

INMUNOHISTOQUIMICA DE LA PROTEINA p16INK4a EN BIOPSIAS Y EXTENDIDOS CERVICOVAGINALES Y SU RELACION CON HPV POR PCR

ALEJANDRO GARCÍA^{1,3}, NORA FALCOFF¹, NORMA DI CAMILLO¹, BEATRIZ SARTOR¹,
MARIA CATANESE², VALERIA DENNINGHOFF³

¹Servicio de Patología y ²Servicio de Ginecología, Hospital Municipal Bernardo Houssay, Vicente López, ³Servicio de Patología del Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas Norberto Quirno (CEMIC), Buenos Aires

Resumen Estudios recientes sugieren que la sobreexpresión de p16, determinada por inmunohistoquímica, sería un marcador específico de células escamosas displásicas y neoplásicas con alta asociación con HPV de alto riesgo. Nuestro objetivo fue correlacionar los hallazgos cito/histológicos con la expresión de p16 y el subtipo de HPV por PCR. Seleccionamos 95 biopsias de cuello uterino y 4 legrados endocervicales de 99 individuos, y 30 extendidos cervicovaginales de otros 30 individuos, que se dividieron según el diagnóstico morfológico. Inmunomarcamos cortes del material incluido en parafina y los extendidos con el *kit* CINtec™ p16INK4a (DAKO). Evaluamos HPV por PCR utilizando 25/99 biopsias con lesión intraepitelial escamosa de bajo grado. Observamos marcación positiva para p16 en 1/35 biopsias (2.9%) y 1/11 extendidos (9%) en los grupos sin HPV ni displasia; 16/25 biopsias (64%) y 6/10 extendidos (60%) en aquellos con lesión de bajo grado y 38/39 biopsias (97.4%) y 8/9 extendidos (89%) en los grupos con lesión de alto grado y carcinoma escamoso. Todas las muestras con HPV-6/11 fueron negativas o positivas focales para p16, en tanto que aquellas con HPV-18 u otros subtipos fueron mayoritariamente positivas de tipo difuso. Concluimos que la expresión de p16 presenta alta correlación con el diagnóstico cito/histológico y alta asociación entre la marcación difusa y la presencia de HPV de alto riesgo, aportando mayor objetividad en casos dudosos y ayudando a seleccionar grupos de individuos con riesgo de progresión de enfermedad, con un costo aceptable para estudiar grandes grupos.

Palabras clave: p16, cuello uterino, HPV, PCR

Abstract *Immunohistochemistry of p16INK4a in biopsies and cervicovaginal smears, and its correlation with HPV detected by PCR.* Recent studies suggest that p16 overexpression determined by immunohistochemistry would be a specific marker for neoplastic and dysplastic squamous cells associated with high-risk HPV. The purpose of this study was to assess the correlation between cyto-histological findings, p16 expression and HPV subtype. A total of 99 biopsies were selected, 4 endocervical curettages and 95 uterine cervix biopsies, as well as 30 cervicovaginal smears from other 30 patients. The samples were divided according to the morphological diagnosis. Paraffin-embedded sections and cervicovaginal smears were immunostained using the CINtec™ p16INK4a Cytology Kit (DAKO). HPV was analyzed by PCR in 25 of the 99 biopsies with low-grade squamous intraepithelial lesion. Among those patients with neither HPV nor dysplasia, 1 of 35 (2.9%) biopsies and 1 of 11 (9%) smears were positive for p16. Sixteen of 25 (64%) biopsies and 6 of 10 (60%) smears of the low-grade lesion cases, and 38 of 39 (97.4%) biopsies and 8 of 9 (89%) smears of the high-grade lesion and squamous carcinoma were positive for p16. All cases of HPV-6/11 were negative or focally positive for p16. Most cases of HPV-18 or other subtypes were diffusely positive. Our results indicate that p16 expression is highly correlated with cyto-histological diagnosis, and is associated with diffuse staining and high-risk HPV. This technique provides greater objectivity in doubtful cases, and helps select patients at risk of disease progression at an acceptable cost when used in large populations.

Key words: p16, uterine cervix, HPV, PCR

Entre las proteínas que controlan la progresión del ciclo celular se encuentra el inhibidor de la quinasa dependiente de la ciclina p16INK4a (p16) que desempeña

un papel fundamental en el control mediado por la proteína del retinoblastoma de la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular¹. El gen p16 es un supresor tumoral que mapea en el cromosoma 9q21 y se ha encontrado funcionalmente inactivado en muchas entidades tumorales, por mutación o hipermetilación del promotor, y se ha observado una fuerte sobreexpresión nuclear y citoplasmática de la proteína p16 en ciertas entidades cancerosas, entre ellas, en el carcinoma

Recibido: 28-III-2008

Aceptado: 26-VIII-2008

Dirección postal: Dr. Alejandro García, Servicio de Patología, CEMIC, Galván 4102, 1431 Buenos Aires, Argentina
Fax: (54-11) 4546-8264 e-mail: garciaa@patologia.org.ar

cervicouterino^{2, 3}. El carcinoma de células escamosas (CCE) del cuello uterino es uno de los tumores malignos más frecuentes, cuya incidencia ha ido disminuyendo en las últimas décadas (por lo menos en algunas comunidades) gracias a los programas de *screening* con el estudio de extendidos cervicovaginales (Papanicolaou)⁴.

El virus del papiloma humano (HPV) es una familia de virus de ADN que ha sido relacionada con varias enfermedades del cuello uterino que van desde el condiloma acuminado hasta el CCE infiltrante. Se han caracterizado más de 100 subtipos del virus, de los cuales aproximadamente 30 pueden infectar el epitelio cervical con riesgo variable de producir enfermedad tumoral progresiva⁵. Los tipos 6 y 11 del HPV se asocian a lesiones con bajo riesgo de progresión, en tanto que el tipo 16 es el más frecuentemente asociado a lesión intraepitelial escamosa de alto grado (CIN 3/CIS) y CCE infiltrante⁵. Este virus puede detectarse en biopsias y muestras citológicas de cuello uterino a través de las alteraciones morfológicas que provoca en las células escamosas (principalmente coilocitosis) y del tipo de lesión asociada a su presencia (condiloma, displasia, carcinoma). Existen diversas técnicas para la detección y tipificación del HPV, como la hibridación *in situ*, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y la captura de híbridos, pero su utilización en grandes campañas de *screening* suele no ser económicamente viable en los países en vías de desarrollo⁶.

Estudios recientes sugieren que la sobreexpresión de la p16, determinada por inmunohistoquímica (IHQ), sería un marcador específico de células escamosas displásicas y neoplásicas; tanto en material tisular incluido en parafina como en preparados citológicos^{2, 4, 7-13}. Otros trabajos han encontrado una alta asociación entre la sobreexpresión de la p16 y la presencia de HPV de alto riesgo (HPV-AR)^{7, 14, 15}.

Es conocido que existe una variable reproducibilidad inter-observador en el diagnóstico, tanto histológico como citológico, de las lesiones intraepiteliales escamosas (LIE) del cuello uterino. Por eso muchos investigadores han buscado un marcador con alta especificidad y sensibilidad para lograr más objetividad en el diagnóstico de estas lesiones¹⁶.

Basándonos en lo antedicho, el objetivo del presente estudio es evaluar en nuestro medio la correlación entre el diagnóstico histopatológico y citológico de diversas lesiones escamosas del cuello uterino, y la determinación por IHQ de la p16; y la correlación de esta inmunomarcación con la detección del HPV con técnicas de PCR, en un grupo seleccionado de casos.

Materiales y métodos

Del archivo del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Municipal Prof. Dr. B. Houssay se seleccionaron 99 muestras

correspondientes a individuos de sexo femenino, con un rango de edad que osciló entre 19 y 75 años (mediana 38.5). Las muestras correspondieron a 95 biopsias de cuello uterino y 4 legrados endocervicales. Todo el material fue fijado en formol al 4%, procesado rutinariamente e incluido en parafina. Posteriormente se realizaron cortes de 4 micrones que se colorearon con hematoxilina y eosina. De acuerdo a los diagnósticos histológicos se confeccionaron 5 grupos, a saber: grupo 1 (epitelio anómalo no displásico): 15 casos, grupo 2 (inflamatorio): 20 casos, grupo 3 (lesión escamosa intraepitelial de bajo grado [LIE-B]): 25 casos, grupo 4 (lesión escamosa intraepitelial de alto grado [LIE-A]): 24 casos, y grupo 5 (carcinoma de células escamosas [CCE]): 15 casos.

Con el material incluido en parafina se realizaron nuevos cortes de 4 micrones que fueron procesados con el *kit* CINtec™ p16INK4a (DAKO, Carpintería, CA, 93013, EE.UU.) para la demostración por IHQ de la proteína p16. Se realizó recuperación antigénica con *buffer* citrato en horno de microondas y se utilizó el anticuerpo monoclonal E6H4 para el reconocimiento de la proteína p16, con un reactivo de visualización consistente en un polímero de dextrano conjugado con peroxidasa e inmunoglobulinas caprinas anti-ratón y diamino-benzidina (DAB) como cromógeno.

Los preparados obtenidos fueron evaluados independientemente por 2 patólogos con experiencia en IHQ, teniendo en consideración la presencia y el tipo de marcación positiva, sin conocimiento del diagnóstico histopatológico previo. Para evaluar la reproducibilidad inter-observador se compararon los resultados de ambos observadores, pero para el resto del estudio se unificaron los resultados llegando a un consenso en los casos con discrepancias. A los resultados se les otorgó un valor numérico para facilitar su análisis, a saber: 0: Negativo, 1: Marcación positiva nuclear y/o citoplasmática en el tercio basal del epitelio, 2: Marcación positiva nuclear y/o citoplasmática en los dos tercios basales del epitelio, y 3: Marcación positiva nuclear y/o citoplasmática en todo el espesor del epitelio.

También se analizaron los resultados expresando los casos positivos de manera bimodal como: focal (marcación de tipo 1), y difuso (marcaciones de tipo 2 y 3).

A continuación se correlacionaron los resultados de ambas metodologías mediante el estudio estadístico con el test exacto de Fisher.

Para evaluar la reproducibilidad inter-observador definimos 3 categorías: Concordancia completa: cuando existe acuerdo total entre los observadores tanto en el resultado negativo o positivo, como en el tipo de marcación (1, 2 o 3), Concordancia parcial: cuando hay coincidencia en el resultado negativo o positivo de la marcación, pero discordancia en el tipo de la misma (1, 2 o 3), y Discordancia: cuando no hay coincidencia sobre el resultado negativo o positivo de la marcación o sobre el tipo de marcación en la forma bimodal (focal o difusa).

Para conocer la relación entre la sobreexpresión de p16 y la presencia y subtipo de HPV, se estudiaron con la técnica de PCR las 25 biopsias con diagnóstico de LIE-B, porque fueron aquellas que mostraron mayor variabilidad en la detección de p16 por IHQ. Se purificó ADN a partir de las 25 muestras del material incluido en parafina con el método PK-fenol-cloroformo. La reacción de PCR fue realizada con *primers* para una secuencia consenso común, según bibliografía, a la mayoría de los HPV y para los subtipos más comunes de alto riesgo (16, 18 y 31) y bajo riesgo (6 y 11)¹⁷. Las PCR fueron evaluadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 9% y visualizadas con bromuro de etidio bajo luz UV.

Posteriormente se realizó de manera prospectiva la determinación de la p16 por IHQ en preparados citológicos cervicovaginales convencionales; dicha determinación ha sido

descrita en varios trabajos recientes, pero en la mayoría de los casos este estudio se realizó en especímenes citológicos con base líquida, siendo escasos los estudios realizados en extendidos cervicovaginales convencionales (Pap)^{9, 14, 18-24}. En la Sección de Patología Cervical del Servicio de Ginecología del Hospital Municipal Prof. Dr. B. Houssay se obtuvieron muestras seleccionadas aleatoriamente de las mujeres atendidas en la consulta habitual. De cada individuo se realizaron 2 extendidos citológicos, uno para el estudio de rutina que se coloreó con técnica de Papanicolaou y sobre el cual se hizo el estudio citomorfológico convencional. El otro extendido se reservó fijado en alcohol 96° para realizar la inmunomarcación para p16.

Una vez emitido el diagnóstico de rutina se seleccionaron grupos semejantes a los del estudio retrospectivo sobre biopsias, poniendo particular atención en las lesiones de dudosa interpretación (ASCUS), a saber: Reactivo/inflamatorio: 2 casos, ASCUS-Inflamatorio (ASCUS-I): 9 casos, ASCUS-LIE-B: 7 casos, LIE-B: 3 casos, LIE-A: 4 casos, y CCE: 5 casos.

Estos diagnósticos citológicos fueron ratificados en diagnóstico posterior mediante biopsia. Los extendidos citológicos reservados de los casos seleccionados se inmunomarcaron con el mismo *kit* usado para las muestras histológicas (CINtec™ p16INK4a, DAKO). Los preparados fueron evaluados por 3 observadores arribando a un diagnóstico por unanimidad o por consenso en los casos con discrepancia.

Resultados

Inmunomarcación en biopsias. Los resultados de la inmunomarcación en biopsias se expresan en la Tabla 1. En la Fig. 1 se observa marcación positiva para p16 en los 2/3 basales del epitelio en una LIE-A (patrón difuso). Correlacionando los resultados de los grupos de diagnóstico histológico y los resultados de la IHQ observamos marcación positiva en sólo 2.9% de los casos en los grupos 1 y 2 sumados, en 95.8% de los casos del grupo 4 (83% con marcación difusa, tipo 2 y 3) y en 100% de los casos del grupo 5 (todos de tipo 3). Si comparamos la expresión de p16 en los grupos sin displasia ni neoplasia (grupos 1 y 2) con aquellos que tienen LIE-A y CCE, aplicando el *test* exacto de Fisher encontramos que la dife-

TABLA 1.- Resultados de inmunohistoquímica para la proteína p16 en los distintos grupos diagnósticos

Grupo	0	1	2	3	Total de casos
1	15	0	0	0	15
2	19	0	1	0	20
3	9	5	7	4	25
4	1	3	7	13	24
5	0	0	0	15	15

Las filas corresponden a los grupos por diagnóstico histológico y las columnas a los grupos de la inmunomarcación.

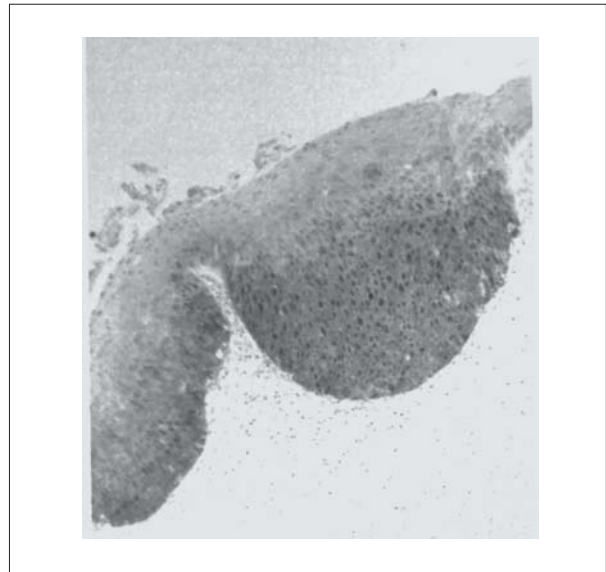


Fig. 1.- Marcación nuclear positiva para p16 en los 2/3 basales (tipo difuso) en una lesión escamosa intraepitelial de alto grado (100x).

rencia es altamente significativa ($p < 0.0001$). Pudo constatar mayor dispersión de los resultados en el grupo 3 (LIE-B) en el cual se observaron 64% casos positivos. Se evidenció concordancia total entre ambos observadores en 82.5% de los casos, parcial en 12.5% y discordancia en 5%. Si analizamos los resultados aplicando el sistema bimodal (focal/difuso), la concordancia general es del 95%.

Detección de HPV por PCR. Los resultados de la determinación de la presencia y subtipo de HPV en las biopsias del grupo 3 (LIE-B) pueden observarse en la Tabla 2. Todas las muestras con HPV-6/11 fueron negativas o positivas focales para p16, en tanto que aquellas con HPV-18 u otros subtipos fueron mayoritariamente positivas de tipo difuso. Si comparamos la asociación entre la marcación negativa o focal para p16 y HPV 6/11 con la marcación difusa y HPV 18, encontramos que la diferencia es altamente significativa ($p = 0.0002$).

Inmunomarcación en extendidos. Los resultados de la inmunomarcación para p16 en extendidos cervicovaginales convencionales se expresan en la Tabla 3. Correlacionando los resultados de los grupos de diagnóstico citológico y los resultados de la IHQ observamos marcación positiva de solo 9% de los casos en los grupos sin displasia ni neoplasia (grupos 1 y 2 sumados) y 89% de los casos en los grupos 5 y 6 sumados (LIE-A y CCE). Al igual que en la marcación de las biopsias, la mayor dispersión de los resultados se observó en los grupos 3 y 4 sumados (ASCUS-LIE-B y LIE-B) con 60% de casos positivos. Podemos observar que la distribución general de los resultados del estudio realizado en extendidos es muy semejante a la del estudio en biopsias. Si analizamos la relación entre la marcación para p16 y

TABLA 2.— Resultado de la genotipificación del HPV mediante PCR en relación con la inmunohistoquímica para la proteína p16

HPV	Nº casos	p16 neg	p16+	p16++	p16+++
6	2	2	0	0	0
11	14	7	7	0	0
16	0	0	0	0	0
18	4	0	0	3	1
Otros	5	1	0	4	0

Nº: número; neg: negativo; p16+: marcación tipo 1 (focal); p16++: tipo 2 (difuso); p16+++: tipo 3 (difuso).

TABLA 3.— Resultados de la inmunomarcación para la proteína p16 en extendidos cervicovaginales

Grupo	p16 neg	p16 pos	Total de casos
1	2	0	2
2	8	1	9
3	3	4	7
4	1	2	3
5	1	3	4
6	0	5	5

Las filas corresponden a los grupos por diagnóstico citológico y las columnas a los resultados de la Inmunohistoquímica. Neg: negativo; pos: positivo.

ASCUS, observamos que 11% de los casos con ASCUS-I fueron positivos, en tanto que fueron positivos 57% de aquellos con ASCUS-LIE-B.

Discusión

En nuestro estudio hemos podido observar, en concordancia con otros trabajos, una alta asociación entre la sobreexpresión de la p16, demostrada a través de un método relativamente accesible como la IHQ, y la presencia de displasia y neoplasia de células escamosas en biopsias de cuello uterino.

Con respecto al tipo de evaluación de la inmunomarcación para p16, coincidimos con otros autores en que la mejor metodología es la aplicación del sistema bimodal: negativo/positivo focal (comprende los tipos 0 y 1) y positivo difuso (comprende los tipos 2 y 3), ya que la marcación focal no respondería a sobreexpresión de la p16. Por otro lado, este sistema tiene la ventaja de mejorar la reproducibilidad interobservador, como ocurre cuando se aplica este método en el estudio histopatológico (LIE-B/LIE-A).

También, y a pesar de que el número de muestras estudiadas es escaso, hemos observado una alta asociación entre la marcación difusa para p16 y la presencia de HPV-AR.

Con respecto del estudio de p16 en extendidos cervicovaginales convencionales, encontramos que dicha determinación no presenta dificultades técnicas significativas; que teniendo la precaución de observar en las áreas más finas, las células positivas se identifican con facilidad y de manera reproducible. Además, al comparar la marcación para p16 en biopsias y extendidos observamos que los resultados en los diversos grupos son muy semejantes, por lo tanto la determinación podría efectuarse indistintamente en extendidos citológicos o muestras de tejido.

Así, podríamos concluir que la determinación de p16 por IHQ podría aportar un grado mayor de objetividad a los estudios histológico y citológico de rutina cuyos criterios morfológicos en estas patologías presentan un componente de subjetividad variable, mejorando de esta manera la reproducibilidad interobservador. Por otro lado, a través de la estrecha asociación entre la sobreexpresión de la p16 y el HPV-AR, y la factibilidad de hacer el estudio tanto en biopsias como en extendidos cervicovaginales convencionales, la inmunomarcación para esta proteína sería una herramienta útil para seleccionar grupos de individuos con riesgo de progresión de la enfermedad, metodología con un costo aceptable para la evaluación de grandes grupos de individuos.

Agradecimientos: El presente trabajo fue realizado con fondos provenientes de la Beca Houssay 2005 otorgada por la Municipalidad de Vicente López, Provincia de Buenos Aires. Abril de 2005.

Agradecemos su inestimable colaboración en este trabajo a los Doctores Graciela del Río, Andrea Werbach y Flavio Martínez, a las citotécnicas Jimena Massa, Cristina Falcucci y Eugenia Medina, a las histotécnicas Laura Iglesias e Irene Rigos, y a la bióloga Andrea Goldin.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Bibliografía

1. Rocco JW, Sidransky D. p16 (MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res* 2001; 264: 42-55.
2. Sternik G, Pittis MG, Gutiérrez M, Diez RA, Sen L. In acute lymphoblastic leukemia deletion of the tumor suppressor gene P16 is associated with abnormal interferon genes. *Medicina (Buenos Aires)* 1998;58:463-8.
3. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, et al. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001; 92: 276-84.
4. Wang JL, Zheng BY, Li XD, et al. p16INK4A and p14ARF expression pattern by immunohistochemistry in human papillomavirus-related cervical neoplasia. *Mod Pathol* 2005, 18: 629-37.

5. Benévolo M, Mottolèse M, Marandino F, et al. Immunohistochemical expression of p16(INK4a) is predictive of HR-HPV infection in cervical low-grade lesions. *Mod Pathol* 2006; 19: 384-91.
6. Kalof AN, Evans MF, Simmons-Arnold L, Beatty B, Cooper K. p16INK4A immunoeexpression and HPV in situ hybridization signal patterns: potential markers of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 674-9.
7. Agoff SN, Lin P, Morihara J, Mao C, Kiviat NB, Koutsky LA. p16(INK4a) expression correlates with the degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Mod Pathol* 2003; 16: 665-73.
8. Riethdorf S, Neffen EF, Cviko A, Löning T, Crum CP, Riethdorf L. p16INK4A expression as biomarker for HPV 16-related vulvar neoplasias. *Hum Pathol* 2004; 35: 1477-83.
9. Bose S, Evans H, Lantzy L, Scharre K, Youssef E. p16 (INK4a) is a surrogate biomarker for a subset of human papilloma virus-associated dysplasias of the uterine cervix as determined on the Pap smear. *Diagn Cytopathol* 2005; 32: 21-4.
10. Volgareva G, Zavalishina L, Andreeva Y, et al. Protein p16 as a marker of dysplastic and neoplastic alterations in cervical epithelial cells. *BMC Cancer* 2004; 4: 58.
11. Wang JL, Zheng BY, Li XD, Angström T, Lindström MS, Wallin KL. Predictive Significance of the Alterations of p16INK4A, p14ARF, p53, and Proliferating Cell Nuclear Antigen Expression in the Progression of Cervical Cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2407-14.
12. Murphy N, Ring M, Heffron C, et al. p16INK4A, CDC6, and MCM5: predictive biomarker in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2005; 58: 525-34.
13. Branca M, Ciotti M, Santini D, et al. p16(INK4A) expression is related to grade of CIN and high-risk human papillomavirus but does not predict virus clearance after conization or disease outcome. *Int J Gynecol Pathol* 2004; 23: 354-65.
14. Pientong C, Ekalaksananan T, Kongyingyoes B, et al. Immunocytochemical staining of p16INK4a protein from conventional Pap test and its association with human papillomavirus infection. *Diagn Cytopathol* 2004; 31: 235-42.
15. Hu L, Guo M, He Z, Thornton J, McDaniel LS, Hughson MD. Human papillomavirus genotyping and p16INK4a expression in cervical intraepithelial neoplasia of adolescents. *Mod Pathol* 2005; 18: 267-73.
16. Klaes R, Benner A, Friedrich T, et al. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2002; 26: 1389-99.
17. Merkelbach-Bruse S, Jakob C, Tietze L, Schröder W, Rath W, Füzesi L. Consensus polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay for human papillomavirus detection and typing in cervical specimens. *Diagn Mol Pathol* 1999; 8: 32-8
18. Nieh S, Chen SF, Chu TY, et al. Is p16(INK4A) expression more useful than human papillomavirus test to determine the outcome of atypical squamous cell of undetermined significance-categorized Pap smear? A comparative analysis using abnormal cervical smears with follow-up biopsies. *Gynecol Oncol* 2005; 97: 35-40.
19. Longatto Filho A, Utagawa ML, Shirata NK, et al. Immunocytochemical expression of p16INK4A and Ki-67 in cytologically negative and equivocal pap smears positive for oncogenic human papillomavirus. *Int J Gynecol Pathol* 2005; 24: 118-24.
20. Wentzensen N, Bergeron C, Cas F, Eschenbach D, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Evaluation of a nuclear score for p16INK4a-stained cervical squamous cells in liquid-based cytology samples. *Cancer* 2005; 105: 461-7.
21. Yoshida T, Fukuda T, Sano T, Kanuma T, Owada N, Nakajima T. Usefulness of liquid-based cytology specimens for the immunocytochemical study of p16 expression and human papillomavirus testing: a comparative study using simultaneously sampled histology materials. *Cancer* 2004; 102: 100-8.
22. Bibbo M, DeCecco J, Kovatich AJ. p16INK4A as an adjunct test in liquid-based cytology. *Anal Quant Cytol Histol* 2003; 25: 8-11.
23. Akpolat I, Smith DA, Ramzy I, Chirala M, Mody DR. The utility of p16INK4a and Ki-67 staining on cell blocks prepared from residual thin-layer cervicovaginal material. *Cancer* 2004; 102: 142-9.
24. Bibbo M, Klump WJ, DeCecco J, Kovatich AJ. Procedure for immunocytochemical detection of p16INK4A antigen in thin-layer, liquid-based specimens. *Acta Cytol* 2002; 46: 25-9.
25. Dray M, Russell P, Dalrymple C, et al. p16(INK4a) as a complementary marker of high-grade intraepithelial lesions of the uterine cervix. I: Experience with squamous lesions in 289 consecutive cervical biopsies. *Pathology* 2005; 37: 112-24.
26. Nieh S, Chen SF, Chu TY, Lai HC, Fu E. Expression of p16INK4A in Papanicolaou smears containing atypical squamous cell of undetermined significance from the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2003; 91: 201-8.
27. Negri G, Vittadello F, Romano F, et al. p16INK4a expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. *Virchows Arch* 2004; 445: 616-20.
28. Lambert AP, Anschau F, Schmitt VM. p16INK4A expression in cervical premalignant and malignant lesions. *Exp Mol Pathol* 2006; 80: 192-6.