

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA P16^{INK4a} NO ADENOCARCINOMA DE ESÔFAGO

Protein p16^{INK4a} immunohistochemical expression in adenocarcinoma of the esophagus

Mário Henrique **OSANAI**, Maria Isabel Albano **EDELWEISS**, Luise **MEURER**, Maitê de Mello **VILWOCK**, Leandro Totti **CAVAZZOLA**, Guilherme **RIBEIRO**, Carlos Cauduro **SCHIRMER**, Richard Ricachenevsky **GURSKI**

Trabalho realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

DESCRITORES - Esôfago. Neoplasia de esôfago. Genes p16.

Correspondência:
Richard Gurski,
e-mail: rgurski@iad.com.br

Fonte de financiamento: não há
Conflito de interesses: não há

Recebido para publicação: 30/03/2011
Aceito para publicação: 16/06/2011

HEADINGS - Esophagus. Esophageal neoplasm. Genes, p16.

RESUMO - Introdução - O adenocarcinoma de esôfago apresenta aumento de frequência nas últimas décadas, particularmente em países desenvolvidos. O esôfago de Barrett é reconhecido como a principal lesão precursora e o estudo da sequência metaplasia-diplasia-adenocarcinoma mostra a ocorrência de alterações genéticas desde suas fases mais incipientes. As alterações no p16^{INK4a} são relatadas como frequentes no esôfago de Barrett e no carcinoma de esôfago. **Objetivo** - Verificar a prevalência da expressão imunoistoquímica da proteína p16^{INK4a} em exames anatomopatológicos de pacientes com adenocarcinoma de esôfago. **Método** - A população do estudo foi constituída de 37 pacientes com adenocarcinoma de esôfago. A expressão da proteína p16 foi detectada por meio de análise imunoistoquímica, com anticorpo primário p16^{INK4a}Ab-7, clone 16P07, NeoMarkers e avaliada de acordo com o Sistema de Escore de Imunorreatividade (Immunoreactive scoring system – IRS) modificado. **Resultados** - No grupo houve predominância de pacientes do sexo masculino (86,5%) e a maioria dos casos correspondia a estádios avançados (III e IV = 67,5%). Em 12 casos (32,4%) foi identificada expressão imunoistoquímica da proteína p16^{INK4a}. Não foi observada relação significativa entre a perda da expressão da proteína p16^{INK4a} e o grau de diferenciação histológica (p=0,81) nem com o estadiamento da doença (p=0,485). **Conclusão** - Ocorre perda da expressão imunoistoquímica da proteína p16^{INK4a}, corroborando as informações de que a inativação do gene p16 é um evento frequente e que pode exercer papel importante na carcinogênese do adenocarcinoma de esôfago.

ABSTRACT - Background - The esophageal adenocarcinoma shows an increasing frequency in the last decades, specially in the developed countries. The Barrett's esophagus is accepted as the major premalignant lesion and the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence presents a lot of genetic changes since its early events. The alterations in p16^{INK4a} are frequent in Barrett's esophagus and esophageal carcinoma. **Aim** - To verify the prevalence of the immunohistochemical expression of the p16^{INK4a} protein in patients with esophageal adenocarcinoma. **Methods** - The study population consisted of 37 patients with resected esophageal adenocarcinoma. The p16^{INK4a} protein expression was determined by immunohistochemistry using primary antibody p16^{INK4a}Ab-7, clone 16P07 NeoMarkers and assessed according to the Immunoreactive scoring system (IRS). **Results** - Of 37 analyzed patients, the most were male (86,5%) and the advanced disease was predominant (stages III and IV = 67,5%). In 12 (32,4%) the immunohistochemistry was positive for p16^{INK4a}. There was no significant relation between the protein expression and the degrees of histological differentiation of the biopsies and surgical specimens (p=0,81) neither with the staging (p=0,485). **Conclusion** - The lost of the immunohistochemical expression of the p16^{INK4a} protein in this study suggests that p16 is enroled in the carcinogenesis of the adenocarcinoma of esophagus.

INTRODUÇÃO

Vários estudos analisaram fatores de risco e o mecanismo de progressão das lesões metaplásicas para as displasias e, destas, para o adenocarcinoma^{14,15,22}. O risco de desenvolvimento de adenocarcinoma em pacientes com esôfago de Barrett (EB) é estimado em 1 caso para cada 56 a 250 pacientes-ano de seguimento¹⁰.

Alterações de genes específicos, relacionados a alguns tipos de tumores, evidenciam o importante papel destes genes como potenciais indicadores de prognóstico ou de resposta à terapêutica^{9,10}.

As alterações no gene p16^{INK4a} (p16) são objeto de estudo em diversos tumores como carcinomas epidermóides de cabeça, pescoço e esôfago, adenocarcinomas de pâncreas e tumores estromais gastrointestinais^{10,24,26,32}. Estudos em tumores de pâncreas e em tumores estromais gastrointestinais relatam pior prognóstico na vigência de alterações nesse gene^{10,24}.

Existem muitos estudos sobre as alterações no gene p16 em esôfago de Barrett e no carcinoma de esôfago, incluindo o adenocarcinoma, sendo a perda alélica do p16 considerada a alteração gênica inicial na progressão da metaplasia de Barrett e a hipermetilação, uma das formas mais frequentes de inativação do gene^{4,16,28}. No entanto, são poucas as publicações específicas sobre a repercussão dessas alterações genéticas e epigenéticas na expressão da proteína p16 em adenocarcinomas de esôfago⁴.

Assim, este estudo tem por objetivo verificar a prevalência da expressão imunoistoquímica da proteína p16^{INK4a} em exames anatomopatológicos de pacientes com adenocarcinoma de esôfago

MÉTODO

O presente estudo foi submetido à análise do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre para avaliação quanto às normas regulamentares e diretrizes éticas, com aprovação para execução, sob protocolo número 03-183.

A população estudada foi obtida pela revisão dos prontuários dos pacientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil com adenocarcinoma de esôfago.

O critério de inclusão foi: pacientes com diagnóstico anatomopatológico de adenocarcinoma de esôfago. Os de exclusão foram: história ou presença de outra neoplasia maligna concomitante; tratamento neoadjuvante (quimioterapia ou radioterapia); ausência de blocos de parafina para a confecção de lâminas para o estudo.

As variáveis estudadas foram: idade, sexo, estadiamento, grau de diferenciação histológica, procedimento cirúrgico realizado, intensidade da expressão da proteína p16^{INK4a}, percentual de núcleos corados para a p16^{INK4a}.

Cortes representativos do tumor para estudo imunoistoquímico foram oriundos de blocos de parafina com material de biópsia ou peça cirúrgica com a padronização técnica utilizada na rotina do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Ela consistiu em desparafinização e reidratação, recuperação antigênica, inativação da peroxidase endógena e bloqueio das reações inespecíficas. O anticorpo primário, p16^{INK4a} clone 16P07 NeoMarkers foi incubado por 12 horas a 4°C na diluição de 1:75, seguido da aplicação do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB, Dako) e revelação com diaminobenzidina tetraidroclorido (Kit DAB, Dako). A reação apresentou como controle positivo a neoplasia intraepitelial cervical positiva para p16, sendo o controle negativo realizado sem a utilização do anticorpo primário.

A avaliação da p16^{INK4a} (p16) foi realizada de acordo com o Sistema de Escore de Imunoreatividade (Immunoreactive Scoring System – IRS)²¹ modificado, sendo considerada como positiva apenas a coloração nuclear.

Dois padrões de coloração foram utilizados: positivo: quando pelo menos 10% dos núcleos foram positivos, em padrão focal ou difuso pelo tecido, e negativo, quando nenhuma ou poucas células (<10%) mostraram coloração nuclear.

A intensidade da coloração foi classificada graduando-se de 0 a 3, onde: 0 é negativa, 1 é fraca, 2 é moderada e 3 é forte.

O escore final da expressão da p16 foi obtido multiplicando-se as duas pontuações.

A leitura das lâminas foi realizada por dois patologistas, de forma independente e sem o conhecimento dos dados clinicopatológicos. O resultado final foi obtido por revisões de consenso discutidas entre os dois patologistas.

Na Figura 1 podem ser observados exemplos de colorações nas várias intensidades para melhor ilustrar o método.

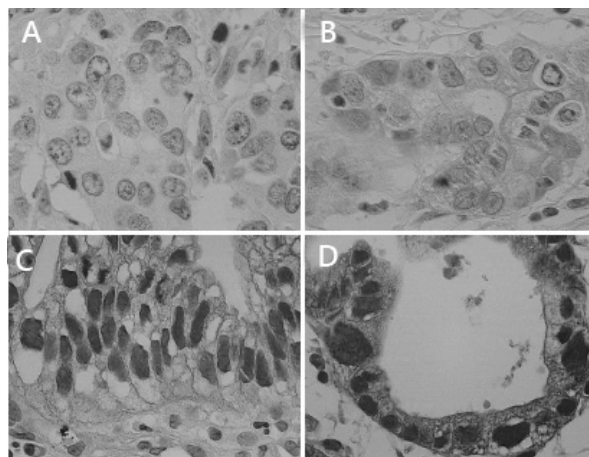


FIGURA 1 - A) Expressão imunoistoquímica negativa da p16 (400X); B) expressão imunoistoquímica fraca da p16 (400X); C) expressão imunoistoquímica moderada da p16 (400X); D) expressão imunoistoquímica forte da p16 (400X)

Na análise estatística, os dados quantitativos foram descritos por média e desvio-padrão, e os categóricos por frequência (número absoluto) e percentual. As observações realizadas pelos dois patologistas responsáveis pela avaliação da intensidade da coloração e expressão da p16 tiveram sua concordância estimada por medida de concordância Kappa. A distribuição da p16 entre os grupos de diferenciação histológica e entre os estádios da doença foi comparada pelo método do Qui-quadrado. Os dados foram processados e analisados com auxílio do programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 13.0.

RESULTADOS

Foram revisados 63 prontuários de pacientes que preenchiam os critérios de inclusão. Desses, foram incluídos no estudo apenas aqueles que apresentavam blocos de parafina com biópsias ou peças cirúrgicas compatíveis para estudo, formando uma população de 37 pacientes.

A média de idade foi de 61,9 anos (desvio padrão ± 8,6 anos). Trinta e dois pacientes eram do sexo masculino (86,5%), com média de idade de 61,2 anos (desvio-padrão ± 1,6 anos) e cinco eram do sexo feminino (13,5%), com média de idade de 66 anos (desvio-padrão ± 1,1 anos) (Figura 2).

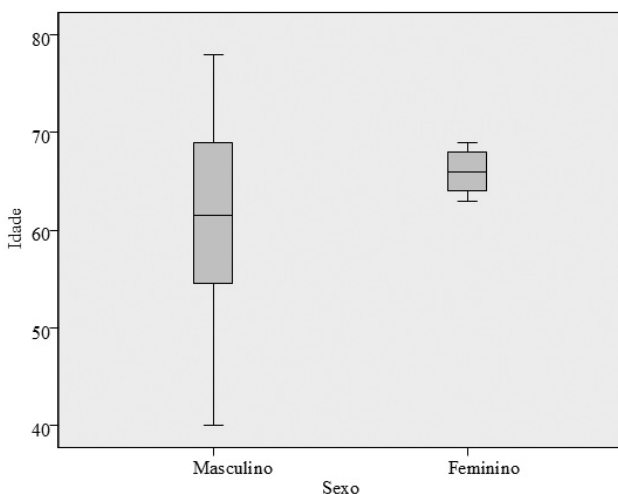


FIGURA 2 - Distribuição segundo o sexo e idade dos pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de esôfago em um período de cinco anos (n=37)

A maior parte dos pacientes (67,5%) apresentava doença em estádios III e IV. Em quatro casos (10,8%) não foi localizada anotação referente ao estadiamento.

Os procedimentos cirúrgicos com intenção curativa (gastrectomia total e esofagogastrectomia transiatal) foram realizados em 54% dos casos. Os demais foram submetidos à operação paliativa ou não receberam tratamento cirúrgico.

Quanto ao grau de diferenciação do tumor, cinco casos eram de tumores bem diferenciados (13,5%), vinte e um moderadamente diferenciados (56,8%) e dez casos referiam-se a tumores indiferenciados (27%).

Na análise imunoistoquímica da p16, houve boa concordância entre os observadores em relação à avaliação do percentual de núcleos corados (Kappa=0,628).

Em relação à avaliação da intensidade da expressão da p16 nos núcleos, a concordância foi razoável (Kappa=0,392).

Nos casos em que houve discordância entre os observadores, as lâminas foram revisadas pelos dois patologistas até que consenso fosse estabelecido. Para as análises finais, somente os resultados consensuais foram considerados.

A expressão imunoistoquímica da p16 foi observada em apenas 32,4% dos casos analisados. Em seis (16,2%) houve expressão forte (escore 3); em três (8,1%) ela foi moderada e em outros três (8,1%) fraca. Em vinte e cinco casos (67,6%) houve perda da expressão.

Em relação ao sexo, houve expressão da proteína em dez dos 32 homens (31,2%) e em duas de cinco mulheres (40%) (p=ns). Quanto ao estadiamento, a distribuição da expressão da proteína foi de 50% no estágio I (expressão em dois entre quatro pacientes), 50% no estágio II (expressão em dois entre quatro pacientes), 23% no estágio III (expressão em três entre 13 pacientes) e 41,7% no estágio IV (expressão em cinco entre 12 pacientes). Não houve expressão da proteína nos quatro pacientes sem informação de estadiamento. A análise estatística não mostrou relação significativa entre o estadiamento e a expressão da proteína (p=0,485)

A distribuição da expressão da proteína p16 entre as diferentes abordagens cirúrgicas foi a seguinte: no grupo submetido a gastrectomia total, houve expressão em três de 11 pacientes (27,3%); no grupo submetido a operação paliativa, a expressão foi identificada em quatro de 11 pacientes (36,4%); dos submetidos à ressecção transiatal, quatro dos nove pacientes (44,4%) expressaram a proteína e no grupo dos pacientes submetidos apenas à biópsia, houve expressão da proteína em um de seis pacientes (16,7%) (p=ns).

Também não foi observada relação estatisticamente significativa entre a expressão imunoistoquímica da p16 e o grau de diferenciação histológica do tumor, quando analisada em relação ao escore de imunorreatividade (p=0,81).

DISCUSSÃO

Os critérios para a inclusão e exclusão dos casos no presente estudo foram rigorosamente analisados, visando preservar a representatividade da casuística e a compatibilidade das amostras com

a técnica utilizada. Isso permitiu, por exemplo, a inclusão do material obtido em biópsias, além das peças operatórias de ressecções realizadas. A maior parte dos casos de adenocarcinoma de esôfago foram diagnosticados em estádios avançados, sem indicação de ressecção do órgão.

Foram excluídos os casos submetidos a tratamento neoadjuvante ou com história ou presença de outra neoplasia maligna concomitante, pois essas situações poderiam modificar a expressão da proteína e o estado do gene p16^{16,20}.

Diversos estudos mostram que a análise da expressão imunoistoquímica da proteína p16 apresenta boa correlação com os demais métodos de análise das alterações do gene p16, como o sequenciamento molecular e a amplificação da reação em cadeia da polimerase (PCR)^{2,3,4,9,18,19,25,31}. Essa fundamentação científica justificou a utilização de método de menor custo com análise adequada para o objetivo proposto.

A avaliação da expressão da p16 através da imunoistoquímica mostrou concordância de boa a razoável entre os observadores, quanto aos critérios de positividade (coloração nuclear) e quanto aos de intensidade da expressão. Essa concordância pode ser consequência da participação ativa dos patologistas nos diversos estudos já realizados com a casuística do Hospital de Clínicas³.

Foi localizado um único trabalho publicado com descrição clara da metodologia utilizada na análise imunoistoquímica da p16 no adenocarcinoma de esôfago⁴. No estudo referido, foram considerados negativos os casos em que menos de 10% das células mostravam coloração nuclear. O presente estudo utilizou o mesmo critério, mas acrescentou a análise da intensidade da expressão, através do escore de imunorreatividade modificado.

Alterações no gene p16 foram estudadas em diversas lesões pré-malignas^{7,20,28,29} e inúmeros tumores^{16,23}, como os de cólon e reto²⁵, pâncreas¹⁰, colo uterino¹⁹, glândulas salivares¹⁸, cabeça e pescoço^{9,32}, mesoteliomas¹², osteossarcomas¹⁷, gliomas¹³, bexiga¹, tumores estromais gastrointestinais²⁴, ovário⁵, pulmão^{2,3,19}, estômago⁸ e esôfago^{4,7,13,26,27,29,31}.

Inúmeras alterações já foram descritas no gene p16, sendo as mais frequentes a hipermetilação e as deleções^{2,3,4,7,8,9,12,13,18,19,25,29,31}. Essas alterações são, com frequência, associadas à perda da expressão imunoistoquímica da proteína p16^{2,3,9,13,18,19,25}.

Os processos moleculares que acompanham a progressão do esôfago de Barrett para o adenocarcinoma motivaram diversos estudos, consagrando-o como a principal lesão precursora do adenocarcinoma de esôfago^{4,7,28,29}. Dentre as causas do EB, merece destaque o refluxo gastroesofágico, doença com prevalência em ascensão⁶. Gurski et al.¹¹, em 2003, mostraram que a operação antirefluxo proporcionou reversão de lesões metaplásicas e displásicas de esôfago de Barrett para formas mais

benignas em um número significativo de pacientes.

As alterações do p16 na sequência metaplasia-displasia-adenocarcinoma mostraram, em alguns estudos^{4,7,29}, correlação entre o grau de alteração histológica e a prevalência da expressão imunoistoquímica da proteína p16. Neste estudo não foi observada relação significativa (p=0,81), mas pareceu haver tendência de perda da intensidade da expressão com a perda da diferenciação histológica. É possível que casuística maior possa confirmar essa relação no adenocarcinoma de esôfago.

Outra observação que merece registro foi a tendência de diminuição proporcional do escore de imunorreatividade nos estádios I, II e III (progressão local e regional). Nos casos em estágio IV (metástases à distância) não houve essa proporcionalidade, sugerindo que outros processos genéticos possam desempenhar papel mais importante no processo de metastatização, como os envolvidos na adesividade celular e angiogênese, por exemplo. Estudos com maior número de casos e incluindo a análise de outros genes podem evidenciar a relação entre o estadiamento e os processos genéticos envolvidos.

Papadimitrakopoulou et al.²⁰, em 2001, estudou a expressão da p16 em lesões pré-malignas do trato aerodigestivo superior, submetidas à quimioprofilaxia e não encontrou correlação significativa da perda da expressão com a progressão histológica para câncer. No entanto, não foram localizadas publicações avaliando essa resposta no esôfago de Barrett, quando tratado. Estudos incluindo casos de EB tratados podem esclarecer como se comporta a expressão da proteína p16, incluindo os diversos graus de resposta.

No adenocarcinoma de esôfago, os poucos estudos localizados e que avaliaram o p16 mostraram alta prevalência de alterações nesse gene (41% de alterações genéticas)⁷ e perda significativa da expressão da proteína p16 (perda da expressão em 86% dos casos)⁴. Neste estudo encontrou-se perda da expressão imunoistoquímica da p16 em 67,6% dos casos e expressão fraca em 8,1%. Apenas 24,3% dos casos mostrou expressão moderada a forte.

CONCLUSÃO

Houve baixa prevalência (32,4%) da expressão imunoistoquímica da proteína p16 nos casos analisados, corroborando o conhecimento já existente sobre as frequentes alterações do gene p16 no adenocarcinoma esofágico.

REFERÊNCIAS

1. Asamoto M, Iwahori Y, Okamura T, Shirai T, Tsuda H. Decreased expression of the p16/MTS1 gene without mutation is frequent in human urinary bladder carcinomas. *Jpn J Clin Oncol* 1997 Feb;27(1):22-5.

2. Awaya H, Takeshima Y, Amatya VJ, Furonaka O, Tagawa K, Kohno N. Inactivation of the p16 gene by hypermethylation and loss of heterozygosity in adenocarcinoma of the lung. *Pathol Int* 2004 Jul;54(7):486-9.
3. Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, Michels R, Saccomanno G, Gabrielson E. Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 29;95(20):11891-6.
4. Bian YS, Osterheld MC, Fontollet C, Bosman FT, Benhattar J. p16 inactivation by methylation of the CDKN2A promoter occurs early during neoplastic progression in Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2002 Apr;122(4):1113-21.
5. Brown I, Milner BJ, Rooney PH, Haites NE. Inactivation of the p16INK4A gene by methylation is not a frequent event in sporadic ovarian carcinoma. *Oncol Rep* 2001 Nov;8(6):1359-62.
6. Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni JF, Jr. Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer* 1998 Nov 15;83(10):2049-53.
7. Eads CA, Lord RV, Wickramasinghe K, Long TI, Kurumboor SK, Bernstein L. Epigenetic patterns in the progression of esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res* 2001 Apr 15;61(8):3410-8.
8. Ficorella C, Cannita K, Ricevuto E, Toniato E, Fusco C, Sinopoli NT. P16 hypermethylation contributes to the characterization of gene inactivation profiles in primary gastric cancer. *Oncol Rep* 2003 Jan;10(1):169-73.
9. Geisler SA, Olshan AF, Weissler MC, Cai J, Funkhouser WK, Smith J. p16 and p53 Protein expression as prognostic indicators of survival and disease recurrence from head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2002 Nov;8(11):3445-53.
10. Gerdes B, Ramaswamy A, Ziegler A, Lang SA, Kersting M, Baumann R. p16INK4a is a prognostic marker in resected ductal pancreatic cancer: an analysis of p16INK4a, p53, MDM2, an Rb. *Ann Surg* 2002 Jan;235(1):51-9.
11. Gurski RR, Peters JH, Hagen JA, DeMeester SR, Bremner CG, Chandrasoma PT. Barrett's esophagus can and does regress after antireflux surgery: a study of prevalence and predictive features. *J Am Coll Surg* 2003 May;196(5):706-12.
12. Hirao T, Bueno R, Chen CJ, Gordon GJ, Heilig E, Kelsey KT. Alterations of the p16(INK4) locus in human malignant mesothelial tumors. *Carcinogenesis* 2002 Jul;23(7):1127-30.
13. Ishii N, Maier D, Merlo A, Tada M, Sawamura Y, Diserens AC. Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathol* 1999 Jul;9(3):469-79.
14. Jacob CE, Bresciani C, Gama-Rodrigues JJ, Yagi OK, Mucerino D, Zilberstein B, Ceconello I. Behavior of gastric cancer in brazilian population. *ABCD Arq Bras Cir Dig* 2009;22(1):29-3
15. Jankowski JA, Perry I, Harrison RF. Gastro-oesophageal cancer: death at the junction. *BMJ* 2000 Aug 19;321(7259):463-4.
16. Kubo A, Nakagawa K, Varma RK, Conrad NK, Cheng JQ, Lee WC. The p16 status of tumor cell lines identifies small molecule inhibitors specific for cyclin-dependent kinase 4. *Clin Cancer Res* 1999 Dec;5(12):4279-86.
17. Nielsen GP, Burns KL, Rosenberg AE, Louis DN. CDKN2A gene deletions and loss of p16 expression occur in osteosarcomas that lack RB alterations. *Am J Pathol* 1998 Jul;153(1):159-63.
18. Nishimine M, Nakamura M, Kishi M, Okamoto M, Shimada K, Ishida E. Alterations of p14ARF and p16INK4a genes in salivary gland carcinomas. *Oncol Rep* 2003 May;10(3):555-60.
19. Nuovo GJ, Plaia TW, Belinsky SA, Baylin SB, Herman JG. In situ detection of the hypermethylation-induced inactivation of the p16 gene as an early event in oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Oct 26;96(22):12754-9.
20. Papadimitrakopoulou VA, Izzo J, Mao L, Keck J, Hamilton D, Shin DM. Cyclin D1 and p16 alterations in advanced premalignant lesions of the upper aerodigestive tract: role in response to chemoprevention and cancer development. *Clin Cancer Res* 2001 Oct;7(10):3127-34.
21. Remmele W, Schicketanz KH. Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptor content in human breast cancer. Computer-assisted image analysis (QIC score) vs. subjective grading (IRS). *Pathol Res Pract* 1993 Sep;189(8):862-6.
22. Rudolph RE, Vaughan TL, Storer B. Segment Length and Risk for Neoplastic Progression in Patients with Barrett Esophagus. *Ann Intern Med* 2000 Nov 7;133(9):748.
23. Sasaki S, Kitagawa Y, Sekido Y, Minna JD, Kuwano H, Yokota J. Molecular processes of chromosome 9p21 deletions in human cancers. *Oncogene* 2003 Jun 12;22(24):3792-8.
24. Schneider-Stock R, Boltze C, Lasota J, Miettinen M, Peters B, Pross M. High prognostic value of p16INK4 alterations in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 2003 May 1;21(9):1688-97.
25. Schneider-Stock R, Boltze C, Peters B, Hopfner T, Meyer F, Lippert H. Differences in loss of p16INK4 protein expression by promoter methylation between left- and right-sided primary colorectal carcinomas. *Int J Oncol* 2003 Oct;23(4):1009-13.
26. Sturm I, Petrowsky H, Volz R, Lorenz M, Radetzki S, Hillebrand T. Analysis of p53/BAX/p16(ink4a/CDKN2) in esophageal squamous cell carcinoma: high BAX and p16(ink4a/CDKN2) identifies patients with good prognosis. *J Clin Oncol* 2001 Apr 15;19(8):2272-81.
27. Tokugawa T, Sugihara H, Tani T, Hattori T. Modes of silencing of p16 in development of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2002 Sep 1;62(17):4938-44.
28. Wijnhoven BP, Tilanus HW, Dinjens WN. Molecular biology of Barrett's adenocarcinoma. *Ann Surg* 2001 Mar;233(3):322-37.
29. Wong DJ, Paulson TG, Prevo LJ, Galipeau PC, Longton G, Blount PL. p16(INK4a) lesions are common, early abnormalities that undergo clonal expansion in Barrett's metaplastic epithelium. *Cancer Res* 2001 Nov 15;61(22):8284-9.
30. Xing EP, Nie Y, Song Y, Yang GY, Cai YC, Wang LD. Mechanisms of inactivation of p14ARF, p15INK4b, and p16INK4a genes in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999 Oct;5(10):2704-13.
31. Xing EP, Nie Y, Wang LD, Yang GY, Yang CS. Aberrant methylation of p16INK4a and deletion of p15INK4b are frequent events in human esophageal cancer in Linxian, China. *Carcinogenesis* 1999 Jan;20(1):77-84.
32. Yuen PW, Man M, Lam KY, Kwong YL. Clinicopathological significance of p16 gene expression in the surgical treatment of head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Pathol* 2002 Jan;55(1):58-60.