

## Valor clínico-biológico de la concentración citosólica de ácido hialurónico en adenocarcinomas pulmonares CD44v6 positivos

A. Ruibal\*, A. Sánchez Salmón\*, S. Argibay\*, J. Rodríguez\*\*

### Resumen

• **Propósito:** El objetivo de este estudio ha sido analizar la influencia de la concentración citosólica de ácido hialurónico (AH) sobre las características clínico-biológicas de adenocarcinomas de pulmón CD44v6 positivos.

• **Material y métodos:** El grupo estudio incluyó 34 muestras tumorales. Dosificamos las concentraciones citosólicas de AH, pS2, cathepsina D, t-AP, NSE, cyfra 21.1, CA125 y fracción libre de la hormona gonadotrófica coriónica. También determinamos las concentraciones de EGFR, proteína oncogénica erbB2, CD44s y CD44v5 en las membranas celulares. Se tuvo presente, asimismo, el estadio clínico, grado histológico, ploidía, índice de DNA y fase de síntesis celular (FS).

• **Resultados:** En el grupo tumoral los valores del índice AH/CD44v6 oscilaron entre 8.5 y 5999 (mediana 107) y fueron superiores (p: 0.004) a los observados en 10 muestras de tejido pulmonar normal de los mismos pacientes. Los adenocarcinomas pulmonares AH/CD44v6 positivos (>107; mediana del grupo) mostraron mayores concentraciones de proteína oncogénica erbB2 (p:0.020) y superiores valores de FS (p: 0.009) e índice de DNA (p: 0.024). Asimismo, fueron más frecuentemente FS+ (>15 %) (p: 0.026).

• **Conclusiones:** Los resultados obtenidos parecen resaltar la importancia de la concentración citosólica de AH en los adenocarcinomas pulmonares CD44v6 positivos, de tal modo que altos valores en el índice AH/CD44v6 se asocian con una mayor proliferación e indiferenciación celular, lo cual unido a mayores concentraciones de proteína oncogénica erbB2, sugiere un subgrupo de tumores con un posible diferente comportamiento. Sin embargo, dada el reducido número de enfermos incluidos, creemos que son necesarios más estudios para poder confirmar nuestros hallazgos.

#### Palabras clave:

CD44v6. Acido hialurónico. Adenocarcinomas pulmón. Proliferación celular. Índice ácido hialurónico/CD44v6.

Oncología, 2005; 28 (1):39-44

\* Servicio de Medicina Nuclear  
Hospital Clínico Universitario. Complejo Hospitalario Universitario  
Santiago de Compostela.

\*\* Servicio de Cirugía Torácica  
Hospital Central de Asturias  
Oviedo

## Summary

- **Purpose:** To study the influence of the cytosol hyaluronic acid (HA) concentrations on the clinical and biological features of CD44v6-positive lung adenocarcinomas (LAs).
- **Material and methods:** The study included 34 tissue samples. We determined the concentration of HA, p52, cathepsin D, t-PA, NSE, cyfra 21.1, CA125, and free beta subunit of human chorionic gonadotrophin in the cytosol, and of EGFR, erbB2 oncoprotein, CD44s and CD44v5 on the cell surface. Other parameters considered were clinical stage, histological grade (HG), ploidy, DNA index, and S-phase cell fraction (SF) measured by flow cytometry.
- **Results:** In the tumoral group the HA/CD44v6 index values varied from 8.5 to 5,999 (107, median for the entire group) and were significantly higher ( $p = 0.004$ ) than those observed in 10 samples of normal lung tissue obtained from the same patients. The HA/CD44v6-positive ( $>107$ ) adenocarcinomas had higher concentrations of erbB2 oncoprotein ( $p = 0.02$ ), and greater values of global SF ( $p = 0.009$ ) and DNA index ( $p = 0.024$ ). They were also more frequently SF+ ( $>15\%$ ).
- **Conclusions:** The results stand out the importance of the cytosol concentration of hyaluronic acid in the CD44v6-positive lung adenocarcinomas, in such a way that high values of the HA/CD44v6 index are associated with a higher proliferation and cellular undifferentiation, which, joined to the higher concentration of erbB2 protein, suggest a subgroup of tumors with a possibly different (poorer ?) outcome. Nevertheless, given the limited number of studied patients, further studies are necessary to confirm our findings.

**Key words:** CD44v6. Hyaluronic acid. Lung adenocarcinoma. Cell proliferation. Hyaluronic acid/CD44v6 index.

## Introducción

El cáncer de pulmón constituye una de las neoplasias más frecuentes y es, asimismo, la primera causa de muerte por cáncer tanto en hombres como en mujeres. Dentro de los tumores no microcíticos, los adenocarcinomas representan ya el subtipo histológico más frecuente en algunos países occidentales, muestran ciertas peculiaridades clínico-biológico-genéticas<sup>1</sup> y suelen cursar con un peor pronóstico excepto en estadios muy iniciales. Dentro de las moléculas de adhesión estudiadas como posibles factores pronósticos en los tumores no microcíticos está el CD44 y sus formas variantes. Una de ellas es la isoforma v6 (CD44v6), involucrada en la diseminación metastática de ciertos tumores. A nivel pulmonar, el CD44v6 ha mostrado diferencias en su comportamiento entre el pulmón fetal y del adulto. Así, en el primero modula ciertos factores de crecimiento involucrados en la morfogénesis y maduración tisular, mientras que en el adulto se asocia con células pluripotenciales e interviene en la migración celular durante la reparación y transformación tumoral<sup>2</sup>. Los carcinomas microcíticos de pulmón no ex-

presan CD44v6, mientras que los no microcíticos lo hacen en un porcentaje importante de casos, siendo éste mayor en los escamosos que en los adenocarcinomas, por lo que se considera un buen marcador de la diferenciación epitelial escamosa<sup>3</sup>. Su comportamiento y utilidad clínica en los carcinomas no microcíticos de pulmón no está plenamente establecida, si bien parece ser que su expresión es independiente del tamaño y proliferación celular<sup>4</sup>, pero no del grado histológico. En cuanto a su relación con la evolución del tumor, ciertos grupos han descrito una asociación inversa con la supervivencia, pero sin comportarse como un factor pronóstico independiente, otros la constatan y algunos no han podido evidenciarla<sup>5-7</sup>. Sin embargo, las últimas observaciones parecen apoyar que refleja un peor comportamiento. También se ha descrito que la expresión de CD44v6 en los carcinomas no microcíticos era un marcador de la afectación ganglionar<sup>8</sup>. Merece destacarse que en los carcinomas broncoalveolares y adenocarcinomas su expresión es alta en las células en crecimiento y menor en las invasivas<sup>9</sup>.

El ácido hialurónico (AH) es un glicosaminoglicano que se incrementa notablemente en el tejido pulmonar

tumoral en relación al normal y ello es más acusado en el subtipo escamoso<sup>10</sup>. En líneas celulares tumorales el AH que rodea a las células tumorales escamosas puede proteger la migración y capacidad invasiva<sup>11</sup>; asimismo, su unión al CD44 estándar (CD44s) potencia la secreción de ciertas metaloproteasas de matriz (MMP2), lo que puede ser de interés en el proceso invasivo<sup>12</sup>. El papel fisiopatológico del AH en los adenocarcinomas se ha visto incrementado tras la demostración de que la proteína 2 unidora de AH está sobreexpresada en este subtipo<sup>1</sup> y por los hallazgos de Pirinen y cols.<sup>13</sup>, quienes han demostrado que en los adenocarcinomas, un aumento del AH estromal se asociaba con un mayor número de recidivas, manteniendo su valor pronóstico tras el análisis multivariado.

Dada la íntima relación funcional (receptor-ligando) entre el CD44s y el AH, la importancia de la otros glicanos y su unión a isoformas del CD44 en el desarrollo de la capacidad metastática de ciertas líneas celulares<sup>14</sup>, así como el papel del AH en la génesis y diseminación de muchos tumores, nos ha parecido interesante estudiar la concentración citosólica de AH en adenocarcinomas CD44v6 positivos, estableciendo un nuevo índice (AHc/CD44v6), y ver como éste se relacionaba con otros parámetros clínico-biológicos que son reflejo de ciertas propiedades funcionales de estas neoformaciones malignas.

## Material y métodos

El grupo estudio incluyó 34 muestras hísticas de adenocarcinoma de pulmón CD44v6 positivo (> 5 ng/mg prot.). La edad de los pacientes estuvo comprendida entre 45 y 64 años (mediana 62) y 27 de ellos eran varones. Asimismo, en 10 casos obtuvimos una muestra de tejido pulmonar aparentemente normal. Tras su obtención en el quirófano y transporte en un contenedor frío, las muestras fueron separadas de sus componentes grasos y almacenadas en nitrógeno líquido hasta su utilización. Posteriormente, fueron pulverizadas con un microdesmembrador (OMNI 1000, Waterbury, CT, USA) a -70°C y homogeneizadas en un potter de teflon-cristal en un buffer TRIS-CLH (TRIS 0,01 M, EDTA Na2 0,0015 M, 10% glycerol, 0,1% monothioglycerol, pH 7,4). Los homogenizados fueron luego centrifugados a bajas revoluciones (800 g durante 10 minutos a 4°C) y el sobrenadante obtenido ultracentrifugado a 100,000 g durante una hora a 4°C. El nuevo sobrenadante (citosol) y el precipitado (membranas) se utilizaron para los distintos análisis biológicos.

El CD44v6 fue determinado mediante un EIA (Ben-

der Diagnostics, Austria), cuyo límite inferior de sensibilidad fue establecido en 0,13 ng/ml. Los coeficientes intraensayo para unas concentraciones medias de 0,53 y 6,4 ng/ml fueron del 8,6% y 5,1% respectivamente, y los coeficientes de variación interensayo para unos valores medios de 3,5 ng/ml y 9,2 ng/ml del 9,3% y 8,4% respectivamente. El dintel de positividad fue establecido en 5 ng/mg prot. Otros parámetros analizados en las membranas celulares fueron las concentraciones del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, Radioligando, Viennalab, Austria), proteína oncogénica erbB2 (enzimoinmunoanálisis (EIA). Dupont, EEUU) y CD44v5 (EIA. Bewnder Diagnostic, Austria). En los citosoles determinamos las concentraciones de catepsina D, pS2, cyfra 21.1, CA125, fracción libre de la subunidad beta de la hormona gónadotrófica corínica (HCGbeta) y enolasa específica neuronal (NSE), usando sendos IRMAS de CIS Biointernational, Francia), así como las del activador del plasminógeno tipo tisular (t-AP; EIA. Boehringer Mannheim, Alemania). Los valores de los parámetros biológicos fueron expresados por mg de proteína determinada por el método de Bradford. También se ha tenido presente el estadio clínico, grado histológico (GH), ploidía y fase S (FS), determinadas estas dos últimas mediante citometría de flujo (Becton Dickinson, Fascam, EEUU) en muestras en fresco. Como las concentraciones de los parámetros biológicos no siguieron una distribución gaussiana, hemos empleado el test de MannWhitney, así como el chi cuadrado (x<sup>2</sup>), con la corrección de Yates cuando fue necesaria, para la comparación de variables cualitativas. Dadas las bajas concentraciones de t-AP, HCGbeta y pS2, hemos utilizado las positivities, tomando como dinteles 1, 0,02 y 1 ng/mg prot. respectivamente. Los resultados han sido expresados mediante la mediana y el intervalo. Una diferencia se consideró estadística cuando el valor de p fue inferior a 0,05.

## Resultados

En el grupo tumoral, los valores del índice AHc/CD44v6 oscilaron entre 8,5 y 5999 (mediana 107) y fueron superiores (p:0,004) a los observados en 10 muestras de tejido pulmonar normal de los mismos pacientes (i: 12-218; mediana 41,8). Al clasificar los adenocarcinomas en función del índice AHc/CD44v6, tomando como dintel de positividad 107, que representa la mediana obtenida en todo el grupo de tumores, pudimos observar (ver Tabla I), que los adenocarcinomas positivos mostraron mayores concentraciones de proteína oncogénica erbB2

TABLA I

Distribución de las concentraciones (mediana e intervalo), así como de los porcentajes de positividad de los diferentes parámetros clínico-biológicos en los adenocarcinomas pulmonares clasificados en función de la positividad (> 107) para el índice AH/CD44v6

PARAMETRO	>107 (17 casos)	</=107 (17 casos)	p	
EGFR	20 (3,1-128)	25,1 (5-204)	ns	fmol
ErbB2	3673 (98,3-20590)	2557 (1439-6989)	0.020	NHI
CATD	71 (31,2-295)	75,5 (40,1-201)	ns	pmol
Cyfra 21.1	1176 (296-4723)	1178 (59,6-6774)	ns	ng
CA125	188 (1-9225)	150,7 (1-1721)	ns	U
NSE	249 (26,8-878)	262 (156-899)	ns	ng
tamaño	4 (1,5-10)	4,5 (2,2-8)	ns	cm
FS	20 (3,2-33,8)	9,6 (3,5-28,7)	0.009	%
IDNA	1.8 (1-2,75)	1,5 (1-2,7)	0.024	
GHIII	5/17	10/17	ns	
Estadio I	12/17	10/17	ns	
Estadio II	2/17	1/17	ns	
Estadio III	3/17	6/17	ns	
FS>15%	8/13	2/13	0.026	
pS2>1*	5/17	6/17	ns	ng
HCGbeta>0.02*	9/17	9/176	ns	ng
t-AP>1*	12/17	9/17	ns	ng
CD44s>80*	12/15	13/16	ns	ng
CD44v5>3*	8/17	13/17	ns	ng

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico; CATD: catepsina D; NSE: enolasa específica neuronal; FS: fase de síntesis celular; GH: grado histológico; t-AP: activador del plasminógeno tipo tisular.

Todos los valores son expresados por mg prot.

\* dintel de positividad

(p:0,020) y superiores valores globales de fase de síntesis (p:0,009) e índice de DNA (p:0,024). Asimismo, fueron más frecuentemente fase S positiva (> 15%; mediana de todo el grupo de tumores) (p:0,026).

## Discusión

El comportamiento y utilidad clínica de la isoforma variante v6 de la molécula de adhesión CD44 (CD44v6) varía según cual sea el tumor estudiado. Asimismo, en relación a los tumores no microcíticos de pulmón los resultados descritos en la literatura no son concordantes.

En los adenocarcinomas pulmonares (manuscrito en preparación) hemos observado una positividad del 75.6%, siendo inferior a la constatada en 16 tejidos pulmonares normales de los mismos pacientes (81.2%). Este mismo comportamiento ha sido descrito por otros autores<sup>15</sup>, lo que sugiere un posible papel en

la transformación tumoral. Nuestro porcentaje de positividad tumoral es similar al de otros grupos, mereciendo destacarse la observación de Nguyen y cols.<sup>4</sup> que constatan una positividad inmunohistoquímica del 36% en los casos puros y de un 67% en la variedad broncoalveolar. Asimismo, en nuestra experiencia, los adenocarcinomas CD44v6 positivos presentaron mayores concentraciones de CA125 y fueron más frecuentemente CD44v5 positivos.

Dado que el principal ligando del CD44s es el ácido hialurónico, nos pareció interesante determinar la concentración citosólica de este último en adenocarcinomas CD44v6 positivos y ver como se modificaban las características clínico-biológicas del tumor en función de la concentración del proteoglicano, estableciendo para ello un índice AHc/CD44v6. De este modo se estudiaba la unidad funcional y no la molécula de adhesión de forma aislada. En los adenocarcinomas constatamos un índice AHc/CD44v6 superior al apreciado en el tejido pulmonar normal, lo cual pare-

ce ser consecuencia del importante incremento del ácido hialurónico que se produce con la transformación maligna, pues, la expresión de CD44v6 es menor cuali y cuantitativamente en los tumores frente al tejido normal. Cuando clasificamos los adenocarcinomas en función del índice AHc/CD44v6, tomando como dintel 107 (mediana de todo el grupo), pudimos observar que los casos positivos mostraron mayores concentraciones de proteína oncogénica erbB2 y superiores valores globales de fase S e índice de DNA. Asimismo, fueron más frecuentemente fase S positiva.

En relación con el oncogen *erbB2*, se sabe que el epitelio pulmonar normal no suele expresarlo, pero si el 27% de los tumores no microcíticos, especialmente poco o moderadamente diferenciados. Su expresión es mayor en los adenocarcinomas que en los escamosos y no parece jugar un claro papel en la metastatización ni ser un factor pronóstico, si bien algunos grupos han demostrado su interés para definir ciertos subgrupos de riesgo<sup>16, 17</sup>. Los últimos estudios demuestran un importante papel de este oncogen en numerosos procesos fisiopatológicos que apoyarían su relevancia en la clínica diaria como un factor definidor de una peor evolución<sup>18-21</sup>.

La proliferación celular constituye una importante variable biológica, pues se relaciona estrechamente, en muchos tumores, con el pronóstico y la respuesta a ciertas terapias. En los de origen pulmonar, se ha visto que la proliferación es mayor en los carcinomas escamosos que en los adenocarcinomas, lo cual puede explicar ciertas características relacionadas con la agresividad y respuesta al tratamiento<sup>22</sup>; asimismo, aquella se comporta como un factor de peor pronóstico en los carcinomas no microcíticos, incluso en estadios iniciales, si bien no todos los autores lo han comprobado<sup>23-26</sup>. También los tumores no microcíticos con reducida proliferación y una mayor apoptosis cursan con una mayor supervivencia. Merece destacarse que la proliferación celular es independiente de la angiogénesis en los tumores no microcíticos y que se correlaciona con la captación de 18F-FDG por parte del tumor<sup>27, 28</sup>.

En relación con la aneuploidía, se acepta que se asocia con un peor pronóstico en todos los tipos de carcinomas no microcíticos, reflejando una evolución más agresiva<sup>24, 29, 30</sup>. También se considera una útil variable complementaria a la clasificación TNM, si bien no alcanza a ser factor pronóstico independiente tras análisis multivariante<sup>22</sup>.

Los resultados anteriores parecen resaltar la importancia de la concentración citosólica de ácido hialurónico en los adenocarcinomas CD44v6, de tal modo que los altos valores en el índice AHc/CD44v6 se asocian con una mayor proliferación e indiferenciación

celular, lo cual, unido a las mayores concentraciones de proteína oncogénica *erbB2*, sugiere un subgrupo de tumores con un posible diferente comportamiento como ha sido demostrado recientemente en otros tumores<sup>31</sup>. Sin embargo, dada el reducido número de enfermos estudiados, creemos que son necesarios más estudios para poder confirmar nuestros hallazgos.

Correspondencia:  
Dr. A. Ruibal Morell  
Servicio de Medicina Nuclear  
Hospital Clínico Universitario  
Complejo Hospitalario Universitario  
E-15706 Santiago de Compostela

## Bibliografía

1. Wang KK, Liu N, Radulovich N, et al. Novel candidate tumor marker genes for lung adenocarcinoma. *Oncogene* 2002; 21:7598-604
2. Fasano M, Sabatini MT, Wieczorek R, Sidhu G, Goswami S, Jagirdar J. CD44 and its spliced variant in lung tumors: a role in histogenesis? *Cancer* 1997; 80:34-41
3. Ylagan LR, Scholes J, Demopoulos R. CD44: a marker of squamous differentiation in adenosquamous neoplasms. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 212-5
4. Nguyen VN, Mirejovsky T, Melinova L, Mandys V. CD44 and its v6 spliced variant in lung carcinomas: relation to NCAM, CEA, EMA and UP1 and prognostic significance. *Neoplasma* 2000; 47:400-8
5. Ramasami S, Kerr KM, Chapman AD, King G, Cockburn JS, Jeffrey RR. Expression of CD44v6 but not E-cadherin or beta catenin influences prognosis in primary pulmonary adenocarcinoma. *J Pathol* 2000; 192:427-32
6. Pirinen R, Hirvikoski P, Bohn J, et al. Reduced expression of CD44v3 variant isoform is associated with unfavorable outcome in non-small cell lung carcinoma. *Hum Pathol* 2000; 31:1088-
7. Fukuse T, Hirata T, Naiki H, Hitomi S, Wada H. Expression of proliferating cell nuclear antigen and CD44 variant isoforms in the primary and metastatic sites of non-small cell lung carcinoma with intrapulmonary metastases. *Cancer* 1999; 86:1174-81
8. Tran TA, Kallakury BV, Sheehan CE, Ross JS. Expression of CD44 standard form and variant isoforms in non-small cell lung carcinomas. *Hum Pathol* 1997; 28:809-14
9. Ohori NP, Coppola D, Landreneau RJ. CD44v6 expression in primary bronchioloalveolar carcinoma and conventional pulmonary adenocarcinoma. *Mod Pathol* 1996; 9:507-12

## A. Ruibal y cols.

---

10. Horai T, Nakamura N, Tateishi R, Hattori S. Glycosaminoglycans in human lung cancer. *Cancer* 1981; 48:2016-21
11. Teder P, Bergh J, Heldin P. Functional hyaluronan receptors are expressed on a squamous cell lung carcinoma cell line but not on other lung carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1995; 55:3908-14
12. Zhang Y, Thant AA, Machida K, et al. Hyaluronan-CD44s signalling regulates matrix metalloproteinase-2 secretion in a human lung carcinoma cell line QG90. *Cancer Res* 2002; 62:3962-5 2002
13. Pirinen R, Tammi R, Tammi M, et al. Prognostic value of hyaluronan expression in non-small cell lung cancer: increased stromal expression indicates unfavourable outcome in patients with adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2001; 95 :12-7
14. Barbour AP, Reeder JA, Walsh MD, Fawcett J, Antalis TM, Gotley DC. Expression of the CD44v2-10 isoform confers a metastatic phenotype: importance of the heparan sulfate attachment site CD44v3. *Cancer Res* 2003; 63:887-93
15. Shimbori M, Kijama H, Sato S, Yoshida H, Sato T, Terasaki-Fukuzawa Y, et al. Expression of CD44 in primary lung carcinomas using histological and cytological analyses. *Anticancer Res* 2003; 23:115-121
16. Giatromanolakis A, Koukourakis MI, O'Byrne K, et al. Non-small cell lung cancer: c-erbB2 overexpression correlates with low angiogenesis and poor prognosis. *Anticancer Res* 1996; 16:3819-25
17. Selvaggi G, Scagliotti GV, Torri V, et al. HER-2/neu overexpression in patients with radically resected non-small cell lung carcinoma. Impact on long-term survival. *Cancer* 2002; 94:2669-74
18. Su JL, Shih JY, Yen ML, et al. Cyclooxygenase-2 induces EP1- and HER-2(Neu)-dependent vascular endothelial growth factor-C up-regulation: a novel mechanism of lymphangiogenesis in lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 2004; 64:554-64
19. Gollamudi M, Nethery D, Liu J, Kern JA. Autocrine activation of ErbB2/ErbB3 receptor complex by NRG-1 in non-small cell lung cancer cell lines. *Lung Cancer* 2004; 43:135-43
20. Turken O, Kunter E, Cermik H, Isitmangil T, Kandemir G, Yaylaci M, et al. Prevalence and prognostic value of c-erbB2 expression in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Neoplasma* 2003; 50:257-61
21. Meert AP, Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Mascaux C, Verdebout JM, et al. The role of HER-2/neu expression on the survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature. *Br J Cancer* 2003; 89:959-65
22. Mattern J, Koomagi R, Volm M. Characteristics of long-term survivors of untreated lung cancer. *Lung Cancer* 2002; 36:277-82
23. Hofmann HS, Knoille J, Bahn H, Klapperstuck T, Lautenschlager C, Neef H. Flow cytometric analysis of DNA content and proliferation and immunohistochemical staining of Ki67 in non small cell lung carcinomas. *J Cardiovas Surg (Torino)* 2001; 42: 550-60
24. Gawrychowski J, Lackowska B, Gabriel A. Prognosis of the surgical treatment of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC)—relation to DNA ploidy. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2003 Jun;23(6):870-7; discussion 877.
25. Poleri C, Moreno JL, Nieva B, et al. Risk of recurrence in patients with surgically resected stage I non-small cell lung carcinoma: histopathologic and immunohistochemical analysis. *Chest* 2003; 123: 1858-67
26. Hirata T, Fukuse T, Naiki H, Hitomi S, Wada H. Expression of CD44 variant exon 6 in stage I non-small cell lung carcinoma as a prognostic factor. *Cancer Res* 1998; 58:1108-10
27. Tsoli E, Zacharatos P, Dasiou-Plakida D, et al. Growth index is independent of microvessel density in non-small cell lung carcinomas. *Hum Pathol* 2002; 33:812-8
29. Pugsley JM, Schmidt RA, Vesselle H. The Ki67 index and survival in non-small cell lung cancer: a review and relevance to positron emission tomography. *Cancer J* 2002; 8:222-33
30. Dyszkiewicz W, Kasprzyk M, Piwkowski C, Gasiorowski L. Prognostic significance of DNA ploidy in squamous cell lung carcinoma. Really worth it?. *Ann Thorac Surg* 2000; 70:1629-33
31. Kobel M, Weichert W, Cruwell K, Schmitt WD, Lautenschlager C, Hauptmann S. Epithelial hyaluronic acid and CD44v6 are mutually involved in invasion of colorectal adenocarcinomas and linked to patient prognosis. *Virchows Arch.* 2004: 456-64