



Brazilian Journal of
OTORHINOLARYNGOLOGY

www.bjorl.org.br



ARTIGO ORIGINAL

Histologic correlation of expression of Ki-67 in squamous cell carcinoma of the glottis according to the degree of cell differentiation[☆]

Rodrigo Gonzalez Bonhin^{a,*}, Guilherme Machado de Carvalho^a,
Alexandre Caixeta Guimarães^a, Carlos Takahiro Chone^a, Agrício Nubiato Crespo^a,
Albina Messias de Almeida Milani Altemani^b, Eliane M.I. Amstalden^b

^aDisciplina de Otorrinolaringologia, Cabeça e Pescoço, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

^bDepartamento de Anatomia Patológica, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

Recebido em 9 de fevereiro de 2013; aceito em 11 de março de 2014

KEYWORDS

Carcinoma, squamous cell;
Glottis;
Biological markers;
Cell proliferation;
Head and neck neoplasms

Abstract

Introduction: Squamous cell carcinoma is the most common neoplasm of the larynx and glottis, and its prognosis depends on the size of the lesion, level of local invasion, cervical lymphatic spread, and presence of distant metastases. Ki-67 (MKI67) is a protein present in the core, whose function is related to cell proliferation.

Aim: To evaluate the expression of marker Ki-67 in squamous cell carcinoma of the larynx and glottis and its correlation to pathological findings.

Methods: Experimental study with immunohistochemistry analysis of Ki-67, calculating the percentage of the cell proliferation index in glottic squamous cell carcinomas.

Results: 16 cases were analyzed, with six well-differentiated and ten poorly/moderately differentiated tumors. There was a correlation between cell proliferation index and degree of cell differentiation, with higher proliferation in poorly/moderately differentiated tumors.

Conclusion: The cell proliferation index, as measured by Ki-67, may be useful in the characterization of histological degree in glottic squamous cell tumors.

© 2014 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

DOI se refere ao artigo: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjorl.2014.05.016>

[☆]Como citar este artigo: Bonhin RG, de Carvalho GM, Guimarães AC, Chone CT, Crespo AN, Altemani AM, et al. Histologic correlation of expression of Ki-67 in squamous cell carcinoma of the glottis according to the degree of cell differentiation. Braz J Otorhinolaryngol. 2014;80:290-5.

*Autor para correspondência.

E-mail: bonhin@yahoo.com (R.G. Bonhin).

PALAVRAS-CHAVE

Carcinoma de células escamosas;
Glote;
Marcadores biológicos;
Proliferação de células;
Neoplasias de cabeça e pescoço

Correlação histológica da expressão do Ki-67 no Carcinoma Epidermoide Glótico de acordo com grau de diferenciação celular

Resumo

Introdução: O carcinoma de células escamosas é a neoplasia mais frequente da laringe e da região glótica, seu prognóstico depende do tamanho da lesão, do nível de invasão local, disseminação cervical linfática e da existência de metástases à distância. Ki-67(MKI67) é uma proteína presente no núcleo, cuja função está relacionada com a proliferação celular.

Objetivos: Avaliar a expressão do marcador Ki-67 em carcinoma de células escamosas da laringe glóticos e correlacionar sua expressão com os achados anatomopatológicos.

Método: Trabalho experimental de análise imunohistoquímica do Ki 67 através do cálculo percentual do índice de proliferação celular em produtos de carcinomas epidermóides glóticos.

Resultados: Dezesesseis casos foram analisados, sendo seis bem diferenciados e dez pouco/moderadamente diferenciados. Houve correlação entre o índice de proliferação celular e o grau de diferenciação celular, sendo a proliferação maior nos pouco/moderadamente diferenciados.

Conclusão: O índice de proliferação celular, medido pelo Ki-67 pode ser útil na caracterização do grau histológico em tumores glóticos de células escamosas.

© 2014 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

Introdução

O carcinoma de células escamosas é a neoplasia mais frequente da laringe e da região glótica e seu prognóstico depende do tamanho da lesão, do nível de invasão local, disseminação cervical linfática e existência de metástases à distância.¹⁻⁵ O comportamento do carcinoma de células escamosas é marcado pelo grau de proliferação e diferenciação celular e este índice pode ser inferido pela medida do Ki-67.⁶⁻¹⁰

Histologicamente, o carcinoma epidermoide ou escamocelular destas regiões é semelhante ao das outras. É definido pela proliferação neoplásica de células escamosas em diferentes graus de diferenciação e pelo caráter infiltrativo. Na dependência do poder de queratinização e atipias celulares são graduados em: bem, moderado ou pouco diferenciado.¹

O bem diferenciado se caracteriza pela semelhança com o epitélio escamoso normal; alto poder de corneificação e atipias celulares muito leves; o moderadamente diferenciado contém pleomorfismo nuclear distinto, atividade mitótica presente, incluindo figuras atípicas. Neste a queratinização é bem menor.^{1,2}

No pouco diferenciado predominam células imaturas, com numerosas figuras de mitose e queratinização, praticamente, ausente. Em relação ao nível de invasão, poder estar limitado ao epitélio, respeitando a lâmina basal, denominado *in situ*. Quando compromete apenas a lâmina própria, é considerado microinvasor ou superficialmente invasivo.²

Já o carcinoma francamente invasivo se manifesta pela destruição da lâmina basal, com extensão notória para os tecidos subjacentes, podendo ser acompanhado de reação estromal. Invasão perineural e angiolinfática são sinais de maior agressividade e mudança do estadiamento, respectivamente.³

Broders propôs um método para graduação do carcinoma de células escamosas.^{11,12} A classificação estabelecida em 1920 e, posteriormente, revisada em 1925 baseou-se no

Tabela 1 Classificação de Broders

Classificação histológica de Broders

Parâmetro	Características
Grau I	0 a 25% de células indiferenciadas
Grau II	25% a 50% de células indiferenciadas
Grau III	50% a 75% de células indiferenciadas
Grau IV	75% a 100% de células indiferenciadas

princípio fundamental de diferenciação celular, sendo totalmente dissociada da história clínica. Os carcinomas foram divididos em quatro graus, variando de I a IV. Carcinomas grau I apresentavam até 25% de células indiferenciadas. Aqueles de grau II possuíam de 25% a 50% de indiferenciação. Os de grau III apresentavam células indiferenciadas ocupando de 50% a 75% do tumor e naqueles de grau IV, observava-se indiferenciação de 75% a 100% do tumor (tabela 1).^{11,12}

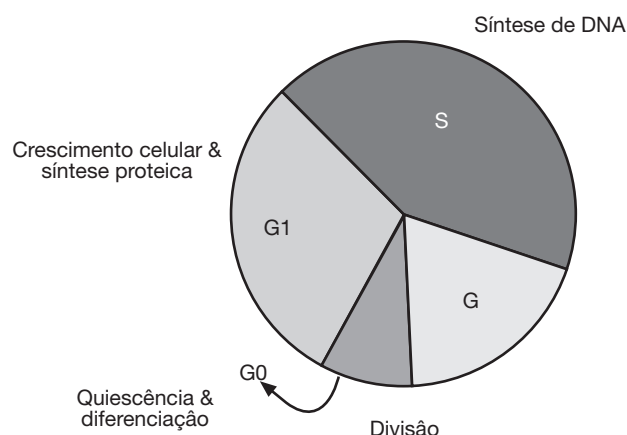
A classificação histopatológica de malignidade proposta pela OMS (Organização Mundial da Saúde, 2005) baseou-se no grau de diferenciação celular e permitiu o agrupamento dessa neoplasia maligna em três categorias, em bem, moderadamente e pouco diferenciados (tabela 2).^{2,11-13}

O bem diferenciado se caracteriza pela semelhança com o epitélio escamoso normal; alto poder de corneificação e atipias celulares muito leves; o moderadamente diferenciado contém pleomorfismo nuclear distinto, atividade mitótica presente, incluindo figuras atípicas. Neste a queratinização é bem menor.²

No pouco diferenciado predominam células imaturas, com numerosas figuras de mitose e queratinização, praticamente, ausente. Em relação ao poder de invasão, poder estar limitado ao epitélio, respeitando a lâmina basal, denominado *in situ*. Quando compromete apenas a lâmina própria, é considerado microinvasor ou superficialmente invasivo.²

Tabela 2 Classificação recomendada pela OMS

Classificação histológica - OMS	
Parâmetro	Características
Pouco diferenciado	Predomínio de células imaturas Numerosas mitoses típicas e atípicas Mínima queratinização
Moderadamente diferenciado	Certo grau de pleomorfismo e atividade mitótica Pouca queratinização
Bem diferenciado	Arquitetura tecidual semelhante ao padrão normal do epitélio escamoso

**Figura 1** Fases do ciclo celular. G1, S, G - presença de MKI67.

Já o carcinoma francamente invasivo se manifesta pela destruição da lâmina basal, com extensão notória para os tecidos subjacentes, podendo ser acompanhado de reação estromal. Invasão perineural e angiolinfática são sinais de maior agressividade e mudança do estadiamento, respectivamente.³

A mensuração das figuras de mitose, prática comum na avaliação de neoplasias quanto à sua velocidade de crescimento e grau de agressividade, está longe da sua acurácia desejada, visto que, não é possível saber, através de cortes histológicos de rotina corados pela H&E, quais são exatamente as células que entraram no ciclo de divisão celular. Isto se deve ao fato de que as fases: G1, S e G2, do ciclo celular, não serem identificadas na microscopia óptica (fig. 1).¹²

Ki-67(MKI67) é uma proteína presente no núcleo, cuja função está relacionada com a proliferação celular. Esta proteína somente é expressa no ciclo de divisão celular: na interfase (G1, S, G2); prófase; metáfase; anáfase e telófase, e está ausente na fase G0, quando a célula está quiescente, portanto, é um excelente marcador de divisão celular.¹¹⁻¹⁴

Para evidenciar a expressão desta proteína nuclear é utilizado o Anticorpo monoclonal Ki-67. Este anticorpo se liga ao seu antígeno-específico (MKI67) presente nos núcleos das células em proliferação, corando-os e evidenciando todas as células que entraram no ciclo de divisão.^{12,13}

Através da microscopia óptica é possível contar o número de células por campo ou áreas *hot spots*, que estão cora-

das, e calcular o Índice de proliferação (Ki-67 INDEX). A análise deste índice é o que nos permite caracterizar o grau de proliferação celular tumoral (taxa de crescimento) e, conseqüentemente, o seu grau de agressividade, maior risco de novos clones tumorais, mutações, o que dificulta a restrição do tumor pelo sistema imunológico.^{12,13}

Este estudo tem como objetivos avaliar a expressão do marcador Ki-67 em Carcinoma de células escamosas da laringe glóticas, e correlacionar quanto aos achados anatomicopatológicos e proliferação celular.

Materiais e métodos

Trata-se de um estudo clínico experimental realizado com um corte transversal em uma coorte histórica, através de estudo de materiais provenientes de cirurgias de ressecção de carcinoma de células escamosas de glote de pacientes de hospital universitário terciário especializado. Os procedimentos realizados pelos pacientes foram hemi-laringectomias, laringectomias totais, e retirada das cordas vocais com respectivas linfadenectomias.

Para facilitar a análise estatística os tumores glóticos foram divididos em bem diferenciados e moderadamente/pouco diferenciados.

Foram levantados os casos de tumores de carcinoma de células escamosas em gloteno banco de dados do acervo do Departamento de Anatomia Patológica de um hospital universitário terciário, no período de 1994 a 2004. Nesta amostra encontramos 99 casos no total. 85 casos eram de tumores moderadamente/pouco diferenciados, sendo 41 casos produtos de peças cirúrgicas e 44 casos de biópsias que foram tratados de forma não cirúrgica (quimio/radioterapia). 14 casos eram de tumores bem diferenciados, sendo oito casos produtos de peças cirurgias, e seis casos de biópsia que foram tratados de forma não cirúrgica (quimio/radioterapia).

Para o estudo foram utilizados somente casos que eram produtos de peças cirúrgicas, excluídos casos de biópsias, que por se tratar de fragmentos aleatórios do tumor, trariam viés ao estudo. Dos oito casos bem diferenciados produtos de peças cirúrgicas, dois casos não tinham seus blocos de parafina disponíveis para novos cortes.

Desta forma o estudo foi realizado com seis casos de tumores glóticos de laringe do tipo bem diferenciado, e separado 10 casos de tumores glóticos de laringe do tipo moderadamente/pouco diferenciado aleatoriamente para montar o grupo comparativo. Os grupos não tiveram o mesmo número de casos, pois no banco analisado não foram encontrados casos suficientes para completar o grupo que continha tumores bem diferenciados.

Os critérios de inclusão utilizados foram: tumores glóticos de laringe cujos blocos de parafina foram localizados e continham material suficiente para novos cortes. Os dados clínicos e o estadiamento tumoral foram obtidos a partir dos prontuários (tabela 3).

O trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da instituição (nº 485/11).

Para os exames imunohistoquímicos foi utilizado método avidina-biotina-peroxidase e utilizou-se o seguinte anticorpo: Ki-67 (Clone MIB-1, IgG1, 1:150, marca Dako, pré tratado com Tris-EDTA).

Tabela 3 Dados clínicos dos pacientes em estudo

Dados clínicos	Grupo 1	Grupo 2	Obs
TNM	T1N0M0 - 4 casos T2N0M0 - 1 caso T3N0M0 - 1 caso	T1N0M0 - 3 casos T2N0M0 - 5 casos T2N1M0 - 1 caso T3N0M0 - 1 caso	
Etilismo	50 % (3 casos)		
Tabagismo	67% (4 casos)		
Sexo	4 M : 2 F	10 M : 0 F	
Idade	53 (37-73)	58 (39-70)	
Pescoço clínico pré op	Negativo	1 caso positivo (N1)	
Margens	50% positivo	100% negativo	
Invasão vascular	100% negativo	80% negativo	2 casos +
Acometimento neural	100% negativo	90% negativo	1 caso +
Extensão extracapsular	100% negativo	100% negativo	
Radioterapia pré op	0 casos	1 caso	
Radioterapia pós op	50 % (3 casos)	20% (2 casos)	
Quimioterapia pré op	0 casos	0 casos	
Quimioterapia pós op	0 casos	0 casos	
Total	6 pacintes	10 pacientes	

Grupo 1, CEC glótico bem diferenciados; Grupo 2, CEC glótico moderadamente/pouco diferenciados; Pré-op, pré-operatório; Pós-op, pós-operatório.

Foram feitos controles positivos e negativos do marcador, com a finalidade de compará-los com os casos estudados. Como controle positivo utilizou-se tecido linfoide.

A leitura das lâminas foi feita de forma randomizada, por um investigador que não tinha o conhecimento do diagnóstico prévio dado pelo patologista, e nem o conhecimento do status clínico do paciente, de forma comparativa com os controles positivos e negativos. Fotografias digitalizadas em grande aumento (400×) foram feitas das áreas altamente reativas (*Hot spots*), com a utilização de máquina fotográfica Nikon COOLPIX Câmera 995. Após isso, as imagens foram enviadas ao computador para análise histológica que utilizou o *software* Imagelab 2000.

Todos os parâmetros foram avaliados de forma cega.

A avaliação da taxa de proliferação celular foi feita utilizando-se razão percentual comum, como já é utilizado na literatura.^{8,9} Foram selecionadas cinco áreas de maior intensidade de expressão do imunomarcador (*hot spots*). Contado no mínimo 500 células, e feita a relação do número de células que apresentam seu núcleo positivamente corado com o número total de células contadas. A relação percentual foi estratificada da seguinte maneira: < 5% - baixa taxa de proliferação celular; entre 5% e 10% - leve taxa de proliferação celular; entre 10%-30% - moderada taxa de proliferação celular; > 30% - alta taxa de proliferação celular.

Para simplificação e melhor analisar os dados, estes foram agrupados da seguinte forma:

Índice de proliferação celular:

Baixa e leve proliferação celular

Moderada e alta proliferação celular

Tipo histológico:

Glótico bem diferenciado

Glóticos moderadamente/pouco diferenciados

Análise estatística

Após agrupamento dos dados, foram feitas as análises estatísticas com o *software* IBM SPSS Statistics® utilizando teste de Qui-Quadrado e Teste Exato de Fisher.

Resultados

Foram avaliados 16 casos no total, sendo seis casos bem diferenciados e 10 casos moderadamente/pouco diferenciados.

Entre os tumores glóticos bem diferenciados (n = 6 casos), quatro casos tiveram baixa/leve proliferação celular e dois casos tiveram moderada/alta proliferação celular. Nos tumores glóticos moderadamente/pouco diferenciados (n = 10 casos), um caso teve baixa/leve proliferação celular e nove casos tiveram moderada/alta proliferação celular.

Na análise de correlação de grau de diferenciação celular *versus* o índice de proliferação celular houve uma significância estatística ($p < 0,05$) na comparação entre os grupos sendo o teste exato de Fischer bi-caudal com $p = 0,036$.

Considerando o tipo histológico como padrão ouro para se avaliar a diferenciação celular nos carcinomas de laringe, o índice de proliferação celular apresentou sensibilidade de 0,9; especificidade de 0,67; valor preditivo positivo de 0,82 e valor preditivo negativo de 0,8 (tabela 4).

Discussão

O índice de proliferação celular mostrou correlação positiva com o grau de diferenciação celular, sendo maior nos

Tabela 4 Distribuição dos casos de acordo com o tipo histológico e o índice de proliferação celular

	Tipo histológico		Total
	Bem diferenciados	Moderadamente/Pouco diferenciados	
<i>Ki-67</i>			
Baixa /leve	4	1	5
Moderada/alta	2	9	11
<i>Total</i>	6	10	16

casos moderadamente/pouco diferenciados. Este achado corrobora a ideia de que quanto mais indiferenciada é a neoplasia, menor é o seu controle do processo de divisão celular e maior é a sua proliferação.⁸ Nesta avaliação houve significância estatística entre a correlação dos tipos tumorais e o índice de proliferação celular ($p < 0.05$).

Nos estudos de Rodrigues et al., não encontraram correlação entre a imuno expressão do Ki67 e valor prognóstico,^{7,14,15} porém, a super expressão do Ki-67 associado a ideia de descontrole mitótico, crescimento e proliferação celular descontrolada não estariam associados a fatores prognósticos e priorização de abordagem destes pacientes?

Fato interessante apontado em estudo retrospectivo canadense, sobre a utilização clínica do Ki-67, evidencia que a super expressão do Ki-67 se correlaciona com um alto risco de recorrência cervical após tratamento com radioterapia, sendo assim, tais casos deveriam ter tratamento em estágios mais precoces e direcionados.¹⁶

Outros sítios tumorais da região de cabeça e pescoço, como a cavidade oral, também têm evidências que a super expressão de marcadores como o p53 e o Ki-67 configuram uma situação de maior risco e pior prognóstico ao esse tipo de carcinoma escamoso.¹⁷

Em estudo com animais expostos a tabaco foi observado apenas o desenvolvimento de lesões benignas e nenhuma evolução para tumores malignos. Na avaliação histológica desses animais foi observada uma ausência de marcação pelo p53, porém foi notada uma positividade do Ki-67 relacionado com a lesão pelo tabaco.¹⁸

Na avaliação do prognóstico clínico de pacientes com carcinomas epidermóides de laringe, foi observado que o marcador Ki67 associado ao Ki-S11 é uma ferramenta importante de auxílio na abordagem clínica e na análise do prognóstico. Os pacientes com baixa taxa de proliferação celular avaliada por esses marcadores tiveram uma menor taxa de recorrências, com significância estatística ($p < 0,05$) e com uma melhor sobrevida em 5 anos comparado ao grupo com alta taxa de proliferação celular.¹⁹

Para aplicação clínica do Ki-67 ainda foi demonstrado que o grupo de pacientes com sua expressão considerada positiva teve maior taxa de recorrência local, mesmo após a radioterapia. É sugerido que esses pacientes tenham um protocolo de seguimento personalizado e mais por menorizado.¹⁶ Porém em outro grupo de pacientes avaliados, foi identificado que tumores glóticos que acometem a comissura anterior e que apresentam super expressão do Ki-67 tiveram um desempenho melhor e tiveram seus tumores considerados como radio sensíveis, com relevância significativa dos resultados.²⁰

A literatura também aponta a metodologia empregada na avaliação anatomopatológica de carcinomas epidermóides de laringe avançado. No estudo citado foi demonstrada uma heterogeneidade na expressão do Ki-67 em áreas de atividade tumoral celular, portanto uma metodologia da avaliação deve ser bem estabelecida e a variabilidade de estudos prévios que correlacionam a expressão dos imunomarcadores com fatores prognósticos pode ser explicada por tal característica.²¹

A avaliação de lesões precursoras de carcinomas (hiperplasias, carcinoma *in situ*) também foram estudos com os imunomarcadores como o Ki-67 e o p-16. Destas lesões o carcinoma *in situ* tende a ter maior positividade do que as hiperplasias isoladas.²²

Apesar de termos encontrado correlação significativa entre o índice de proliferação celular e o grau diferenciação histológica do tumor, houve dois casos (18%) em que o índice de proliferação celular foi moderado/alto mesmo em tumores bem diferenciados. Considerando que mesmos alguns tumores bem diferenciados apresentaram alto índice de proliferação celular, possivelmente estes tumores apresentam comportamento mais agressivo, pois como aumento populacional de células tumorais é grande a chance de haver descontrole mitótica é maior. Novos clones que podem ser mais agressivos por mutações, e dificuldade de restrição pelo sistema imunológico, podem ter melhor resposta a quimioterapia e radioterapia. Consideramos que futuros trabalhos para avaliar o comportamento de tumores bem diferenciados com alto índice de proliferação celular poderão auxiliar no manejo destes pacientes.

Vale ressaltar que apesar de nosso estudo ter tido um n de 16 pacientes, limitado por dificuldade da obtenção de material cirúrgico de casos glóticos bem diferenciados, enfatizou o estudo nesta região específica da laringe, diferente de outros estudos com n maiores que envolveram pacientes com carcinoma de qualquer região da laringe. Portanto nosso estudo corrobora a correlação da expressão maior do Ki-67 em tumores mais indiferenciados,⁸ e demonstra que esta correlação também se aplica especificamente para os tumores glóticos de laringe.

Acreditamos que a relação entre a expressão do Ki-67 com critérios clínicos e prognósticos ainda não é clara. Essa relação ainda apresenta bastantes controvérsias na literatura médica mundial, tanto em estudos clínicos quanto experimentais. A relevância da utilização de imunomarcadores é evidente, porém outros estudos são necessários para definir melhor em quais pacientes os imunomarcadores devem ser utilizados na prática clínica.

Conclusão

Este estudo demonstrou que o índice de proliferação celular, medido pelo Ki-67 pode ser útil na caracterização do grau histológico em tumores glóticos de células escamosas da laringe. Outros estudos são necessários para avaliar o comportamento de tumores bem diferenciados com alto índice de proliferação celular para definir a melhor conduta terapêutica nestes pacientes. Outros fatores devem estar implicados quanto à patogênese e progressão tumoral desta doença na glote.

Financiamento

Financiado pelo PIBIC/CNPq.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

1. Altmani AMAM, Amstalden EMI. Em: Bogliolo. Patologia. 8ª ed. Guanabara Koogan; 2009.
2. Em: Diagnostic histopathology of tumors. 3ª ed. Elsevier; 2007. p 158-65.
3. Em: Sternberg's. diagnostic surgical pathology. 5ª ed. Wolters Kluwerhealth/Lippincott William & Wilkins; 2009. p. 777-92.
4. Cardesa A, Gale N, Nadal A, Zidar N. Em: Pathology and genetics of head and neck tumors (WHO/OMS). IARC Press; 2005. p. 118-21.
5. Carvalho GM, Chone CT, Guimarães AG, Kohler HF, Gripp FM, Crespo AN, et al. Planned neck dissection: evaluation of viable metastases. *Rev Bras Cir Cabeça Pescoço*. 2011;40:133-7.
6. Mohan S, Epstein JB. Carcinogenesis and cyclooxygenase: the potential role of COX-2 inhibition in upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol*. 2003;39:537-46.
7. Rodrigues RB, Motta RR, Machado SMS, Cambruzzi E, Zettler EW, Zettler CG, et al. Prognostic value of the immunohistochemistry correlation of Ki-67 and p53 in squamous cell carcinomas of the larynx. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2008;74:855-9.
8. Ashraf MJ, Maghbul M, Azarpira N, Khademi B. Expression of Ki67 and P53 in primary squamous cell carcinoma of the larynx. *Indian J Pathol Microbiol*. 2010;53:661-5.
9. Haroon S, Hashmi AA, Khurshid A, Kanpurwala MA, Mujuba S, Malik B, et al. Ki67 index breast cancer: Correlation with other prognostic markers and potential in Pakistani patients. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14:4353-8.
10. Boonkitticharoen V, Kulapaditharom B, Leopairut J, Kraiphibul P, Larbcharoensub N, Cheewaruangroj W, et al. Vascular endothelial growth factor A and proliferation marker in prediction of lymph node metastasis in oral and pharyngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008;134:1305-11.
11. Broders AC. The microscopic grading of cancer. *Surg Clin North Am*. 1941;21:947-62.
12. Lourenço SQC, Schueler AF, Camisasca DR, Lindenblatt RC, Bernardo VG. Histological classifications of oral squamous cell carcinoma: a review of the proposed systems. *Rev Bras Cancerol*. 2007;53:325-33.
13. Ward LS. Entendendo o processo molecular da tumorigênese. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2002;46:351-60.
14. Bubán T, Tóth L, Tanyi M, Kappelmayer J, Antal-Szalmás P. Ki-67 - new faces of an old player. *Orv Hetil*. 2009;150:1059-70.
15. Calli C, Calli A, Pinar E, Oncel S, Tatar B. Prognostic significance of p63, p53 and ki67 expression in laryngeal basaloid squamous cell carcinomas. *B-ENT*. 2011;7:37-42.
16. Nichols AC, Whelan F, Basmaji J, Dhaliwal S, Dowthwaite S, Chapeskie C, et al. Ki-67 expression predicts radiotherapy failure in early glottic cancer. *J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2012;41:124-30.
17. Motta Rda R, Zettler CG, Cambruzzi E, Jotz GP, Berni RB. Ki - 67 and p53 correlation prognostic value in squamous cell carcinomas of the oral cavity and tongue. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2009;75:544-9.
18. de Oliveira Semenzati G, de Souza Salgado B, Rocha NS, Michelin Matheus SM, de Carvalho LR, Garcia Martins RH. Histological and immunohistochemical study of the expression of p53 and ki-67 proteins in the mucosa of the tongue, pharynx and larynx exposed to cigarette smoke. *Inhal Toxicol*. 2012;24:723-31.
19. Cordes C, Münzel AK, Rudolph P, Hoffmann M, Leuschner I, Gottschlich S. Immunohistochemical staining of Ki-67 using the monoclonal antibody Ki-s11 is a prognostic indicator for laryngeal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2009;29:1459-65.
20. Ahmed WA, Suzuki K, Imaeda Y, Horibe Y. Ki-67, p53 and epidermal growth factor receptor expression in early glottic cancer involving the anterior commissure treated with radiotherapy. *Auris Nasus Larynx*. 2008;35:213-9.
21. Wittekindt C, Sittel C, Greiss J, Drebber U, Eckel HE, Preuss SF. Mapping of Ki-67 protein distribution on whole organ serial sections of the larynx. *Acta Otolaryngol*. 2008;128:207-12.
22. Pavlovic B, Djukic V, Milovanovic J, Tomanovic N, Milovanovic A, Trivic A. Morphometric analysis of Ki67 and p16 expression in laryngeal precursor lesions. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2013;270:1405-10.