

Infezione genitale da HPV: esami di laboratorio

Carlo A. Liverani, G. Mojana

Servizio di Ginecologia Preventiva
Dipartimento di Ostetricia, Ginecologia e Neonatologia
Fondazione IRCCS
Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena
di Milano

La Colposcopia in Italia Anno XX – N. 2 pagg. 12-16

Introduzione

Il 99,7% dei carcinomi della cervice uterina alberga sequenze genomiche di papillomavirus umano (HPV). I tipi virali ad alto rischio oncogeno (HR HPV) sono responsabili della possibile integrazione all'interno del DNA cellulare, determinando modificazioni di tipo preneoplastico che possono regredire, rimanere invariate, o progredire verso forme tumorali invasive. Un'infezione persistente con i genotipi di HPV ad alto rischio è la causa necessaria allo sviluppo del cervicocarcinoma. Donne con Pap test normale e positività per HR HPV presentano un rischio 116 volte maggiore di sviluppare lesioni squamose intraepiteliali di alto grado rispetto a donne negative per HR HPV. Unitamente al genotipo di virus ed alla carica virale, il fattore principale dell'evoluzione in senso maligno è legato alle difese immunitarie dell'ospite. La coinfezione con tipi multipli di HPV non rappresenterebbe invece un fattore di rischio elevato per la progressione della malattia.

L'infezione genitale da HPV può essere diagnosticata con citologia, istologia e metodiche di biologia molecolare. La citologia non è un metodo affidabile per rilevare l'HPV: coilociti e discheratociti sono markers specifici solo per l'infezione clinica e la maggioranza delle infezioni da HPV non può essere rilevata con il Pap test. L'accuratezza della citologia per quanto riguarda la sola infezione da HPV si attesta al 15%. Il prelievo istologico sotto controllo colposcopico si effettua solamente nei casi di sospetta lesione morfologica. Le tecniche per la rilevazione dell'HPV differiscono in sensibilità. L'esperienza del laboratorio è di importanza critica per ottenere risultati attendibili, soprattutto per le tecniche PCR. I metodi tradizionali di diagnosi virale come la microscopia elettronica, la

coltura cellulare e alcuni metodi immunologici, non sono adatti al rilevamento dell'HPV. Questi virus non possono essere coltivati.

Biologia Molecolare

L'HPV test offre un modo per migliorare i programmi di screening per il cervicocarcinoma e ridurre la mortalità per cancro. A tale proposito è stata pubblicata una mole straordinaria di lavori scientifici, tesi a dimostrare l'utilità della ricerca del DNA virale ed il rapporto costo-efficacia di questi test. Le tecniche per la tipizzazione dell'HPV hanno differenti sensibilità. Nella diagnostica di routine si utilizzano:

- Hybrid Capture® II (HC 2)
- Polymerase Chain Reaction (PCR)

Poiché tuttavia la maggior parte delle infezioni da HPV è transitoria e solo l'HPV che esprime attivamente le proteine oncogeniche può causare il cancro della cervice, si sono implementate nuove metodiche atte a ricercare le proteine oncogeniche dell'HPV, E6 ed E7.

Infine l'analisi dettagliata dell'attività molecolare ha permesso di identificare un nuovo biomarcatore che viene iperespresso nelle cellule cervicali displastiche. L'iperespressione dell'inibizione della chinasi ciclino-dipendente p16^{INK4a} nelle cellule displastiche indica un'attiva espressione dell'oncogene virale E7. Una maggiore espressione della proteina p16^{INK4a} può oggi rappresentare un utile biomarcatore per cellule con espressione attivata di oncogeni virali.

Esistono poi i Biochips (microarrays), che non sono entrati nella routine per il costo proibitivo. Ogni chip genico consiste di una fila di pozzetti di 20 micron quadrati su una superficie di silicone di 1,3 cm. In ciascun pozzetto sono contenute sonde di DNA in grado di rivelare la presenza di un gene specifico.

Il problema principale di tutte queste metodiche è

essenzialmente quello di evitare i falsi positivi e di conseguenza l'ansietà delle pazienti¹⁻²³.

Hybrid Capture® (HC 2) test (Digene)

L'HC 2 è un test di ibridazione molecolare in micro-piastra, che identifica due gruppi di genotipi rispettivamente definiti a basso rischio^{6,11,42,43,44} e a rischio intermedio-alto^{16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,68}. La tipizzazione avviene tramite chemiluminescenza, con una soglia di identificazione pari ad 1 picogrammo di DNA virale per ml. L'HC 2 non individua però il singolo tipo virale e la carica virale è calcolata in forma semiquantitativa (tramite un gradiente di intensità di chemiluminescenza). Sono inoltre necessari due prelievi, uno per il Pap test e uno per il test virale. Ha costo elevato. È approvato dalla FDA²⁴⁻³⁴.

Polymerase Chain Reaction

Si è potuto dimostrare che la carica virale determinata con HC 2 non si modifica con l'aumentare della gravità delle lesioni. Oltre a ciò, la carica virale cumulativa misurata con HC 2 in presenza di coinfezioni multiple sovrastima la carica virale tipo-specifica. Viceversa la carica virale determinata con PCR aumenta in modo lineare con l'aumentare del grado della lesione squamosa intraepiteliale.

Il test con PCR si è ultimamente reso disponibile in Italia con due metodiche che identificano i 13 principali genotipi degli HR HPV:

- 1) DuoPap® (con individuazione del singolo tipo virale);
 - 2) AmpliCor® (che non individua il singolo sottotipo).
- Del tutto recentemente è però stato attivato anche un nuovo metodo, il Linear Array® HPV test, che identifica ben 37 genotipi di HPV ad alto e basso rischio, anche individualmente.

1) DuoPap® (Bi-tech)

Abbina la metodica PCR alla citologia su strato sottile. Tipizza i 13 principali genotipi di HPV ad alto rischio: ^{16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,68} (con possibilità di individuazione del singolo tipo virale). La carica virale è determinata con precisione e vi è necessità di un singolo prelievo. Viene fornito tutto il materiale necessario per il prelievo ed il ritiro del campione. I referti sono personalizzati via e-mail oppure on-line. Il costo è contenuto³⁵⁻⁴².

2) AmpliCor® HPV test (Roche)

L'AmpliCor è un test altamente sensibile ed affidabile che tipizza i 13 principali genotipi di HPV ad alto rischio. La "cross-contaminazione" con altri tipi di HPV è risultata pari a zero. Il rilevamento di DNA virale mediante AmpliCor HPV test dovrebbe essere

effettuato entro 21 giorni dal prelevamento del materiale. Un test negativo in presenza di CIN è risultato associato a regressione o persistenza delle lesioni, mai a progressione. L'AmpliCor HPV test si correla bene con il grado delle lesioni associate e la storia naturale della malattia. Questo test è risultato più sensibile rispetto all'HC 2: la presenza di HR HPV è stata confermata nel 33% dei campioni positivi con AmpliCor e negativi con HC 2. In nessuno dei campioni negativi con AmpliCor e positivi con HC 2 sono stati riscontrati HPV ad alto rischio: ciò starebbe ad indicare una falsa positività dell'HC 2. L'AmpliCor è marcato CE. Non individua il singolo sottotipo virale. Il Linear Array® HPV test (Roche) identifica invece il singolo sottotipo virale su 37 genotipi di HPV ad alto e basso rischio. È risultato altamente sensibile su differenti materiali clinici, con un'affidabile e sensibile determinazione delle coinfezioni⁴³⁻⁴⁸.

Le oncoproteine E6 ed E7

Nelle cellule epiteliali germinali in fase di replicazione i geni E6-E7 producono all'inizio un controllo sul ciclo cellulare e sull'apparato mitotico e inducono in seguito una grave instabilità genica, che si manifesta morfologicamente attraverso l'alterazione del rapporto nucleo-citoplasma, anisonucleosi ed ipercromasia. I metodi precedenti, tutti basati sulla ricerca del DNA virale, identificano i genotipi dell'HPV ad alto rischio fino al 20% del totale della popolazione femminile, laddove in realtà i test istologici indicano che solo lo 0,4% delle donne hanno una displasia significativa. La differenza è dovuta al fatto che le infezioni da HPV sono transitorie, con alti livelli di acquisizione e di clearance. Solo l'HPV che esprime attivamente le proteine oncogeniche E6 ed E7, può causare il cancro della cervice. La presenza dell'RNA permette un monitoraggio specifico della produzione e dell'espressione di questi oncogeni virali.

Attraverso il legame e l'induzione di una rapida degradazione della p53, la proteina virale E6 blocca l'attività di repressione, riparazione del DNA e l'azione apoptotica della p53. Attraverso il legame e l'inattivazione della pRb, la proteina virale E7 incrementa la sintesi del DNA e blocca la differenziazione cellulare. Le cellule mancanti della funzionalità di p53 e pRb sono altamente predisposte allo sviluppo del tumore, a causa di una ridotta risposta apoptotica, instabilità genomica ed aumento della proliferazione, tutti segnali di una trasformazione maligna.

L'identificazione tipo-specifica dell'espressione oncogenica dell'HPV eseguita tramite il test "HPV-Proofer", introduce il monitoraggio delle infezioni persistenti dei genotipi virali più fortemente associati allo sviluppo del cervicocarcinoma.

PreTect® HPV-Proofer

Determina l'attività oncogenica (rileva mRNA delle regioni oncogeniche E6/E7 dell'HPV) dei genotipi 16, 18, 31, 33 e 45. Impiega la tecnologia NASBA per una determinazione dell'RNA più specifica e più sensibile. Include un set di primer specifici e sonde con struttura molecular beacon per l'identificazione e la tipizzazione dei genotipi, permettendo così di individuare le pazienti con attiva espressione oncogenica⁴⁹⁻⁵².

La Proteina P16

La p16^{INK4a} è una proteina che interviene nel controllo del ciclo cellulare e che viene iperespressa in cellule cervicali trasformate dagli HPV ad alto rischio. Abbiamo visto come nella patogenesi del cancro cervicale e dei suoi precursori, l'espressione degli oncogeni E6 ed E7 dei tipi virali ad alto rischio sia richiesta per avviare e mantenere il fenotipo trasformato delle cellule epiteliali. L'espressione del gene E7 nelle cellule epiteliali in replicazione comporta la distruzione del complesso pRb-E2F e l'inattivazione funzionale del pRb. Ciò induce una overespressione dell'inibitore chinasi p16^{INK4a} ciclina dipendente in maniera indipendente dal tipo di HPV ad alto rischio. Il gene INK4 è uno dei più frequenti geni oncosoppressori inattivati nel cancro umano. La p16^{INK4a} (inibitore della chinasi ciclina dipendente) è un gene oncosoppressore in grado di prevenire la fosforilazione della pRb, bloccando così la cellula in fase G1. Quando l'oncoproteina E7 lega la pRb viene rilasciato il fattore trascrizionale E2F permettendo alla cellula di procedere dalla fase G1 alla fase S: divisione cellulare. Nelle cellule normali la p16^{INK4a} non è determinabile con metodiche immunoistochimiche. In poche cellule tuttavia, specialmente nella metaplasia squamosa, questa proteina può essere espressa fisiologicamente durante il processo di trans-differenziazione. In immunoistochimica gli stadi di differenziazione cellulare "displasia" e "metaplasia" sono caratterizzati da differenti espressioni di p16^{INK4a} rispettivamente "diffuso" e "localizzato". In citologia queste differenze di colorazione non possono ovviamente essere rilevate. Nel cancro della cervice l'inattivazione della pRb è mediata dal legame dell'oncoproteina E7 dell'HPV ad alto rischio alla pRb. Dal momento che l'espressione della p16^{INK4a} è sottoposta ad un controllo di feedback negativo da parte della pRb funzionante, l'iperespressione rappresenta un utile biomarcatore per cellule in cui vi è un'intensa espressione degli oncogeni HPV.

CINtec™ p16^{INK4a} Kit Citologico (DakoCytomation)

Nelle cellule displastiche ed in proliferazione la p16^{INK4a} è fortemente espressa e quindi facilmente identificabile con metodi immunoistochimici. Il kit

CINtec™ p16^{INK4a} per citologia è progettato per l'utilizzo su campioni citologici preparati in modo convenzionale o su strato sottile. I reagenti contenuti nel kit sono ottimizzati per l'utilizzo su campioni citologici ed il sistema di rivelazione si basa sulla tecnologia del polimero di destrano al quale sono legati gli anticorpi secondari. I controlli di qualità garantiscono un'elevata standardizzazione e riproducibilità della metodica⁵³⁻⁶².

Conclusioni

L'impiego clinico dell'HPV DNA test è stato valutato per le seguenti indicazioni:

- 1) nello screening primario del cancro cervicale nelle donne? 30 anni in aggiunta alla citologia
- 2) nella gestione dei risultati citologici dubbi (ASCUS)
- 3) nel follow-up delle lesioni squamose intraepiteliali di basso e medio grado (CIN 1-2), per predirne la regressione, la persistenza o la progressione
- 4) dopo trattamento per displasia cervicale.

L'esecuzione annuale del Pap test è valida per diagnosticare le lesioni cervicali neoplastiche preinvasive e il cancro cervicale nei suoi stadi più precoci. L'HPV test può essere utile nei casi in cui un Pap test risulti positivo per lesioni dubbie o di basso grado, per la sua capacità di predire le lesioni cervicali di alto grado. Questa strategia incrementa la sensibilità dello screening citologico, senza la necessità di inviare tutte le donne con anomalie citologiche minori all'esame colposcopico. L'impiego del test in Italia è attualmente limitato dal costo eccessivo. Pertanto l'utilizzo che può essere auspicato fin da oggi è quello relativo al follow-up di pazienti trattate per pregressa lesione di alto grado, considerando anche che il numero di questi casi è limitato ed al contrario in questo gruppo è molto più frequente il cancro invasivo (per cui anche il rapporto costo-efficacia può essere considerato favorevole). Nuove prospettive si aprono con il sempre crescente utilizzo della citologia su strato sottile in sostituzione di quella convenzionale: tale metodica, consentendo di effettuare il test in caso di citologia dubbia o di basso grado senza che la paziente debba tornare alla visita, permetterà di avere anche un più favorevole rapporto costo-efficacia, ampliandone così l'utilizzo nella routine clinica. Infine in un prossimo futuro, il test potrebbe venire ulteriormente valorizzato dall'avvento di strategie vaccinali su vasta scala.

Ulteriori studi sono necessari per validare l'impiego dei test di ultima generazione (oncoproteine E6/E7, proteina p16).

Bibliografia

- Beutner KR et al. Human Papillomavirus and Human Disease. *Am J Med* 1997; 102(5A):9-15.
- Walboomers JM et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189:12-9.
- Bosch FX et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002;55: 244-65.
- Black RJ et al. Cancer incidence and mortality in the European Union: cancer registry data and estimates of national incidence for 1990. *Eur J Cancer* 1997; 33:1075-107.
- Bosch FX et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:796-802.
- Chamberlain J. Reasons that some screening programs fail to control cervical cancer. In: *Screening for Cancer of the Uterine Cervix (IARC Scientific Publications No. 76)*, pp. 161-168. Hakama M, Miller AB, Day NE, eds., IARC Scientific Publications, Lyon, 1992.
- Cuzick J. Time to consider HPV testing in cervical screening. *Ann Oncol* 2001; 12(11):1511-4.
- Manos MM et al. Identifying women with cervical neoplasia: using human papillomavirus DNA testing for equivocal Papanicolaou results. *JAMA* 1999; 281(17):1605-10.
- Schiffman M et al. HPV DNA testing in cervical cancer screening. Results from women in a high-risk province of Costa Rica. *JAMA* 2000; 283:87-93.
- Solomon D et al. Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: baseline results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 2001 Feb 21; 93(4):293-9.
- Solomon D et al. ASCUS LSIL Triage Study (ALTS) conclusions reaffirmed: response to a November 2001 commentary. *Obstet Gynecol* 2002; 99:671-4.
- Wright TC Jr et al. Reflex human papillomavirus deoxyribonucleic acid testing in women with abnormal Papanicolaou smears. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178:962-6.
- European Society for Infectious Diseases in Obstetrics and Gynaecology. Recommendations for the diagnosis and treatment of HPV infections of the female tract. *ESIDOG Journal* vol. 4+5 – Supplement 2/2001.
- Livengood Ch, Hoyme UB. *IDSOG Task Team Report: Management of genital human papillomavirus (HPV) infection*. 2000.
- Lin CT et al. Value of human papillomavirus deoxyribonucleic acid testing after conization in the prediction of residual disease in the subsequent hysterectomy specimen. *Am J Obstet Gynecol* 2001 Apr; 184(5):940-5.
- Lorincz AT et al. Viral load of human papillomavirus and risk of CIN3 or cervical cancer. *Lancet* 2002 Jul 20;360(9328):228-9.
- Nobbenhuis MA et al. Addition of high-risk HPV testing improves the current guidelines on follow-up after treatment for cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 2001 Mar 23; 84(6):796-801.
- Nobbenhuis MA et al. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. *Lancet* 1999; 354(9172):20-5.
- Sherman ME et al. Baseline cytology, human papillomavirus testing, and risk for cervical neoplasia: a 10-year cohort analysis. *J Natl Cancer Inst* 2003 Jan 1; 95(1):46-52.
- Wright TC et al. 2001 consensus guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities and cervical cancer precursors: Part I: Cytological abnormalities. *JAMA* 2002;284.
- Wright TC et al. for the 2001 ASCCP-sponsored Consensus Conference. American Society of Colposcopy and Cervical Pathology. Consensus Guidelines: Guidelines Management of Women with Cytological Abnormalities. *JAMA* 2002; 287:2120-2129.
- Wright TC et al. 2001 Consensus Guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189:295-304.
- Ho GY et al. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998; 338(7):423-8.
- Clavel C et al. Hybrid Capture II-based human papillomavirus detection, a sensitive test to detect in routine high-grade cervical lesion: a preliminary study on 1518 women. *Br J Canc* 1999; 80(9):1306-11.
- Liaw KL et al. Detection of human papillomavirus DNA in cytologically normal women and subsequent cervical squamous intraepithelial lesions. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91:954-60.
- Lorincz AT et al. Human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cytology in cervical screening programs. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127:959-68.
- Bory JP et al. Recurrent human papillomavirus infection detected with the hybrid capture II assay selects women with normal cervical smears at risk for developing high grade cervical lesions: a longitudinal study of 3.091 women. *Int J Cancer* 2002; 102(5):519-25.
- Sellors JW et al. Prevalence and predictors of human papillomavirus infection in women in Ontario, Canada. Survey of HPV in Ontario Women (SHOW) Group. *CMAJ* 2000; 163(5):503-8.
- Sellors JW et al. Prevalence of infection with carcinogenic human papillomavirus among older women. *CMAJ* 2002; 167(8):871-3.
- Petry KU et al. Inclusion of HPV testing in routine cervical cancer screening for women above 29 years in Germany: results for 8466 patients. *BJC* 2003; 88(10):1570-7.
- Saslow D et al. American Cancer Society guideline for the early detection of cervical neoplasia and cancer. *CA Cancer J Clin* 2002; 52(6): 342-62.
- Melkert PW et al. Prevalence of HPV in cytomorphologically normal cervical smears, as determined by the polymerase chain reaction, is age-dependent. *Int J Cancer* 1993; 53(6):919-23.
- Recommendations for the Diagnosis and Treatment of HPV Infections of the Female Tract. *European Journal for Infectious and Immunological Diseases in Obstetrics and Gynaecology*, February 2001.
- Conclusions: Cervical Cancer Control, Priorities and New Directions. International Charter. European Research Organization on Genital Infection and Neoplasia, April 2003.
- Munoz N et al. International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *N Engl J Med* 2003; 348(6):518-27.
- Richardson H et al. The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12(6):485-90.
- Dalstein V et al. Persistence and load of high-risk HPV are predictors of development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. *Int J Cancer* 2003; 106(3):396-403.
- Schlecht NF et al. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA* 2001; 286(24):3106-14.
- Moberg M et al. Real-time PCR-based system for simultaneous quantification of human papillomavirus types associated with high risk of cervical cancer. *Clin Microbiol* 2003; 41(7):3221-8.
- Schlecht NF et al. Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 2003; 103(4):519-24.

41. Schiffman M et al. Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study Group. Human papillomavirus DNA remains detectable longer than related cervical cytologic abnormalities. *J Infect Dis* 2002; 186(8):1169-72.
42. Gravitt PE et al. A Comparison between Real-Time Polymerase Chain Reaction and Hybrid Capture 2 for Human Papillomavirus DNA Quantitation. *Cancer Epidemiol, Biomarkers & Prev* 2003; 12(6):477-84.
43. Bohmer G et al. No confirmed case of human papillomavirus DNA-negative cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or invasive primary cancer of the uterine cervix among 511 patients. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189:118-20.
44. Petry KU et al. Factors associated with an increased risk of prevalent and incident grade III cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer among women with Papanicolaou tests classified as grades I or II cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186:28-34.
45. Remmink AJ et al. The presence of persistent high-risk HPV genotypes in dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease: natural history up to 36 months. *Int J Cancer* 1995; 61:306-11.
46. Rozendaal L et al. PCR-based high-risk HPV test in cervical cancer screening gives objective risk assessment of women with cytologically normal cervical smears. *Int J Cancer* 1996; 68:766-9.
47. Gravitt PE et al. Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization, reverse line blot detection method. *J Clin Microbiol* 1998; 36:3020-7.
48. Gravitt PE et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 2000; 38:357-61.
49. Kjær SK et al. Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study. *BMJ* 2002; 325(7364):572.
50. Deiman B et al. Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). *Mol Biotechnol* 2002; 20(2):163-79.
51. Lie K. Presentation. Twentieth International Papillomavirus Conference. Institut Pasteur, Paris, October 4-9, 2002.
52. Welters MJ et al. Frequent display of human papillomavirus type 16 E6-specific memory t-Helper cells in the healthy population as witness of previous viral encounter. *Cancer Res* 2003 Feb 1; 63(3):636-41.
53. Klaes R 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.
54. Sano T et al. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol* 1998; 153:1741-8.
55. Sano T et al. Immunohistochemical overexpression of p16 protein associated with intact retinoblastoma protein expression in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Int* 1998; 48:580-5.
56. Agoff SN et al. p16^{INK4a} expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Mod Pathol* 2003; 16:665-73.
57. Khleif SN et al. Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:4350-4.
58. Li Y et al. Transcriptional repression of the D-type cyclin-dependent kinase inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product pRb. *Cancer Res* 1994; 54:6078-82.
59. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:690-8.
60. Yoshida T et al. 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 Apr 25; 102(2):100-8.
61. Tringler B et al. Evaluation of p16^{INK4a} and pRb expression in cervical squamous and glandular neoplasia. *Hum Pathol* 2004 Jun; 35(6):689-96.
62. Akpolat I et al. The utility of p16^{INK4a} and Ki-67 staining on cell blocks prepared from residual thin-layer cervicovaginal material. *Cancer* 2004 Jun 25; 102(3):142-9.