

Valor prognóstico da correlação imunoistoquímica do Ki-67 e p53 em carcinomas epidermóides da laringe

Prognostic value of the immunohistochemistry correlation of Ki-67 and p53 in squamous cell carcinomas of the larynx

Ricardo Boose Rodrigues¹, Rafael da Ros Motta²,
Simone Márcia dos Santos Machado³, Eduardo
Cambrozzi⁴, Eduardo Walker Zettler⁵, Claudio
Galleano Zettler⁶, Geraldo Pereira Jotz⁷

Palavras-chave: carcinoma epidermóide, imunoistoquímica, laringe, p53, prognóstico.
Keywords: squamous cell carcinoma, immunohistochemistry, larynx, p53, prognostic.

Resumo / Summary

Os fatores prognósticos histológicos podem colaborar para determinar a evolução desta neoplasia. **Objetivo:** Correlacionar a expressão imunoistoquímica do p53 e Ki-67 com idade, grau histológico, comprometimento de linfonodos e estadiamento patológico de pacientes com carcinomas epidermóides de laringe. **Método:** Foram avaliados trinta casos consecutivos de carcinomas epidermóides de laringe, submetidos à técnica de imunoistoquímica para verificar a expressão dos anticorpos p53 e Ki-67. **Resultado:** A idade média foi de 56,2 anos e a imunoexpressão dos marcadores foi mais observada no grupo com mais de 50 anos de idade, especialmente a do anticorpo Ki-67 ($p=0,032$). Não houve relação do p53 e Ki-67 com o comprometimento de linfonodos. O Ki-67 se expressou em 70% nos casos de alto grau histológico e 80% nos de baixo, enquanto o p53 em 70% apenas nos de alto grau. O estadiamento patológico mostrou que no grupo dos carcinomas avançados a expressão do p53 foi de 61,5%, enquanto o Ki-67 mostrou positividade para os casos precoces (100%) e avançados (73,1%). **Conclusão:** Não houve diferenças significantes entre a imunoexpressão do p53 e do Ki-67 em carcinomas epidermóides de laringe, exceto no grupo de pacientes com mais de 50 anos, onde a expressão do Ki-67 foi significativamente maior.

Prognostic histological factors may contribute to determine the evolution of this neoplasia. **Aim:** To correlate p53 and Ki-67 immunohistochemical expression with age, histological degree, lymph node involvement and pathological staging in patients with laryngeal epidermoid carcinomas. **Methods:** We assessed thirty consecutive cases of laryngeal epidermoid carcinomas submitted to immunohistochemistry to check the expression of p53 e Ki-67 antibodies. **Results:** Mean age was of 56.2 years and the immunoexpression of the markers was observed in the group with more than 50 years of age, especially that of the ki-67 antibody ($p=0.032$). There was no relation between p53 and Ki-67 with lymph node involvement. Ki-67 was expressed in 70% of the high histology level cases and in 80% in the low histology ones; while p53 was of 70% only in the high level cases. Pathology staging showed that in the group of advanced carcinomas, p53 expression was of 61.5%, while Ki-67 proved positive for the early cases (100%) and advanced (73.1%). **Conclusion:** There were no significant differences between p53 and Ki-67 immunoexpression in laryngeal epidermoid carcinoma, except in the group of patients with more than 50 years of age, when Ki-67 expression was significantly higher.

¹ Especialista em Patologia, Médico Patologista - Serviço de Anatomia Patológica da Universidade Luterana do Brasil.

² Médico Residente de Patologia da Universidade Luterana do Brasil.

³ Pós-Graduanda, Doutorado em Patologia do Programa de Pós Graduação em Patologia da FFFCMPA, Médica Preceptora da residência médica em Patologia da Universidade Luterana do Brasil.

⁴ Doutor em Patologia pela FFFCMPA, Professor Adjunto de Patologia do Curso de Medicina da Universidade Luterana do Brasil.

⁵ Doutor em Medicina pela UFRGS, Professor Adjunto de Pneumologia do Curso de Medicina da Universidade Luterana do Brasil.

⁶ Doutor em Patologia pela FFFCMPA, Professor Adjunto de Patologia e Chefe do Serviço de Patologia da Universidade Luterana do Brasil.

⁷ Doutor na Área de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço pela UNIFESP. Pós-Doutor em Otorrinolaringologia pela Universidade de Pittsburgh - USA, Professor Adjunto e Chefe do Serviço de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Universidade Luterana do Brasil. Professor Adjunto do Departamento de Ciências Morfológicas da UFRGS.

Serviço de Patologia - Universidade Luterana do Brasil.

Endereço para correspondência: Prof. Claudio Galleano Zettler - Rua Alvaro Alvim 400 90420-020 Porto Alegre RS
Tel. (51) 3333-8433.

Este artigo foi submetido no SGP (Sistema de Gestão de Publicações) da RBORL em 15 de julho de 2007. cod.4659
Artigo aceito em 8 de abril de 2008.

INTRODUÇÃO

O câncer de laringe é responsável por aproximadamente 12.000 novos casos por ano nos EUA e por 2% de todas as mortes por câncer¹. O câncer da laringe é responsável por uma incidência de mais de 130.000 novos casos por ano no mundo, ocorrendo predominantemente no sexo masculino, numa relação de 7:1 (masculino - feminino). O câncer de laringe é um dos mais freqüentes a atingir a região da cabeça e pescoço, representando cerca de 25% dos tumores malignos que acometem esta área. Aproximadamente 2/3 desses tumores surgem na glote e 1/3 acomete a região supraglótica.

O carcinoma epidermóide é o seu tipo histológico mais comum, incluindo os queratinizantes (bem diferenciados) e não-queratinizantes, sendo responsável por 2,2% das neoplasias malignas em homens e 0,4% em mulheres^{2,3}. Os carcinomas de laringe podem acometer as três regiões anatômicas: supraglote, glote e subglote.

Na avaliação dos fatores prognósticos histológicos para os carcinomas de laringe são considerados: localização do tumor, tipo histológico, grau histológico e estado linfonodal. O comprometimento de linfonodos é considerado um dos principais fatores prognósticos nos carcinomas de laringe.

Os genes supressores do crescimento celular e os genes reguladores de apoptose representam uma importante variável na evolução das neoplasias, e dentre eles se evidencia em particular o gene p53⁴⁻⁶. O gene p53 é um proto-oncogene regulador do crescimento celular. Identifica células com alterações de DNA, interrompendo o ciclo na fase G1 e colocando a célula lesada em G0. Neste momento promove o seu reparo e a envia novamente para o ciclo ou, na impossibilidade, promove a sua apoptose. Já está bem demonstrada a correlação entre a expressão do p53 e o prognóstico de diversos tipos de câncer⁷. A expressão imunoistoquímica do p53 evidencia um aumento da expressão da proteína ou uma possível mutação.

A proliferação celular também é considerada um dos mecanismos biológicos fundamentais na oncogênese⁸ e a detecção de marcadores da fração de crescimento celular, como o anticorpo Ki-67, tem sido usada como fator prognóstico em uma variedade de tumores⁹⁻¹¹.

A correlação entre uma alta atividade proliferativa e um pior prognóstico para tumores de cabeça e pescoço e laringe já foi demonstrada previamente, especialmente para as neoplasias que tenham invadido estruturas adjacentes ao sítio de origem^{4,5,8,9}. Este trabalho pretende relacionar a expressão imunoistoquímica do gene p53 e do anticorpo Ki-67 com os fatores prognósticos já estabelecidos (idade, grau histológico, estado linfonodal e estadiamento patológico) em pacientes com carcinoma epidermóide de laringe.

MATERIAL E MÉTODO

Foi realizada uma revisão de trinta casos consecutivos de carcinomas epidermóides de laringe diagnosticados no Serviço de Cabeça e Pescoço do Hospital Luterano da Universidade Luterana do Brasil entre janeiro de 2004 e setembro de 2006, que foram submetidos à laringectomia com esvaziamento cervical. Na amostra foram incluídos todos os casos de carcinoma epidermóide, independente da localização anatômica da neoplasia. Os casos foram examinados no Serviço de Patologia por estudo convencional através da técnica de hematoxilina e eosina e submetidos, posteriormente, a exame imunoistoquímico para verificar a expressão dos anticorpos p53 e Ki-67. A seguir, foram comparados em relação à idade, grau histológico, comprometimento linfonodal e estadiamento patológico dos tumores.

Para a técnica imunoistoquímica foram utilizadas cortes de tecido previamente fixados em formalina a 10%, incluídos em blocos de parafina, cortados em micrótomo manual rotativo na espessura de três micras e montados em organossilano. Em cada lâmina ainda constou tecido controle imunoistoquimicamente reativo, para evitar falsos negativos. Na técnica foi usada a seguinte seqüência:

- a. preparação dos cortes histológicos;
- b. desparafinização e hidratação;
- c. recuperação antigênica através de irradiação em forno de microondas;
- d. bloqueio da peroxidase endógena: as lâminas foram colocadas em uma solução de peróxido de hidrogênio a 5% e água destilada e, após, em uma solução a 5% de leite desnatado e tampão fosfato (PBS), durante 40 min. em câmara úmida e escura; foram lavadas com água corrente, água destilada e colocadas no PBS durante 5 min;
- e. incubação com anticorpo primário anti-Ki 67 e p53 (Dako);
- f. reação complexo avidina-biotina-estreptavidina kit peroxidase (Dako®): anticorpo secundário e marcador;
- g. revelação;
- h. contracoloração

O resultado negativo foi definido como ausência de núcleos corados ou imunoexpressão inferior a 10% nas células neoplásicas para os marcadores p53 e Ki-67. A imunopositividade foi definida como 10% ou mais de núcleos corados, conforme critérios do Serviço, visto não haver consenso na literatura quanto a critérios mínimos de positividade, sendo muito variado por diferentes autores.

Em relação à faixa etária os casos foram divididos em dois grupos: (1) pacientes com menos de 50 anos de idade e (2) pacientes com 50 anos de idade ou mais.

Quanto ao comprometimento linfonodal os casos foram divididos em dois grupos: (1) casos com linfonodos cervicais positivos para metástases (pN1, pN2) e (2)

casos com linfonodos cervicais negativos para metástases. (pN0)

Quanto ao grau histológico os carcinomas epidermóides foram divididos em dois grupos: (1) de baixo grau, ou bem diferenciados - queratinizantes (grau I) e (2) de alto grau, ou moderadamente ou pouco diferenciado (graus II e III).

Quanto ao estadiamento patológico (pT) das neoplasias os casos foram divididos em dois grupos, conforme o Sistema TNM da Union Internationale Contre Cancer (UICC): (1) lesões com comprometimento considerado local (incluindo o pT1) e (2) lesões com comprometimento de estruturas vizinhas (incluindo pT2, pT3 e pT4).

A análise estatística foi realizada através do software SPSS versão 15.0, utilizando-se o teste do Qui-quadrado para comparação entre variáveis categóricas. Através de análise estatística foi avaliada a relação combinada entre a imunoposição tumoral do Ki-67 e p53 com as demais variáveis estudadas (idade, sexo, comprometimento linfonodal, grau histológico e estadiamento patológico [pT, pN]). Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando o valor do p foi menor que 0,05.

O estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de

Ética em Pesquisa da Universidade Luterana do Brasil (Protocolo 2006-192H).

RESULTADOS

A pesquisa incluiu 30 pacientes (28 homens e 2 mulheres) com diagnóstico histológico de carcinoma epidermóide de laringe e submetidos à laringectomia total associado ao esvaziamento cervical.

Os resultados das comparações entre a expressão dos anticorpos p53 e Ki-67 e os fatores prognósticos (idade, estado linfonodal, grau histológico e estadiamento patológico) estão demonstrados nas Tabelas 1 e 2, a seguir.

A idade dos pacientes variou entre 21 e 80 anos, com média de 56,2 anos. Observou-se no grupo com mais de 50 anos uma imunoposição significativamente aumentada do anticorpo Ki-67 ($p = 0,032$).

Em relação aos demais fatores prognósticos avaliados (estado linfonodal, grau histológico e estadiamento patológico), houve uma tendência de maior imunoposição do p53 e do Ki-67 em casos de alto grau histológico e estadiamento patológico avançado, entretanto esta diferença não alcançou significância estatística ($p > 0,05$).

Tabela 1. Correlação entre fatores prognósticos e a expressão do gene p53 em pacientes com carcinoma epidermóide do laringe.

Fator prognóstico	p53 positivo	p53 negativo	p
< 50 anos	2 (50%)	2 (50%)	n.s.
> 50 anos	16 (61,5%)	10 (38,5%)	n.s.
Linfonodos positivos	9 (60%)	6 (40%)	n.s.
Linfonodos negativos	9 (60%)	6 (40%)	n.s.
Baixo Grau	4 (40%)	6 (60%)	n.s.
Alto Grau	14 (70%)	6 (30%)	n.s.
Estadiamento T1	2 (50%)	2 (50%)	n.s.
Estadiamento T2 – T4	16 (61,5%)	10 (38,5%)	n.s.

Tabela 2. Correlação entre fatores prognósticos e a expressão do anticorpo Ki-67 em pacientes com CEC.

Fator prognóstico	ki-67 positivo	ki-67 negativo	p
< 50 anos	2 (50%)	2 (50%)	n.s.
> 50 anos	21 (80,8%)	5 (19,2%)	0,032
Linfonodos positivos	11 (73,3%)	4 (26,7%)	n.s.
Linfonodos negativos	12 (80%)	3 (20%)	n.s.
Baixo Grau	8 (80%)	2 (20%)	n.s.
Alto Grau	15 (75%)	5 (35%)	n.s.
Estadiamento T1	4 (100%)	0 (0%)	n.s.
Estadiamento T2 – T4	19 (73,1%)	7 (26,9%)	n.s.

DISCUSSÃO

Nos últimos anos, muito se tem descoberto sobre os marcadores prognósticos para o carcinoma de laringe. Porém, se algumas publicações relatam correlação estatística entre a expressão do p53 e Ki-67 e pior prognóstico em tumores de laringe, outros têm falhado nessa tentativa.

Dos 30 casos em nosso estudo, a idade variou de 21 a 80 anos, com uma média de 56,2 anos, e quando se dividiu os grupos entre menores e maiores de 50 anos, comparando-os com os marcadores celulares p53 e Ki-67, no grupo de menores que 50 anos o número de casos positivos e negativos foi idêntico, porém no grupo de maiores que 50 anos a taxa de positivos foi maior para os dois marcadores (61,5% para o p53 e 80,8% para o Ki-67). Esses resultados nos fazem acreditar que com o aumento da idade desses pacientes, maior será a taxa de proliferação desses tumores, sendo maior a sua agressividade.

A associação do p53 com metástases linfonodais não foi comprovada, mostrando equilíbrio entre a expressão do marcador e o comprometimento do linfonodo (60% dos tumores mostraram-se positivos para o p53, tanto para os casos metastáticos quanto para os não-metastáticos), não demonstrando significância estatística entre os grupos.

Calli et al.¹², investigando a expressão do p53 e do Ki-67 por imunohistoquímica em 37 pacientes com diagnóstico de carcinoma epidermóide da laringe, encontraram positividade em 83,8% dos casos para Ki-67 e 40% para p53, sem significado estatístico. Por outro lado, Cruz et al.¹³, em um estudo com 55 casos de carcinomas epidermóides da cavidade oral, relataram a positividade do p53 em 64% dos casos quando usado um ponto de corte de 25% de células tumorais coradas. Kropveld et al.¹⁴, estudando 25 pacientes, utilizando a imunohistoquímica e a PCR para detecção de mutações do p53, encontraram uma associação da mutação do p53 e carcinomas em 100% dos casos usando os dois métodos e em 96% dos casos usando somente a imunohistoquímica, porém com um ponto de corte de 50% das células tumorais coradas. Rozemuller et al.¹⁵, numa análise de 50 casos de pacientes portadores de carcinoma utilizando a PCR, associaram o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço a expressão do p53 em 95% dos casos.

Embora nossos achados não correspondam totalmente aos da literatura, podemos questionar se os motivos para que isto tenha acontecido não tenham sido o fato dos autores não terem restringido o sítio da lesão apenas à laringe e terem estendido o experimento a toda região da cabeça e pescoço. Bosch et al.¹⁶ referiram que a prevalência de alterações do p53 (mutação, expressão e perda da expressão) é significativamente mais alta nos tumores de hipofaringe ao contrário de outros sítios.

Considerando que dos nossos casos onde o p53 é positivo (50%), 70% eram de alto grau histológico e 60%

apresentavam metástases cervicais, podemos sugerir que a expressão imunohistoquímica de p53 em casos de carcinomas epidermóides da laringe possa estar relacionada com fatores de mau prognóstico (alto grau histológico e metástases regionais).

Em concordância com nossos resultados Luo et al.¹⁷, comparando a expressão do p53 por imunohistoquímica em 76 pacientes, não encontrou correlação estatisticamente significativa com o sexo, idade, estágio patológico (pT), porém a relação com os graus histológicos (I, II e III) foi estatisticamente significativa. A partir desses achados o autor sugere que a expressão do p53, uma vez presente nos carcinomas precoces, pode ter importante valor prognóstico. Outro estudo que sustenta essa hipótese é o de Zhou et al.¹⁸, ao demonstrarem expressão da proteína p53 em 0%, 31% e 52% de casos de hiperplasia epitelial sem atipias, hiperplasia epitelial com atipias e carcinomas epidermóides de laringe, respectivamente. Neste mesmo estudo foi relatado que as taxas de expressão do p53 em 62%, 76% e 15% em carcinomas bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pouco diferenciados, respectivamente. Os autores concluíram que a expressão da proteína p53 faz parte da patogênese e crescimento do tumor.

Em nosso estudo, 76% dos carcinomas epidermóides de laringe apresentaram expressão imunohistoquímica para o Ki-67. A expressão do Ki-67 foi evidenciada em 73,3% dos casos já com metástase em linfonodos e em 75% dos casos de alto grau histológico. Estes dados sugerem que o Ki-67 possa ser relacionado com fatores de mau prognóstico (metástases em linfonodos regionais e alto grau histológico) em carcinomas epidermóides de laringe ($p > 0,05$). Liu et al.¹⁹, submetendo 80 casos de biópsias pré-operatórias com diagnóstico histológico de carcinoma epidermóide da cabeça e pescoço ao estudo imunohistoquímico para o Ki-67 e correlacionando-os com as peças pós-operatórias, concluíram que o Ki-67 tem valor preditivo estatisticamente significativo para distinguir carcinomas metastáticos dos não-metastáticos. Sun et al.²⁰, estudando 32 casos de carcinoma epidermóide da laringe, correlacionaram o Ki-67, com o estágio T e com a presença de metástases linfonodal, concluindo que o Ki-67 está estatisticamente relacionado ao tumor e ao pior prognóstico da doença, sendo de possível ajuda no tratamento da doença.

A literatura sustenta ainda a hipótese que o Ki-67 está envolvido com pior evolução dos carcinomas epidermóides de laringe. Mirza et al.²¹ estudaram 80 casos com diagnóstico histológico prévio de displasia da mucosa laríngea e submetendo esses a imunohistoquímica para o Ki-67. A expressão do Ki-67 foi categorizada de 0-4 conforme sua intensidade. Seguindo a evolução desses pacientes verificou que em vinte casos houve transformação maligna para carcinoma. A partir disso concluiu que se considerar a expressão máxima do anticorpo (escores

3 e 4), o Ki-67 tem uma alta especificidade (80%) para os carcinomas epidermóides da laringe.

Em relação ao estadiamento patológico, foi observada em nosso estudo uma expressão do p53 em 50% e do Ki-67 em 100% dos casos de tumores precoces, classificados como pT1 (n=4). Já quando analisados os casos mais avançados, entre os estágios pT2 a pT4 (n=26), a expressão do p53 e do Ki-67 foi de 61,5% e 73,1% respectivamente. Estes dados, quando analisados estatisticamente, não demonstraram correlação significativa entre o estágio do carcinoma de laringe e a expressão imunoistoquímica dos dois anticorpos analisados.

CONCLUSÃO

Não houve diferenças estatisticamente significativas entre a imunoexpressão do p53 e do Ki-67 em carcinomas epidermóides de laringe, exceto no grupo de pacientes com idade acima de 50 anos, onde a expressão do Ki-67 foi significativamente maior.

Em relação aos demais fatores prognósticos analisados (grau histológico, comprometimento de linfonodos e estadiamento patológico), novos estudos deverão ser realizados, aumentando o número de casos e estudando a presença de mutações através do seqüenciamento de DNA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DeRienzo DP. Carcinoma of the larynx. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1991;117:681.
2. Mendes P jr. Squamous cell carcinoma of the head end neck in patients under 40 years of age. Arch Otolaringol 1985;111:762-4.
3. DeStefani E. Rysk factors for laryngeal cancer. Cancer 1987;60: 3087-91.
4. Padovan P, Salmaro R, Marchethi M, Padovan R. Prognostic value of bcl-2, p53, Ki-67 in invasive squamous carcinoma of the uterine cervix. Eur J Gynecol Oncol 2000;21(3): 267-72.
5. Pich A, Chiusa L, Navone R. Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumors. Ann Oncol 2004 Sep;15(9):1319-29. Review.
6. Bruner JM, Connely JH, Saya H. p53 protein immunostaining in routinely paraffin-embedded section. Mod Pathol 1993;189-94.
7. Linden MD, Nathanson SD, Zarbo RJ. Evaluation of anti-p53 antibody staining quality control and technical considerations. Appl Immunohistochem 1994;2:218-224.
8. Van Diest PJ, Brugal G, Baak JPA. Proliferation markers in tumors: interpretation and clinical value. J Clin Pathol 1998;51: 716-24.
9. Tubiana M, Courdi A. Cell proliferation kinetics in human solid tumors: relation to probability of metastatic dissemination and long term survival. Radiother Oncol 1989;15:1-18.
10. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. Int J Cancer 1983;31:13-20.
11. Cattoretti G, Becker MHG, Key G et al. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB-1 and MIB-3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. J Pathol 1992;168:357-63.
12. Calli C, Calli A, Pinar E, Oncel S, Demirtasoglu F. Expression of Ki-67 and p53 in laryngeal squamous cell carcinomas. Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg. 2005 Jul-Aug;15(1-2):9-13.
13. Cruz I, Snijders PJF, Van Houten VV, Vosjam M, Van der waal I, Meijer CJLC. Specific p53 immunostaining patterns are associated with smoking habits in patients with oral squamous cell carcinomas. J Clin Pathol 2002;55:834-40.
14. Kropveld A, Rozemuller EH, Leppers FG, Scheidel KC, de Weger RA, Koole R, Hordijk GJ, Slootweg PJ, Tilanus MG. Sequencing analysis of RNA and DNA of exons 1 through 11 shows p53 gene alterations to be present in almost 100% of head and neck squamous cell cancers. Lab Invest 1999 Mar;79(3):347-53.
15. Rozemuller EH, Kropveld A, Kreyveld E, Leppers FG, Scheidel KC, Slootweg PJ, Tilanus MG. Sensitive detection of p53 mutation: analysis by direct sequencing and multisequence analysis. Cancer Detect Prev 2001;25(2):109-16.
16. Bosch FX, Ritter D, Enders C, Flechtenmacher C, Abel U, Dietz A, Hergenbahn M, Weidauer H. Head and neck tumor sites differ in prevalence and spectrum of p53 alterations but these have limited prognostic value. Int J Cancer 2004 Sep;111(4):530-8.
17. Luo K, Wang Z, Wang N, Zhang X, Yang J. Effect of expression of p53 in squamous cell carcinoma of larynx and mucosa adjacent in tumor on the biological behavior. Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi 2005 May;19(9):405-8.
18. Zhou G, Lin D, Liang C, Zhang X, Wen D, Liu Y. Expression of P53 protein in premalignant lesion and carcinoma of larynx. Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao 1999 Sep;30(3):265-7.
19. Liu M, Lawson G, Delos M, Jamart J, Ide C, Coche E, Weynand B, Desuter G, Hamoir M, Remacle M, Marbaix E. Predictive value of the fraction of cancer cells immunolabeled for proliferating cell nuclear antigen or Ki67 in biopsies of head and neck carcinomas to identify lymph node metastasis: comparison with clinical and radiologic examinations. Head Neck 2003 Apr;25(4):280-8.
20. Sun D, Wang Y, Liu H, Kong W, Liu B. Prognostic value of Ki67 and VEGF in squamous cell carcinoma of larynx. Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi 2006 Mar;20(6):246-8.
21. Mirza S, Jeannon JP, Soames J, Wilson JA. Is Ki67 a marker for the transformation of laryngeal dysplasia to carcinoma? Acta Otolaryngol 2006 Apr;126(4):418-21.