

# Inmunotinción dual p16INK4a/ki-67 en citología vaginal en medio líquido. Prueba piloto de complemento diagnóstico

## Dual Immunostaining p16INK4a / ki-67 in Vaginal Citology in the Net. Pilot Proof of Diagnostic Complement

Recepción: 27/02/2019 | Aceptación: 29 Mayo 2019

MYRIAM BEATRIZ PUERTO DE AMAYA

Bacterióloga, citohistóloga. Profesora asistente,  
Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud,  
Bogotá, Colombia

MERCEDES OLAYA-C.<sup>a</sup>

MD. PhD. Médica patóloga. Profesora asociada,  
Departamento de Patología, Facultad de Medicina,  
Pontificia Universidad Javeriana-Hospital Universitario  
San Ignacio, Bogotá, Colombia

EDY MARCELA CORREDOR LÓPEZ

Citohistoténologa, Fundación Universitaria de Ciencias  
de la Salud, Bogotá, Colombia

CARLOS HUMBERTO PÉREZ MORENO

Médico. Director del Hospital Universitario San José.  
Profesor titular. Médico ginecoobstetra, Fundación  
Universitaria de Ciencias de la Salud, Bogotá, Colombia

<sup>a</sup> Correspondencia: [olaya.m@javeriana.edu.co](mailto:olaya.m@javeriana.edu.co)

*Conflictos de interés:* Los autores declaran que no hay conflictos de interés en el presente manuscrito.

*Cómo citar:* Puerto de Amaya MB, Olaya-C. M, Corredor López EM, Pérez Moreno CH. Inmunotinción dual p16INK4a/ki-67 en citología vaginal en medio líquido: prueba piloto de complemento diagnóstico. Univ. Med. 2020;61(1). <https://doi.org/10.11144/Javeriana.umed61-1.dual>

### RESUMEN

**Objetivo:** Introducir la prueba de desregulación del ciclo celular p16 y ki-67 como complemento en el estudio de la evolución de las lesiones reportadas con atipia escamosa (ASC-US, LSIL y HSIL) en extendidos citológicos, dada su capacidad como marcador de progresión de lesiones precancerosas a cáncer; se compara con patrón de referencia. **Métodos:** Se ejecutó un estudio observacional analítico de corte transversal en una población a la que se le realizó citología en base líquida. A las citologías positivas se les aplicó adicionalmente inmunocitoquímica, cepillado endocervical, colposcopia y biopsia. **Resultados:** De las 51 citologías estudiadas, 35 (68,6%) se clasificaron como negativas y 16 (31,3%) con atipia: ASCU-US (n = 8), LSIL (n = 7) y HSIL (n = 1). De estos 16 casos, la prueba de inmunocitoquímica fue positiva para 3 de los 7 LSIL y para el caso identificado como HSIL. Los 8 casos reportados como ASC-US fueron negativos para biomarcadores. **Conclusión:** El presente estudio piloto realizado a 51 muestras detectó 4 de ellas con un ciclo celular desregulado, mediante inmunorreactividad a la doble tinción de p16/ki-67; 3 citologías habían mostrado LSIL y una HSIL. Los biomarcadores son un complemento útil en el tamizaje para el control de cáncer de cuello uterino, específicos para lesiones en progresión a malignidad, que se deben promover en nuestro país.

### Palabras clave

inmunohistoquímica; lesiones intraepiteliales escamosas de cuello uterino; genes p16INK4; papiloma.

## ABSTRACT

**Objective:** Apply in a pilot study tests that show the deregulation of the cell cycle and therefore the progression to cancer, as is the case of the studies with p16 and ki-67; as a complement in the study of the evolution of the lesions reported as squamous atypia (ASC-US, LSIL, and HSIL) in cytological outlines. **Methods:** Observational analytical study was carried out with liquid-based cytology, which was supplemented with immunocytochemistry, biopsy, endocervical brushing and colposcopy in positive cases. **Results:** Of the 51 Pap smears studied, 35 (68.6%) were classified as negative and 16 (31.3%) with atypia, which were classified as: ASCU-US (n=8); LSIL (n=7) and HSIL (n=1). Among those 16 positive cases, the immunocytochemical test was positive for 3 of the 7 LSIL and for the case reported as HSIL. The 8 cases reported as ASC-US were negative for biomarkers. **Conclusion:** This current study based on 51 patients, four of them were detected with deregulated cellular cycle by immunoreactivity to dual p16/ki67; 3 cases were classified as LSIL and one case as HSIL. Biomarkers are a useful complement in the cervical cancer screening, mainly for lesions in progression to malignancy, which should be promoted in our country.

### Keywords

immunocytochemistry; squamous intraepithelial lesions of the cervix; p16INK; papilloma.

## Introducción

La infección persistente por el virus del papiloma humano de alto riesgo (HPV-H) se considera un factor necesario para el desarrollo de cáncer de cuello uterino y de sus lesiones precursoras (1,2,3). Al menos 13 genotipos se han encontrado asociados al alto riesgo de desarrollar cáncer cervical y se han definido como *carcinogénicos* (4). Alrededor del mundo, el HPV16 se ha identificado como el virus más frecuente asociado tanto para el carcinoma escamocelular como para el adenocarcinoma, seguido del HPV18 (5). El mecanismo carcinogénico conlleva la integración del DNA viral al genoma celular. Posteriormente, hay replicación del DNA viral con particular importancia de la expresión de los genes E6 y E7, que altera las vías celulares de la célula hospedadora (6).

La interacción del genoma viral con zonas frágiles de la célula infectada parece ser crucial para la progresión maligna. La inactivación funcional de genes oncosupresoras como p53

y pRb (gen del retinoblastoma) determina la alteración de las vías conducentes a la transformación a cáncer (7,8,9), mediante un estado proliferativo, inestabilidad genética y formación de un clon celular maligno (9,10). La expresión de E7 determina la inactivación de pRb, lo que aumenta la forma libre de E2F en la célula, que a su vez incrementa el inhibidor de cinasa dependiente de la ciclina p16 (p16INK4a) y una proliferación aberrante, la cual se puede observar por el incremento del marcador de proliferación celular Ki-67 (11). Las alteraciones moleculares inducidas por HPV-H se pueden estudiar mediante biomarcadores utilizados sobre muestras de citología, pues representan una herramienta complementaria de valor diagnóstico y pronóstico en pacientes con infección (7,10). Estos permiten diferenciar las infecciones que están alterando el ciclo celular, las cuales son el objetivo en los programas de detección de precoz de cáncer.

La tinción dual p16INK4a y Ki-67 de inmunocitoquímica permite el reconocimiento de células neoplásicas con ciclo celular alterado y la proliferación descontrolada en muestras de citología del cuello uterino (12,13,14). La doble tinción de biomarcadores con inmunocitoquímica se usa en muestras reportadas como atipia indeterminada de células escamosas (ASC-US, por sus siglas en inglés) y lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LSIL, por su sigla en inglés) por citología convencional o citología en medio líquido (CBL) y positivas para DNA-HPV-H (15,16,17,18). Así mismo, la doble tinción identifica lesiones intraepiteliales de alto grado, con una buena sensibilidad y especificidad (96% y 83%, respectivamente). Sin embargo, estos diagnósticos pueden estar sujetos a variabilidad entre observadores y la prueba para HPV de alto riesgo puede llegar a invalidarse por hipocelularidad; en tales circunstancias, la tinción de inmunocitoquímica ayuda en la definición diagnóstica (19,20,21,22,23).

La tinción es particularmente útil en el diagnóstico diferencial entre lesiones no neoplásicas (como procesos inflamatorios o cambios celulares asociados a atrofia)

y las lesiones verdaderamente premalignas (13,24,25,26,27). Los casos de atrofia, metaplasia tubárica, epitelios endometrial y endocervical o metaplasia escamosa (28,29,30) evidencian una positividad inespecífica a p16 (25,31,32); mientras que p16INK4a ha sido altamente específico, con significancia estadística en el tamizaje de mujeres con ASC-US, por una sensibilidad relativa de 0,95 (95%; IC: 0,89-1,01) y una especificidad relativa de 1,82 (95%; IC: 1,57-2,12) (4).

En el presente trabajo se observó la doble tinción p16 y Ki-67 en extendidos de citología con reporte de atipia escamosa: ASC-US, LSIL y lesión escamosa intraepitelial de alto grado (HSIL, por sus siglas en inglés), lo que permitió estandarizar la metodología e interpretar la inmunocitoquímica. Estos resultados se complementaron con colposcopia y biopsia en los casos pertinentes. En nuestro medio colombiano, el uso de la doble tinción en CBL no se había realizado, por lo que este estudio es pionero en el país.

## Materiales y métodos

*Tipo de estudio.* Estudio observacional analítico de corte transversal con CBL complementada con inmunocitoquímica (p16/Ki-67) en casos diagnosticados como ASC-US, atipia que no permite descartar lesión de alto grado (ASC-H), LSIL y HSIL. Se exploró la utilidad de la prueba de inmunocitoquímica (p16/Ki-67) para captar pacientes con riesgo de progresión a cáncer. A las citologías positivas se les hizo estudios complementarios de inmunocitoquímica, una segunda revisión por ginecólogo, colposcopia y toma de muestra para estudio histológico. El estudio contó con aprobación del Comité de Ética de la institución donde laboran los investigadores.

*Población.* Se tomaron muestras al universo constituido por 51 mujeres que acudieron voluntariamente a una campaña de toma de citología en la decimotercera Jornada de Salud Ocupacional del Hospital de San José y la Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud

(Colombia) en 2013. Se incluyeron las mujeres mayores de 18 años de edad. Se excluyeron mujeres embarazadas (33) y mujeres sometidas a histerectomía previamente. A las participantes se les explicó la finalidad del estudio, posterior a lo cual firmaron consentimiento informado aceptando ser parte de la investigación.

*Variables clínicas.* Edad, paridad, tabaquismo, enfermedades de transmisión sexual, edad de inicio de relaciones sexuales, número de compañeros sexuales y métodos de planificación. Estas variables corresponden a la anamnesis estandarizada en el formato de toma de muestra de citología uterina, avalado por el Ministerio de Salud y la Secretaría de Salud de Bogotá. Estas variables se relacionan con el riesgo de la población para desarrollar cáncer de cuello uterino.

*Muestras para citología en medio líquido.* Inicialmente, se valoró bajo colposcopio del cuello uterino y posteriormente se tomó la CBL (directo al vial), utilizando un citocepillo (Rovers®). Se realizó un extendido por caso, usando el equipo manual (BD PrepMate™ System) para el procesamiento de la CBL, siguiendo las recomendaciones del proveedor. Los extendidos se procesaron y analizaron en la Facultad de Citohistología de la Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud. Se utilizó la coloración de Papanicolaou y su interpretación se basó en los criterios de Bethesda de 2014 (34). La primera lectura la realizó un tecnólogo en citohistología, y los 16 casos reportados con atipia (ASC-US, LSIL y HSIL) los confirmaron dos patólogos. Hubo concordancia en todos los casos. Uno de los patólogos también hizo la revisión del 10% de los casos negativos, como es la rutina.

*Muestra para tinción de inmunocitoquímica.* A las muestras residuales interpretadas como positivas (ASC-US, LSIL y HSIL) se les realizó la prueba de inmunocitoquímica del vial (BD SurePath™) guardado a 4 °C. La inmunocitoquímica se realizó de manera convencional. Se utilizó el CINtec Plus Kit<sup>R</sup> siguiendo las indicaciones del proveedor. El kit está diseñado para llevar a cabo un procedimiento de tinción inmunocitoquímica de dos pasos sobre las preparaciones de citología cervical. Se usaron controles positivos

y negativos, según la indicación de la casa comercial. El análisis de estas muestras lo realizaron dos patólogos cegados para los resultados morfológicos de cada uno de los casos. El criterio para determinar una muestra positiva fue el hallazgo de una o más células epiteliales que mostraron doble reactividad: tanto citoplasma pardo como núcleo rojo (10,19,23).

A los casos positivos para la prueba p16 y Ki-67 se les realizó una segunda colposcopia por parte de un ginecólogo con experiencia en colposcopia. Se tomaron el cepillado endocervical y la biopsia cervical como patrones de referencia del estudio, un mes después de la primera toma. Estas muestras histológicas fueron leídas por los dos patólogos.

En cuanto a las mujeres con resultado negativo en la citología, se les indicó seguimiento a tres años, mediante el esquema 1-3-3, recomendado por el Ministerio de Salud y Protección Social.

## Resultados

Se incluyó el universo de 51 mujeres. Las edades oscilaron entre 18 y 60 años con un promedio de 39,8 y una desviación estándar de 10,3. Las características demográficas de las pacientes con resultado positivo se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1**

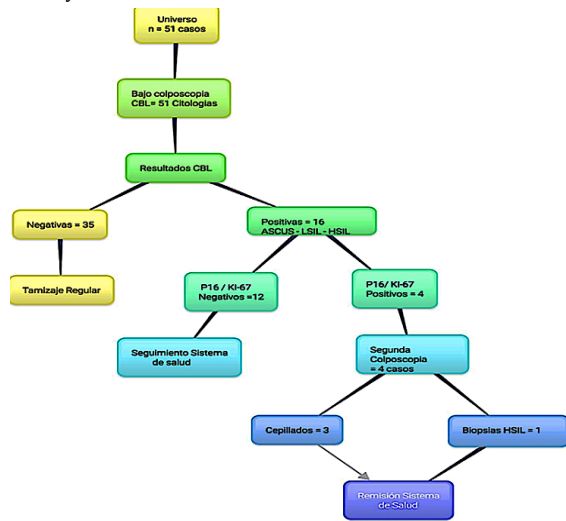
*Distribución de casos positivos por citología según variables*

Caso	Citología	MP	Fum	ETS	NCS	IRS	Paridad	Edad
2	ASC-US	Si	No	No	0	0	0	28
3	ASC-US	No	No	No	3	18	1	32
7	ASC-US	No	No	No	1	17	3	41
13	ASC-US	Si	No	No	1	19	0	22
18	ASC-US	Si	No	No	2	18	3	40
32	ASC-US	No	No	No	3	16	1	45
35	ASC-US	No	No	No	1	25	3	52
41	ASC-US	Si	No	No	1	17	2	31
1	LSIL	No	No	No	1	19	0	25
12	LSIL	Si	No	No	3	17	1	28
15	LSIL	Si	No	No	5	15	2	26
38	LSIL	Si	No	No	1	19	2	45
39	LSIL	Si	No	HPV	2	15	2	34
44	LSIL	Si	No	No	2	21	2	28
51	LSIL	No	No	HPV	1	18	0	46
9	HSIL	No	No	No	1	16	5	53

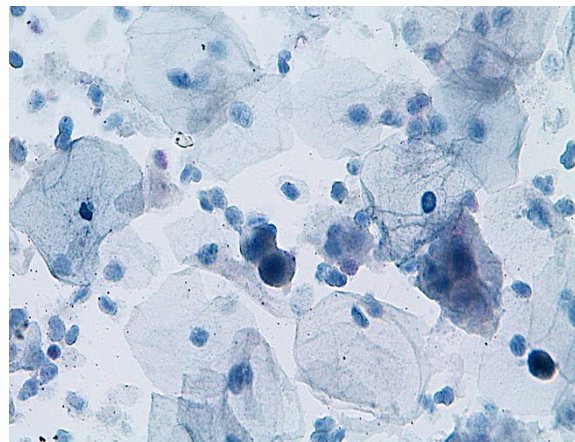
MP: método de planificación; ETS: enfermedades de transmisión sexual; NCS: número de compañeros sexuales; IRS: inicio de relaciones sexuales.

De las 51 citologías estudiadas, 35 fueron catalogadas como negativas, y 16, con atipia, que se clasificaron como: ASCU-US (n = 8), LSIL (n = 7) y HSIL (n = 1) (figura 1). La prueba de inmunocitoquímica fue positiva para 3 de los 7 casos reportados como LSIL y para el caso clasificado como HSIL. Los 8 casos reportados por citología como ASCU-US fueron negativos para biomarcadores. Las figuras 2 y 3 muestran pruebas positiva y negativa.

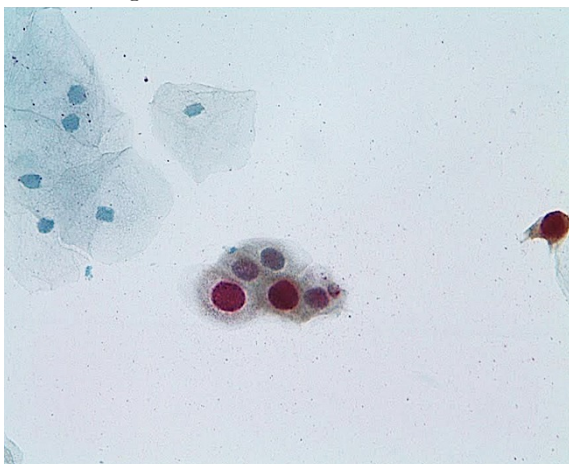
**Figura 1**  
*Clasificación de los casos*



**Figura 2**  
*Muestra positiva*



**Figura 3**  
Muestra negativa



A quienes tuvieron resultados citológicos positivos, se les hizo una segunda valoración colposcópica. Cuando esta fue anormal, se tomó biopsia o cepillado endocervical (tabla 2). El cepillado fue anormal en 3 de ellas (dos LSIL y una HSIL), y la biopsia, en 2 de las 4 pacientes (dos neoplasias intraepiteliales cervicales I [NIC-I] asociados a HPV). El tratamiento y seguimiento posterior requerido por el grupo de pacientes en riesgo identificado se siguió según el conducto establecido por el sistema de salud.

**Tabla 2**  
Resultados con prueba complementaria

Caso	Citología	Citología previa	Colposcopia	Biopsia	Cepillado endocervical	PCR	p16/Ki67
2	ASC-US	Normal	Negativa	No	No	No	Negativo
3	ASC-US	Normal	Negativa	No	No	No	Negativo
7	ASC-US	Normal	Negativa	No	No	No	Negativo
13	ASC-US	Normal	Negativa	No	No	No	Negativo
18	ASC-US	Normal	Negativa	No	No	No	Negativo
32	ASC-US	Normal	Negativa	No	No	No	Negativo
35	ASC-US	Normal	Positiva	HPV	No	No	Negativo
41	ASC-US	Normal	Negativa	No	No	No	Negativo
1	LSIL	Normal	Negativa	No	No	No	Negativo
12	LSIL	LSIL	Negativa	No	No	No	Negativo
15	LSIL	Normal	Negativa	No	LSIL	No	Positiva
38	LSIL	Normal	EAB	VDM	No	No	Positiva
39	LSIL	LSIL	Positiva- Inflamación	No	No	No	Negativo
44	LSIL	Normal	Negativa	No	No	No	Negativo
51	LSIL	ASC-US	Positiva	LSIL-HPV	HSIL	VHP	Positiva
9	HSIL	Normal	Negativa	LSIL	HSIL	No	Positiva

EAC: epitelio acetoblancos (se tomó biopsia);  
VDM: material insuficiente para diagnóstico.

## Discusión

En el mundo, el tamizaje para la detección temprana de cáncer de cuello uterino se ha

centrado recientemente en la necesidad de conocer si la infección está dada por algún virus de alto riesgo. Más recientemente se ha estudiado si el genoma de la célula hospedadora tiene alterados sus mecanismos de control. Dado que la infección viral es frecuente, se desea saber en cuáles casos el virus es de alto riesgo y cuándo ha alterado los mecanismos de regulación celular, convirtiéndose en amenaza de desarrollo de cáncer.

En Colombia, la determinación de HPV de alto riesgo se introdujo como prueba primaria de tamizaje; sin embargo, aún no se realiza de manera homogénea. Esta debería estar acompañada de CBL, la cual tiene la ventaja de permitir pruebas moleculares; no obstante, en nuestro medio esta prueba cuesta más del doble de la citología convencional. También persisten problemas en la calidad de la toma de la muestra, ya que pueden carecer de zona de transformación.

Dentro de los problemas postanalíticos está la falta de empoderamiento de algunas pacientes en la búsqueda del resultado del examen, la falta de coordinación de algunas instituciones prestadoras de servicios de salud en la búsqueda activa de pacientes con resultados positivos y de los laboratorios respecto a tener mecanismos para informar a los médicos tratantes y las pacientes de los resultados positivos para lesiones cervicales.

Al tender a un tamizaje más efectivo, en este trabajo se hizo una primera aproximación a la CBL con la aplicación de la doble tinción con biomarcador (inmunocitoquímica) para lesiones de alto grado. La ventaja de la prueba es que muestra lesiones de alto grado que no se han identificado como tales morfológicamente, lo que permite el diagnóstico temprano de la progresión a lesiones de alto riesgo.

Múltiples estudios resaltan las bondades de esta técnica. En el estudio de Wentzensen et al. (20), basado en un proyecto piloto (2007-2008) con 425 mujeres que tenían prueba de Papanicolaou negativa, pero HPV positivo, se incluyó la tinción dual p16/Ki-67 con el objetivo de identificar casos de NIC-2 que fueron corroborados por biopsia. El estudio arrojó una sensibilidad del 91,9% para detectar NIC-2 y del

96,4% para NIC-3. La especificidad fue del 82,1% para NIC-2 y del 76,9% para NIC-3. El estudio concluyó que la citología con tinción dual doble puede identificar mujeres con una alta posibilidad de NIC-2 y puede complementar los programas de tamizaje para carcinoma de cuello uterino. En el estudio de Petry et al. (19), la sensibilidad y la especificidad en el grupo de ASC-US fue del 95% y del 84%, y para los casos de LSIL, del 100% y del 81%, respectivamente. Basados en los hallazgos, los autores del estudio concluyeron que el uso de un biomarcador permite la identificación de HSIL (18,19,23,26,35,36,37). La precisión del test p16INK4a ha sido probada en citología con diagnóstico de ASC-US y LSIL (38,39).

La ventaja de esta técnica es que observó que la coexpresión de p16INK4a y Ki-67 solo ocurría en presencia de displasia (40). Además, mejora la variabilidad intra- e interobservador, que se presenta en la evaluación de citologías cervicouterinas (16) y en la interpretación histopatológica (15,36,41,42,43). La prueba es recomendada para diferenciar entre lesiones verdaderamente displásicas.

En el presente estudio, a pesar de ser una muestra pequeña, que está controlada por tamizaje con citología convencional, se hallaron casos positivos con la doble tinción (p16/Ki-67), lo que llevó a estudios posteriores con una segunda colposcopia y estudios histológicos. Pacientes con lesión de bajo grado, que no hubiesen sido dirigidas a estudios subsecuentes (colposcopia: biopsia o cepillado endocervical), gracias al resultado del biomarcador positivo que identificó la desregulación del ciclo celular y, por ende, el riesgo potencial de progresión de la infección a cáncer, fueron sometidas a exámenes adicionales. La inmunocitoquímica va dirigida a lesiones de alto grado no detectadas en la morfología de la citología de tamizaje, la cual se hubiese informado como ASC-US o LSIL.

Una de las limitaciones es tener una población cerrada con probablemente escasa exposición a factores de riesgo. Tampoco se contó, para todas las mujeres, con otra herramienta diagnóstica valiosa como es la prueba para DNA del HPV de alto riesgo. En un futuro, se requieren estudios con una población más representativa

con respecto a factores de riesgo y en cuanto a número de participantes.

Los análisis específicos para HPV son muy importantes para el tamizaje, y son un complemento excepcional ante citologías vaginales anormales, así como lo serán en la monitorización de las generaciones venideras para el seguimiento de la eficacia vacunal. En casos como los expuestos, se detectaron lesiones premalignas, no por la presencia de un virus de alto riesgo, sino por la evidencia de la alteración en la regulación del ciclo celular, lo cual pone en la mira la vigilancia estrecha sobre estas pacientes.

Esta herramienta permite eliminar una vigilancia innecesaria ante infecciones ocasionadas por virus de alto riesgo que las pacientes iban a eliminar sin tratamiento, y también de lesiones citológicas de alto riesgo que iban a regresar espontáneamente. Con este tipo de pruebas, se puede optimizar la vigilancia epidemiológica, enfatizando donde esté el verdadero riesgo de progresión a cáncer.

## Conclusión

El cáncer de cuello uterino continúa siendo un enemigo mundial para la salud de las mujeres. Las pruebas moleculares han ido complementando los programas de tamizaje y ayudando a comprender la infección y sus mecanismos de progresión a cáncer, tanto desde el punto de vista viral como desde el hospedador. Tenemos en nuestro medio esta primera experiencia en la implementación de p16/Ki-67 en CBL, que detectó mujeres cuyo manejo temprano cambió ante el resultado molecular, modificando lo que en otro momento hubiese sido la “historia natural de la enfermedad”. Con esta experiencia, se espera en un futuro poder realizar nuevas investigaciones que amplíen la experiencia de citólogos y patólogos con estas técnicas, acercando estas pruebas a la población en riesgo en nuestro país.

## Agradecimientos

A las pacientes participantes. Al Dr. Juan Carlos Bonilla por la lectura de las muestras como patólogo.

## Referencias

1. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87(11):796-802.
2. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999;189(1):12-9.
3. Wright JD, Rader JS, Dávila R, Powell MA, Mutch DG, Gao F, et al. Human papillomavirus triage for young women with atypical squamous cells of undetermined significance. *Obstet Gynecol.* 2006;107(4):822-9.
4. Tornesello ML, Buonaguro L, Giorgi-Rossi P, Buonaguro FM. Viral and cellular biomarkers in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and cancer. *BioMed research international.* 2013;2013:519619. <https://doi.org/10.1155/2013/519619>.
5. Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJ, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer.* 2011;128(4):927. <https://doi.org/10.1002/ijc.25396>.
6. Hopman AH, Smedts F, Dignef W, Ummelen M, Sonke G, Mravunac M, et al. Transition of high-grade cervical intraepithelial neoplasia to micro-invasive carcinoma is characterized by integration of HPV 16/18 and numerical chromosome abnormalities. *J Pathol.* 2004;202(1):23-Epub 2003/12/25.
7. Dürst M, Dzarlieva-Petrusevska RT, Boukamp P, Fusenig NE, Gissmann L. Molecular and cytogenetic analysis of immortalized human primary keratinocytes obtained after transfection with human papillomavirus type 16 DNA. *Oncogene.* 1987;1(3):251-6.
8. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science.* 1990;248(4951):76-9.
9. Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science.* 1989;243(4893):934-7.
10. Toro de Méndez M, Ferrández Izquierdo A. [Detection of human papilloma virus (HPV) in liquid-based cervical samples. Correlation with protein p16INK4a expression]. *Invest Clin.* 2011;52(1):3-14.
11. Nakao Y, Yang X, Yokoyama M, Ferenczy A, Tang SC, Pater MM, et al. Induction of p16 during immortalization by HPV 16 and 18 and not during malignant transformation. *British journal of cancer.* 1997;75(10):1410-Epub 1997/01/01.
12. Shidham VB, Mehrotra R, Varsegi G, D'Amore KL, Hunt B, Narayan R. p16 immunocytochemistry on cell blocks as an adjunct to cervical cytology: Potential reflex testing on specially prepared cell blocks from residual liquid-based cytology specimens. *Cytojournal.* 2011;8. <https://doi.org/10.4103/1742-6413.76379>



13. Singh M, Mockler D, Akalin A, Burke S, Shroyer A, Shroyer KR. Immunocytochemical colocalization of P16(INK4a) and Ki-67 predicts CIN2/3 and AIS/adenocarcinoma. *Cancer cytopathology*. 2012;120(1):26. <https://doi.org/10.1002/cncy.20188>
14. Donà MG, Vocaturo A, Giuliani M, Ronchetti L, Rollo F, Pescarmona E, et al. p16/Ki-67 dual staining in cervico-vaginal cytology: correlation with histology, Human Papillomavirus detection and genotyping in women undergoing colposcopy. *Gynecol Oncol*. 2012;126(2):198-202. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2012.05.004>
15. Bergeron C, Ordi J, Schmidt D, Trunk MJ, Keller T, Ridder R, et al. Conjunctive p16INK4a testing significantly increases accuracy in diagnosing high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol*. 2010;133(3):395-406. <https://doi.org/10.1309/AJCPXSVCDZ3D5MZM>
16. Gustinucci D, Passamonti B, Cesarini E, Butera D, Palmieri EA, Bulletti S, et al. Role of p16(INK4a) cytology testing as an adjunct to enhance the diagnostic specificity and accuracy in human papillomavirus-positive women within an organized cervical cancer screening program. *Acta Cytol*. 2012;56(5):506. <https://doi.org/10.1159/000338979>
17. von Knebel Doeberitz M, Reuschenbach M, Schmidt D, Bergeron C. Biomarkers for cervical cancer screening: the role of p16(INK4a) to highlight transforming HPV infections. *Expert Rev Proteomics*. 2012;9(2):149-63. <https://doi.org/10.1586/epr.12.13>
18. Ikenberg H, Bergeron C, Schmidt D, Griesser H, Alameda F, Angeloni C, et al. Screening for cervical cancer precursors with p16/Ki-67 dual-stained cytology: results of the PALMS study. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105(20):1550. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt235>
19. Petry KU, Schmidt D, Scherbring S, Luyten A, Reinecke-Lüthge A, Bergeron C, et al. Triage of Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology. *Gynecol Oncol*. 2011;121(3):505. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2011.02.033>
20. Wentzensen N, Bergeron C, Cas F, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Triage of women with ASCUS and LSIL cytology: use of qualitative assessment of p16INK4a positive cells to identify patients with high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer*. 2007;111(1):58-66.
21. Toll AD, Kelly D, Maleki Z. Utility of P16 expression and Ki-67 proliferation index in ASCUS and ASC-H pap tests. *Diagn Cytopathol*. 2014;42(7):576. <https://doi.org/10.1002/dc.23076>
22. Atkins K. p16/Ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL papanicolaou cytology: p16/Ki-67 in cervical papanicolaou Tests. *Cancer cytopathology*. 2011;119(3):145. <https://doi.org/10.1002/cncy.20139>
23. Schmidt D, Bergeron C, Denton KJ, Ridder R, Group ECCS. p16/ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL papanicolaou cytology: results from the European equivocal or mildly abnormal Papanicolaou cytology study. *Cancer cytopathology*. 2011;119(3):158. <https://doi.org/10.1002/cncy.20140>
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;97(1):35-40.
25. Duncan L, Jacob S, Hubbard E. Evaluation of p16INK4a as a diagnostic tool in the triage of Pap smears demonstrating atypical squamous cells of undetermined significance. *Cancer.* 2008;114(1):34. <https://doi.org/10.1002/cncr.23255>
26. Wentzensen N, Schwartz L, Zuna RE, Smith K, Mathews C, Gold MA, et al. Performance of p16/Ki-67 immunostaining to detect cervical cancer precursors in a colposcopy referral population. *Clin Cancer Res.* 2012;18(15):4154. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0270>
27. 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 treatment reviews.* 2009;35(3):210. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2008.10.005>
28. Walts AE, Bose S. P16/Ki-67 Immunostaining is Useful in Stratification of Atypical Metaplastic Epithelium of the Cervix. *Clin Med Pathol.* 2008;1:35-42.
29. Regauer S, Reich O. CK17 and p16 expression patterns distinguish (atypical) immature squamous metaplasia from high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III). *Histopathology.* 2007;50(5):629-35.
30. 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;131(9):1343-9.
31. Mittal K, Soslow R, McCluggage WG. Application of immunohistochemistry to gynecologic pathology. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132(3):402. [https://doi.org/10.1043/1543-2165\(2008\)132\[402:AOITGP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1043/1543-2165(2008)132[402:AOITGP]2.0.CO;2)
32. 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. *International journal of cancer.* 2001;92(2):276-Epub 2001/04/06.
33. Trutnovsky G, Kolovetsiou-Kreiner V, Reich O. p16/Ki-67 dual-stained cytology testing may predict postpartum outcome in patients with abnormal papanicolaou cytology during pregnancy. *Acta Cytol.* 2014;58(3):293-6. <https://doi.org/10.1159/000358817>.
34. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA.* 2002;287(16):2114-9.
35. Denton KJ, Bergeron C, Klement P, Trunk MJ, Keller T, Ridder R, et al. The sensitivity and specificity of p16(INK4a) cytology vs HPV testing for detecting high-grade cervical disease in the triage of ASC-US and LSIL pap cytology results. *Am J Clin Pathol.* 2010;134(1):12. <https://doi.org/10.1309/AJCP3CD9YKYFJDQL>
36. del Pino M, Garcia S, Fusté V, Alonso I, Fusté P, Torné A, et al. Value of p16(INK4a) as a marker of progression/regression in cervical intraepithelial neoplasia grade Am J Obstet Gynecol. 2009;201(5):488.e1. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2009.05.046>
37. Yoshida T, Sano T, Kanuma T, Inoue H, Itoh T, Yazaki C, et al.

Usefulness of CINtec® PLUS p16/Ki-67 double-staining in cytological screening of cervical cancer. *Acta Cytol.* 2011;55(5):413. <https://doi.org/10.1159/000331047>

38. 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. *The Lancet Oncology.* 2008;9(10):937. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(08\)70208-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(08)70208-0)

39. Roelens J, Reuschenbach M, von Knebel Doeberitz M, Wentzensen N, Bergeron C, Arbyn M. p16INK4a immunocytochemistry versus human papillomavirus testing for triage of women with minor cytologic abnormalities: a systematic review and meta-analysis. *Cancer cytopathology.* 2012;120(5):294-307. <https://doi.org/10.1002/cncy.21205>

40. Reuschenbach M, Seiz M, von Knebel Doeberitz C, Vinokurova S, Duwe A, Ridder R, *et al.* Evaluation of cervical cone biopsies for coexpression of p16INK4a and Ki-67 in epithelial cells. *International journal of cancer.* 2012;130(2):388. <https://doi.org/10.1002/ijc.26017>

41. Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D, *et al.* p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2002;26(11):1389-99.

42. Galgano MT, Castle PE, Atkins KA, Brix WK, Nassau SR, Stoler MH. Using biomarkers as objective standards in the diagnosis of cervical biopsies. *Am J Surg Pathol.* 2010;34(8):1077. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3181e8b2c4>

43. Sari Aslani F, Safaei A, Pourjabali M, Momtahan M. Evaluation of Ki67, p16 and CK17 Markers in Differentiating Cervical Intraepithelial Neoplasia and Benign Lesions. *Iran J Med Sci.* 2013;38(1):15-21.