l *antibody* primer menggunakan *prediluted antibody* HPV11 dari *Cytoactiv* selama 30 menit pada suhu kamar atau semalam pada suhu 4°C.
 - n. Cuci dengan PBS sebanyak 2 kali, masing-masing selama 10 menit.
 - o. Teteskan *Biotinylated Anti Polyvalent* selama 10 menit.
 - p. Cuci dengan BS sebanyak 2 kali, masing-masing 10 menit.
 - q. Teteskan *Streptavidin Peroxidase* selama 10 menit.
 - r. Cuci dengan PBS sebanyak 2 kali, masing-masing selama 10 menit.
 - s. Teteskan dengan reagen DAB selama 10 menit.
 - t. Cuci dengan air mengalir.
 - u. *Counterstain* dengan Mayer Hematoksin selama 2 menit.
 - v. Cuci dengan air mengalir.
 - w. Dehidrasi dengan alkohol bertingkat terdiri dari alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 95%, dan alkohol absolut 2 kali, masing-masing selama 3 menit.
 - x. Celupkan ke dalam xilol sebanyak 3 kali, masing-masing selama 3 menit.
 - y. Tutup dengan *cover glass*.
7. Pemeriksaan pulasan imunohistokimia P16INK4a dan HPV11 dilakukan oleh peneliti dan seorang ahli Patologi Anatomi (dokter spesialis Patologi Anatomi).
 8. Pencatatan dan pengumpulan data.
 9. Analisis data.

III. Interpretasi Pengecatan Imunohistokimia

a. P16INK4a

Reaksi dipertimbangkan positif ketika warna coklat terlihat pada nukleus dan sitoplasma yang diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya binokuler Olympus CX21 pada seluruh jaringan tumor. Dua parameter yang dipakai untuk mengevaluasi adalah persentase sel yang tercat positif dengan P16INK4a dan reaksi intensitasnya. Persentase sel-sel yang tercat positif dievaluasi pada area dengan ekspresi yang tertinggi dan di-*grading* sebagai berikut: *grade* 0: negatif, tidak ada

sel yang tercatat; *grade* 1: sel yang positif >0-10%; *grade* 2: sel yang positif >10-50%; *grade* 3: sel yang positif >50-80%; *grade* 4: sel yang positif >80%. Reaksi intensitasnya diskor sebagai berikut: 0: negatif; 1: lemah; 2: sedang; 3: kuat.¹ Kemudian skor imunohistokimia ekspresi P16INK4a dibuat dengan mengalikan *grading* dengan skor intensitas.

b. HPV1

Evaluasi pengecatan HPV1 dikatakan positif jika terlihat warna coklat pada inti. Parameter yang dipakai untuk mengevaluasi adalah jumlah inti sel pada seluruh jaringan tumor yang tercatat positif dengan HPV1 dengan pembesaran 400 kali, yang diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya binokuler Olympus CX21. *di-grading* sebagai berikut: *grade* 0: tidak ada sel sampai 1 sel tercatat, *grade* 1: 2-3 sel yang tercatat, *grade* 2 : 4-10 sel yang tercatat, *grade* 3: >10 sel yang tercatat.¹³

IV. Analisis Data

Perbedaan ekspresi P16INK4a pada CIN1, CIN2, CIN3 dan SCC serviks uteri akan diuji dengan analisis bivariant *one way anova*. Perbedaan ekspresi HPV1 pada CIN1, CIN2, CIN3 dan SCC serviks uteri akan diuji dengan analisis bivariant *one way anova*. Tingkat kemaknaan (α) pada $P < 0,05$. Presisi data ditentukan dengan nilai IK 95%.

DAFTAR PUSTAKA

- Izadi-Mood N, Asadi K, Shojaei H, Sarmadi S, Ahmadi SA, Sani S, dkk. Potential diagnostic value of p16INK4a expression in premalignant and malignant cervical lesion. *Journal of Research in Medical Science*. 2012;17(5):428-33.
- Susanti I. Registrasi kanker di Denpasar. Badan Registrasi Kanker Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Indonesia; 2006.
- Susanti I. Registrasi kanker di Denpasar. Badan Registrasi Kanker Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Indonesia; 2007.
- Susanti I. Registrasi kanker di Denpasar. Badan Registrasi Kanker Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Indonesia; 2008.
- Wells M, Ostor AG, Crum CP, Franceschi S, Tommasino M. Epithelial tumours. Dalam: Tavassoli FA, Devilee P, penyunting. WHO: Pathology and Genetics Tumours of the Breast and Female Genital Organ. France: IARC; 2003. h. 262-4.
- Paavonen J. Human papillomavirus infection and the development of cervical cancer and related genital neoplasia. *International Journal of Infectious Disease*. 2007;11(Suplement 2):53-9.
- Wu H, Shi H, Kong L. Full length research paper: Relationship of HPV1 and P16 expression with different cervical lesion. *Scientific Research and Essays*. 2011;6(17):3724-8.
- Balan R, Caruntu ID, Crauciuc E, Gherghita V, Toma O, Amalinei C. Immunocytochemical expression of human papillomavirus (HPV) high risk type L1 capsid proteins in LSIL and HSIL. *Secþiunea Geneticã i Biologie Molecularã*. 2009;10:97-102.
- Jedpiyawongse A, Homcha-em P, Karalak A, Srivatanakul P. Immunohistochemical overexpression of p16INK4a protein associated with cervical cancer in Thailand. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2008;9:625-30.
- Khan A, Singer A. Biomarkers in cervical precancer management: the new frontiers. *Future oncology*. 2008;4:515-25.
- Andersson S, Wangsa D, Flores-Staino C, Safari H, Mints M, Hjerpe A, dkk. Expression of p16INK4a in relation to histopatology and viral load of 'high risk' HPV types in cervical neoplastic lesions. *European Journal of Cancer*. 2006;42:2815-20.
- Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D, dkk. P16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol*. 2002;26(11):1389-99.
- Negri G, Bellisano G, Zannoni GF, Rivasi F, Kasal A, Vittadello F, dkk. Original article: P16INK4a and HPV1 immunohistochemistry is helpful for estimating the behavior of low-grade dysplastic lesions of the cervix uteri. *Am J Surg Pathol*. 2008;32(11):1715-20.