

Discussió

6. Discussió

Actualment el càncer pulmó és una de les malalties amb més importància sociosanitària. Per aquest motiu hi ha una gran quantitat de treballs que intenten aprofundir en el coneixement de la seva biologia.

En aquesta tesi doctoral s'ha volgut esbrinar el possible valor pronòstic de variables de biologia cel·lular implicades en el desenvolupament del tumor mitjançant les anàlisis de dades clíniques, anatomopatològiques, d'immunohistoquímica i de citometria de flux de la mostra de població escollida en aquest estudi.

6.1 Variables clinicopatològiques

Quan es relaciona l'edat dels malalts amb els tipus histològics s'observa que el carcinoma escatós apareix més freqüentment en malalts a partir dels 55 anys. En canvi, els adenocarcinomes es poden manifestar més prematurament i en el cas del CICG no hi ha una tendència manifesta per a cap edat. Tot i que es demostra una significació estadística, no hi ha una explicació raonada d'aquest fet. En un estudi multicèntric ja van apuntar que l'edat no era un factor pronòstic per a la neoplàsia de pulmó (Feld 1994).

L'estadi clínic és una peça cabdal per avaluar el pronòstic del malalt que presenta un CPCNP i administrar-li després el protocol terapèutic més adient. La classificació utilitzada en aquesta tesi és la de Mountain i col·l. (Mountain 1987). Es classifiquen els tumors atenent la supervivència lliure de malaltia al cap de cinc anys. Segons l'estadi es pot trobar que després de cinc anys els malalts de l'estadi I poden sobreviure fins a un 50%, en els de l'estadi II la supervivència disminueix fins a un 30%, en els de l'estadi IIIA baixa a un 15%, si es troben a l'estadi IIIB baixa al 5% i en els de l'estadi IV només sobreviuen un 3%. Tots els malalts de

l'estudi han estat del mateix centre hospitalari i valorats pel mateix grup facultatiu, i s'ha evitat una variabilitat metodològica i tècnica a la manipulació clínica.

Després de fer anàlisi multivariable pel que fa a la supervivència global de la malaltia, només s'ha trobat l'estadi com a variable amb significació independent en el grup de malalts estudiats en aquesta tesi. Tot i que en el grup hi ha malalts en els quals el seguiment ha estat de només 12 mesos, a la majoria de casos s'ha fet un seguiment de com a mínim 36 mesos, que es considera un temps raonable per valorar el comportament biològic dels carcinomes de pulmó.

A les anàlisis de relació entre variables és interessant comentar els resultats obtinguts en relacionar el tipus histològic i l'estadi clínic, i es veu que un elevat percentatge d'adenocarcinomes es diagnostiquen clínicament a l'estadi IIIA mentre que els carcinomes escatosos i sobretot els CICG es troben a tots els estadis clínics repartits amb més o menys uniformitat. És raonable que l'adenocarcinoma es detecti més tard, atès el seu creixement a la perifèria del pulmó.

Una altra variable clinicopatològica és el grau de diferenciació, però en aquest estudi no s'ha obtingut cap informació com a marcador pronòstic independent. Altres estudis realitzats anteriorment tampoc no el donen com a valorable potser, perquè és una variable sotmesa a subjectivitat (Sorensen 1988; Takise 1988).

6.2 Marcadors de la proliferació: Ki-67 i PCNA

Una de les característiques pròpies dels tumors malignes és l'increment de la seva capacitat de proliferació respecte dels teixits normals on s'originen. L'augment de la proliferació cel·lular és, en darrer terme, el responsable del creixement incontrolat del tumor. La quantificació de la proliferació cel·lular dels tumors és una tasca complexa. De fet, es disposa de molts procediments metodològics dissenyats per quantificar la proliferació tissular, però cap d'ells no és del tot adient. De bon principi s'utilitzaren les tècniques que feien servir timidina- H^3 i

altres mètodes, igualment radioactius, que comportaven la necessitat d'utilitzar isòtops radioactius d'una banda i teixit fresc, de l'altra.

Gràcies a la obtenció d'anticossos dirigits contra proteïnes que s'expressen exclusivament a les fases actives del cicle cel·lular, és factible emprar anticossos específics amb tècniques d'immunohistoquímica. D'aquesta manera és possible quantificar *in situ* les cèl·lules que s'estan replicant activament. Això permet valorar exclusivament les cèl·lules neoplàstiques i evitar els biaixos propis dels procediments en els quals no existeix un control morfològic. Ki-67 i PCNA són dos dels antígens de proliferació més universalment investigats en diferents tipus de tumors, els quals també són vàlids per al CPCNP com ja s'ha comentat en el capítol "Bases de la tesi".

En aquesta tesi tots els tumors han presentat algun grau d'immunoreacció tant per al Ki-67 com per al PCNA. Com calia esperar, existeix una relació directa en l'expressió de Ki-67 i PCNA, de manera que quan un tumor expressa un alt percentatge de cèl·lules Ki-67 positives, sovint la taxa de cèl·lules PCNA positives és alta. Aquesta relació, que és estadísticament significativa, també l'han documentat altres investigadors (Fontanini 1992a; Kawai 1994; Tinnemans 1995).

Quan s'han classificat els tumors per categories en funció de les seves taxes de proliferació, únicament s'ha pogut trobar una relació estadísticament significativa amb el tipus anatomopatològic CICG. Efectivament, els CICG expressen les taxes de proliferació més grans tant per al Ki-67 com per al PCNA. Resultats semblants els han publicat amb anterioritat altres autors, i així s'ha confirmat la següent gradació dels CPCNP en funció de la seva decreixent taxa de proliferació: CICG, carcinoma escatós i adenocarcinoma (Soomro 1990; Carey 1992; Kawai 1994; Oyama 1995; Viberti 1997; Esposito 1997b).

D'altra banda, és molt característica la distribució estratificada en què s'expressen els antígens de proliferació en els carcinomes escatosos d'aquest treball, de manera que en aquests tumors la positivitat és manifesta més a la perifèria dels nius neoplàstics que no pas en el centre. Aquesta disposició del PCNA i Ki-67 en els

carcinomes escatosos ha estat documentada anteriorment (Carey 1992).

Alguns investigadors han relacionat els nivells alts de Ki-67 o de PCNA amb un escurçament de la supervivència dels malalts amb CPCNP (Fontanini 1992b; Scagliotti 1993; Castellano 1996; Viberti 1997). Tot i això, també hi ha estudis que, com el present, coincideixen a destacar que no han trobat cap relació entre el grau d'expressió de PCNA i Ki-67 i la supervivència (Tungekar 1991; Pujol 1996).

6.3 Ciclines: ciclina D1 i ciclina E

Tant la ciclina D1 com la ciclina E formen part de la maquinària bioquímica que regula el cicle cel·lular. Concretament, totes dues ciclines regulen un punt cabdal en la replicació cel·lular: el trànsit de G1 a S. Independentment del seu paper com a reguladors fisiològics del cicle cel·lular, a la ciclina D1 s'hi han atribuït funcions oncogenètiques en determinades neoplàsies entre les quals s'inclou el carcinoma de pulmó.

La ciclina D1 està codificada pel gen *CCND1* i actua normalment a l'inici del cicle cel·lular (fase G₁) en conjunció amb la cdk4 i la cdk6. El complex (ciclina D1+ cdk) actua fosforilant la proteïna Rb i, per tant, inactivant-ne la influència inhibidora sobre el cicle cel·lular.

En els adenomes de paratiroide, alguns limfomes i en els carcinomes de mama, fetge, esòfag, cap i coll, etc., s'ha demostrat l'existència de sobreexpressió de la ciclina D1 per ampliació del gen.

També s'ha implicat la sobreexpressió de la ciclina D1 en carcinomes de pulmó i, més concretament, en els carcinomes no microcítics. Això s'ha justificat per la preservació funcional del sistema Rb en molts CPCNP. Per tant, en aquests tumors seria necessària l'existència d'un mecanisme pel qual s'evités l'estímul inhibitor de l'Rb. Així, davant la hiperproducció de ciclina D1, l'Rb seria inactiu i la cèl·lula entraria en cicle amb més facilitat.

En aquesta tesi doctoral, igualment que en altres treballs publicats (Mate 1996; Betticher 1996) s'ha trobat que hi ha una correlació estadísticament significativa entre la sobreexpressió de ciclina D1 i la manca de signes de diferenciació citoplasmàtics. Contràriament, no s'ha trobat cap associació amb la resta de variables examinades, ni tan sols com a indicador de pronòstic pejoratiu. Existeixen diversos treballs en els quals s'ha arribat a objectivar un valor pronòstic per a la ciclina D1 (Keum 1999; Mishina 1999; Saitoh 2001), tot i que també hi ha treballs en els quals no s'ha pogut trobar significació pronòstica per a la ciclina D1 com en aquesta tesi (Betticher 1996; Yang 1996; Kwa 1996; Brambilla 1999; Yamanouchi 2001). Una cosa semblant passa quan es vol relacionar la ciclina D1 amb variables que mesuren la proliferació cel·lular i s'han trobat moltes contradiccions entre els diferents investigadors. És possible que en part això es degui a la metodologia. La immunotinció amb la ciclina D1 és difícil. Els anticossos que estan comercialitzats no són comparables en sensibilitat a altres anticossos anticiclins com la A o la B. Tot i que probablement la ciclina D1 té poca importància a la progressió dels càncers de pulmó de cèl·lula no petita, alguns autors creuen que aquesta ciclina participa de manera activa durant les etapes inicials de la carcinogènesi (Kurasomo 1998 ; Marchetti 1998).

En condicions normals la ciclina E estimula la transició de la fase G₁ a la fase S. Normalment actua al final de la fase G₁, just abans de l'inici de la fase S. La seva detecció per tècniques d'immunohistoquímica tradueix una sobreexpressió que, a diferència del que li passa a la ciclina D1, no depèn de la conversió oncogènica del gen que codifica la ciclina E. Tot i això, el seu estudi a les neoplàsies és molt interessant perquè reflecteix l'estat d'estimulació d'un punt cabdal del cicle cel·lular.

Dels resultats d'aquesta tesi es desprèn, d'una banda, que l'expressió de la ciclina D1 és independent de l'expressió de la ciclina E. Efectivament, no s'ha trobat cap associació entre l'expressió de totes dues ciclins. Altres investigadors han trobat resultats semblants (Dosaka-Akita 2001; Yamanouchi 2001). Aquests articles

indiquen que les vies de la ciclina D1 i de la ciclina E no són dependents i que probablement cada una utilitza diferents mecanismes oncogènics.

En el nostre estudi s'ha trobat que la sobreexpressió de la ciclina E s'associa amb més freqüència a tipus histològics concrets (CICG i carcinoma escatós). Altres investigadors han trobat resultats similars (Anton 2000; Mishina 2000; Yamouchi 2001). D'altra banda, són nombrosos els treballs que han obtingut un valor pronòstic en la sobreexpressió de la ciclina E (Anton 2000; Fukuse 2000; Dosaka-Akita 2001; Muller-Tidow 2001). Malauradament no s'ha trobat el mateix en aquesta tesi.

6.4 Fosfoproteïna P53

En aquest estudi de recerca s'ha trobat un 72,7% de CPCNP, que presenten una acumulació de p53. Si més no, quan s'exclouen els casos en què la positivitat és dèbil i focal, el percentatge de tumors positius es redueix al 47%. Aquesta xifra concorda amb els resultats documentats per altres investigadors que s'apropen al 50% (Quilan 1992; Ebina 1994; Esposito 1997b). Els treballs que utilitzen habitualment teixit fresc o congelat obtenen taxes de positivitat superiors als que utilitzen teixit fixat en formol i inclòs en parafina (McLaren 1992; Brambilla 1993; Passlick 1995a).

Alguns autors han relacionat la sobreexpressió immunohistoquímica de la p53 amb índexs elevats d'antígens de proliferació com el Ki-67 o el PCNA. Atès a que l'acumulació intranuclear de la p53 comporta l'existència d'una mutació del gen, la visualització de la positivitat immunohistoquímica implica que el sistema de p53 no funciona. Per això, semblaria lògic esperar que l'anul·lació de la funció inhibidora de la p53 es produeixi en aquells tumors on els índexs de Ki-67 i PCNA siguin més grans. De fet, alguns autors han trobat una relació estadísticament significativa entre l'expressió de p53 i els antígens PCNA i Ki-67 (Ishida 1997; Esposito

1997b). De tota manera, altres autors coincideixen amb el present treball en no poder relacionar l'expressió de p53 amb els marcadors immunohistoquímics de proliferació cel·lular (Mørkve 1992; Fontanini 1993). De ben segur que això és degut al fet que la regulació de la proliferació en els carcinomes de pulmó implica nombroses vies bioquímiques, entre les quals es troba la p53. Tanmateix, sembla clar que la desregulació del sistema de la p53 participa a l'inici de la carcinogènesi pulmonar (Fontanini 1994) i és igualment probable que dins de la gènesi del carcinoma de pulmó sigui necessari que participin diversos oncògens i gens supressors (Serrano 1997). Per això, l'estat proliferatiu d'un carcinoma de pulmó depèn de l'acció sinèrgica de les diferents molècules implicades.

S'ha demostrat experimentalment (Levine 1994; Lane 1994) que la p53 controla el cicle cel·lular en dos punts anomenats *checkpoints*. El primer regula el pas entre les fases G₁ i S de tal manera que quan hi ha un estímul potencialment nociu per al DNA (radiacions ionitzants) s'impedeix qualsevol nova incorporació de cèl·lules a la fase S. D'aquesta manera els teixits eviten la perpetuació de mutacions. Més recentment, s'ha vist que la p53 controla la transició entre les fases G₂ i M. L'adequada disjunció dels cromosomes es veu afavorida per l'acció de la p53 *wild type*. Efectivament, quan se sotmet a cultius cel·lulars en els quals s'ha suprimit el sistema p53 a l'acció d'inhibidors del fus acromàtic, es pot observar com amb més freqüència es generen elements cel·lulars tetraploides o multiploides. Això ha estat atribuït a la manca de control que, normalment, fa la p53. No es coneix amb exactitud mitjançant quins mediadors exerceix la seva acció la p53, encara que es té la certesa que no és a través de la p21 com passa en el pas de G₁ a S. Per això, la disfunció de la p53 és un dels mecanismes moleculars que genera aneuploidia.

A partir de les premisses anteriors es pot esperar que hi hagi una relació directa entre l'expressió de p53 i la ploïdia, encara que quan es revisen els treballs publicats abunden les contradiccions en aquest punt. Així, Dalquen i Fontanini (Fontanini 1993; Dalquen 1997) troben una associació entre l'expressió augmentada de p53 i l'aneuploidia. D'altra banda, Mørkve i Costa (Mørkve 1991;

Mørkve 1992; Costa 1996) coincideixen amb el present treball a no trobar cap relació estadísticament significativa entre totes dues variables.

Tampoc no s'ha descobert que hi hagi cap relació entre l'expressió de p53 i el percentatge de cèl·lules en fase S. De nou, és fàcil trobar a la literatura publicacions amb resultats contradictoris (Mørkve 1991; Mørkve 1992; Costa 1996; Dalquen 1997). Independentment de la relació estadística, els estudis que han examinat les mateixes mostres l'expressió de p53 i de la ploïdia mitjançant citometria de flux multiparamètrica, coincideixen amb el nostre en el fet que l'expressió de p53 augmentada no es relaciona amb percentatges alts de cèl·lules en fase S. De tota manera, també aquí es pot invocar l'argument que no sols la p53 desregula el cicle cel·lular en els carcinomes de pulmó i que segurament són nombroses les molècules implicades en l'estat proliferatiu d'un tumor determinat.

Independentment dels aspectes de biologia cel·lular relacionats amb la p53, l'hipotètic valor pronòstic que té aquest gen supressor ha estimulat nombrosos estudis d'investigació. Per desgràcia, els resultats que hem obtingut fins ara, segueixen sent poc concloents, en el sentit que són excessives les contradiccions existents (Volm 1992; McLaren 1992; Brambilla 1993; Passlick 1995; Fukuyama 1997; Ishida 1997; Apolinario 1997; Konishi 1997; Dosaka-Akita 1997; Esposito 1997b; Pastorino 1997; Rosell 1997; Vega 1997). Fins i tot s'han fet estudis en què l'expressió augmentada de p53 per immunohistoquímica comporta un paradoxal bon pronòstic (Lee 1995). En el nostre treball no s'ha trobat que els tumors p53 positius tinguin escurçada la supervivència o el temps lliure de malaltia.

6.5 Variables obtingudes per citometria de flux

La quantificació del DNA per CMF permet establir índexs objectius del DNA tumoral. Salvant les distàncies, és una forma de mesurar i objectivar l'atípia d'un tumor. D'aquí que, hi hagi hagut nombrosos treballs que han utilitzat aquesta

tècnica en l'àmbit de la biologia cel·lular.

6.5.1 Ploidia

El càncer de pulmó és una malaltia neoplàstica amb unes regulacions biològiques complexes. S'ha argumentat que les variables de proliferació cel·lular en els tumors, específicament la quantificació del DNA, poden tenir alguna importància de tipus pronòstic. Pot ser interessant, doncs, investigar el significat biològic en una sèrie de malalts tractats quirúrgicament.

La citometria de flux és una tecnologia que dona la possibilitat d'estudiar els tumors sòlids i aportar dades d'interès. Només s'han trobat set treballs que hagin utilitzat teixit no parafinat en estudis de ploïdia mitjançant citometria de flux (Bunn 1983; Tirindelli-Danesi 1987; Volm 1988c; Volm 1988a; Sara 1991; Rice 1993; Kawai 1994). Es podria pensar que la realització d'estudis en teixit fresc, en optimitzar els coeficients de variació i la sensibilitat de la tècnica, millorarien els resultats. Efectivament, aquests estudis donen en general un percentatge més gran de tumors aneuploides (entre un 67% i un 96%). En aquesta tesi doctoral s'ha demostrat que més del 83% dels carcinomes de pulmó són aneuploides. El percentatge de tumors multiploides varia molt segons l'autor, de manera que Tirindelli-Danesi identifica un 53% de casos, Volm, Sara i Rice entre un 20 i un 16% dels casos (Tirindelli-Danesi 1987; Volm 1988a; Sara 1991; Rice 1993). Els resultats obtinguts en aquest treball s'apropen més als d'aquests darrers autors. Tot i això, hi ha publicacions que han identificat carcinomes de pulmó multiploidies per sota d'un 10% (Bunn 1983; Desinan 1996).

Les conclusions a les quals arriben els autors que utilitzen teixit fresc són contradictòries. Mentre que dos treballs no demostren cap valor pronòstic en la determinació de la ploïdia (Bunn 1983; Sara 1991), un altre relaciona directament l'aneuploïdia amb un pitjor pronòstic (Kawai 1994). Tot i això, hi ha estudis que

condicionen el pronòstic pejoratiu de la ploïdia a tipus anatomopatològics concrets com el carcinoma escatós (Volm 1988c; Rice 1993). Finalment, Tirindelli–Danesi condiona el pronòstic més a l'índex de DNA que no pas a l'estat de la ploïdia en si (diploide vs aneuploide). Aquest autor relaciona l'augment de l'agressivitat neoplàstica amb aquells histogrames els índexs de DNA dels quals són superiors a 2 o inferiors a 1 (Tirindelli–Danesi 1987).

En aquesta tesi doctoral s'ha trobat, en l'anàlisi univariable, que la ploïdia té un valor de pronòstic independent. Però a l'anàlisi multivariable no es confirma el valor pronòstic per a la quantificació de DNA per citometria de flux. Per tant, aquests resultats se sumen als de Sara i Bunn, que tampoc no troben que la ploïdia tingui significació pronòstica (Bunn 1983; Sara 1991).

Amb tot el que s'ha exposat fins ara es dedueix que tantes contradiccions impedeixen la utilització de la ploïdia com un marcador pronòstic independent. Tot i això, ens hem de preguntar quin és el motiu que els diferents treballs arribin a conclusions tan dispars. Una revisió de les metodologies utilitzades posa de manifest que els grups han utilitzat tècniques diferents. Per exemple, de les set publicacions revisades, només Kawai ha utilitzat, com en el present treball, la tècnica de Vindeløv (Kawai 1994; Vindeløv 1983). La resta d'investigadors han utilitzat altres tècniques que impliquen l'ús de fluorocroms diferents de l'iodur de propidi (bromur d'etidi, DAPI, taronja d'acridina).

Una altra font potencial de discrepàncies que pot influir en els resultats és la variabilitat instrumental. Probablement, les condicions d'ajust dels citòmetres (linealitat del sistema, CV...) amb què s'ha analitzat cada una de les sèries és diferent. Aquest és un aspecte de valoració difícil, encara que en altres models tumorals ha motivat algunes publicacions (Wheless 1991; Fossa 1992). Tot i que, en general, els estudis que han avaluat la variabilitat instrumental coincideixen en l'objectivitat de la CMF, també s'han plantejat algunes discrepàncies que han posat de manifest la necessitat d'establir sistemes objectius de comprovació, intrainstitucionals i interinstitucionals, semblants als utilitzats en altres tècniques de

laboratori. En aquest sentit, la utilització de poblacions cel·lulars molt estables, com els eritròcits d'au, permeten valorar consecutivament el CV i la linealitat del sistema, optimitzant l'ajust del citòmetre. En aquesta tesi doctoral s'han fet servir els eritròcits de pollastre per a aquesta finalitat (CEN, Becton & Dickinson).

La majoria dels treballs realitzats en un període de 10 anys s'han fet amb material retrospectiu, o sigui, teixit fixat en formol i inclòs en parafina, amb la finalitat de determinar si la ploïdia pot ser un factor pronòstic independent (Zimmerman 1987; Volm 1988c; Van Bodegom 1989; Cibas 1989; Sahin 1990; Isabe 1990; Miyamoto 1991; Rice 1993; Tanaka 1995; Mugüerza 1997).

El nombre de casos valorables inclosos en el conjunt d'aquestes publicacions és de 1.689 casos i la xifra oscil·la entre 93 i 398. D'aquets 1.238 s'han donat com a valorables; 851 són aneuploides, que representen un 69%, però s'observa que les xifres varien força segons el treball. Així, trobem valors d'aneuploïdia de fins a un 85% (Cibas 1989), i altres de només el 45% (Zimmerman 1987). En el present treball el tant per cent de CPCNP aneuploides trobats és del 83,3%. Aquests resultats són comparables als dels estudis amb més sensibilitat en la detecció de tumors aneuploides entre els CPCNP i contrasta amb la mitjana obtinguda a la resta de publicacions.

És difícil trobar un motiu que justifiqui l'existència de tanta variabilitat en els resultats publicats per les diferents sèries. No sembla que el nombre de casos estudiats motivï problemes de sensibilitat estadística atès que, en general, els diferents autors analitzen un nombre suficient de casos.

És probable que aquestes diferències siguin degudes en part al tipus de teixit. La majoria utilitzen material fixat en formol i inclòs en parafina, mentre que en aquest estudi s'ha fet servir teixit fresc o congelat. Dels 80 casos aneuploides hi ha 13 (16,2%) que presenten més d'una població amb un índex de DNA superior a 1. El percentatge de multiploides trobats als altres treballs és bastant variable i, en general, baix. Així, es troba que Isobe i Cibas obtenen un 11% i un 23% respectivament, mentre que d'altres no n'obtenen cap (Zimmerman 1987; Sahin

1990) o no ho mencionen (Volm 1988b; Tanaka 1995). Probablement aquestes diferències i d'altres poden ser degudes a la presa de mostres (material quirúrgic o tractat), a l'estadi de la malaltia (inicial o avançada), al nombre de mostres agafades per a cada cas (no és el mateix una, que tres o quatre) i a la durada del seguiment.

En molts dels treballs esmentats es constata que els carcinomes de pulmó que tenen un índex de DNA diploide són menys agressius que els que el tenen superior a 1 (aneuploide). Hi ha cinc publicacions que demostren que estadísticament hi ha un valor pronòstic independent (Zimmerman 1987; Isobe 1990; Sahin 1990; Miyamoto 1991; Tanaka 1995), encara que l'estudi de Van Bodegom que va fer l'any 1989 no aconsegueix demostrar que l'existència d'aneuploidia tingui implicacions pronòstiques, però es constata que el percentatge de cèl·lules aneuploides sí que es relacionen amb l'agressivitat dels tumors.

Alguns articles limiten el valor pronòstic de la ploïdia a determinats tipus anatomopatològics. Així, els treballs realitzats per Isobe i Sahin l'any 1990 defensen que els carcinomes escatosos aneuploides es comporten més agressivament que els diploides, independentment del grau de disseminació de la malaltia. En canvi, l'any 1989 Van Bodegom en el seu estudi només inclou mostres de carcinoma escatós, i no troba cap diferència pronòstica vinculada al fet que el carcinoma escatós sigui diploide o aneuploide. L'any 1988 Volm (Volm 1988b), estudiant un grup homogeni de malalts amb carcinoma escatós, troba que hi ha una relació significativa entre els aneuploides i l'escurçament de la supervivència. l'any 1995 Tanaka, fa un estudi de malalts d'adenocarcinoma i observa que els adenocarcinomes diploides que estan a l'estadi I tenen millor pronòstic de supervivència que els aneuploides en el mateix estadi (Tanaka 1995).

En molts dels articles on es nega el valor pronòstic independent per a la ploïdia, els autors suggereixen que hi ha dades i punts que relacionen aneuploidia amb una agressivitat més elevada de la neoplàsia. Per exemple, Van Bodegom atribueix una capacitat superior de metastatitzar els tumors aneuploides que els diploides. Per a aquest autor els tumors diploides només recidiven localment. Volm també

coincideix amb Van Bodegom i esmenta que els pacients amb la fase S augmentada tenen una tendència superior a produir metàstasis (Volm 1988b; Van Bodegom 1989).

Les nombroses contradiccions recollides a la literatura conviden a una anàlisi acurada de tots els possibles paràmetres que poden influir en aquest tipus d'estudi. Fins ara tots els treballs han estat revisats de manera conjunta i pocs inclouen grups de poblacions de malalts homogènies. Una dada: pel que fa al grau de disseminació de la neoplàsia hi ha força discrepància entre els diferents estudis. Així, Cibas i Van Bodegom analitzen pacients amb la malaltia localitzada a l'estadi I, en canvi Isobe i Sahin agrupen malalts en diferents estadis. Els primers autors que investiguen estadis inicials subestimen la quantificació del DNA com a factor pronòstic independent. No obstant els investigadors que analitzen tumors de diferents estadis troben que els casos que són aneuploides es relacionen amb una pitjor supervivència dels malalts. En el present estudi la mostra poblacional escollida agrupa diferents tipus de CPCNP i en diferents estadis de la malaltia (I, II i IIIA). A l'anàlisi univariable no s'ha trobat una relació significativa amb l'índex de DNA i el tipus histològic ni tampoc amb l'estadi (Cibas 1989; Van Bodegom 1989; Isobe 1990; Sahin 1990).

Pel que fa a la durada del seguiment clínic és bastant variable, hi ha treballs en què el període és d'uns 6 anys i d'altres en què només són de dos a tres, com també és el cas d'aquest estudi, tot i això, atesa l'agressivitat intrínseca del carcinoma de pulmó sembla que aquesta variable no hi influeixi massa.

Un altre factor que cal tenir en compte per a la valoració conjunta de la població és la selecció dels tipus anatomopatològics. Mentre que uns autors només inclouen un tipus histològic (carcinoma escatós o adenocarcinoma), com és el cas de Van Bodegom, que utilitza el primer tipus, o Cibas i Tanaka, que només agafen el segon, altres inclouen en el seu estudi diversos tipus de CPCNP, com és el cas de Zimmerman, Sahin, Miyamoto o Mugüerza (Zimmerman 1987; Van Bodegom 1989; Cibas 1989; Sahin 1990; Miyamoto 1991; Tanaka 1995; Mugüerza 1997).

Cal esmentar que en el conjunt d'aquestes publicacions escollides hi ha molt poca quantitat de carcinoma indiferenciat de cèl·lula gran. En el present estudi s'han inclòs diferents tipus histològics, i també s'ha trobat un nombre baix de CICG, representat amb un 9% aproximadament. Els més freqüents han resultat els carcinomes escatosos seguits dels adenocarcinomes.

Aspectes vinculats a la tècnica emprada donen lloc a diferències. Encara que la majoria dels malalts que s'han escollit en aquestes publicacions havien estat sotmesos a intervenció quirúrgica i s'havia emprat teixit parafinat procedent de la peça quirúrgica, alguns autors també hi inclouen pacients als quals se'ls havia practicat quimioteràpia o radioteràpia, com és el cas de treball de Volm (Volm 1988b), que inclou casos tractats amb totes dues teràpies. En el cas de l'estudi realitzat en aquest treball totes les mostres són de pacients sotmesos a intervenció quirúrgica i sense cap tractament oncològic. La tècnica utilitzada a la majoria dels articles és la de Hedley, amb algunes modificacions (Hedley 1983), però en alguns s'ha fet servir la de Bauer (Bauer 1990). En aquesta tesi, en fer servir material fresc, la tècnica més adient ha estat la de Vindeløv (Vindeløv 1983), la qual ha donat molt bon resultat, ja que és una tècnica poc complexa, ràpida i que dona bona informació sobre el contingut de DNA que hi ha a les mostres. A més, es pot observar que els histogrames realitzats amb el material fresc i amb aquesta tècnica tenen molt menys fons i els CV obtinguts són més baixos si es comparen amb els histogrames de teixit ja parafinat aplicant la tècnica de Hedley.

El fluorocrom utilitzat a la majoria dels treballs esmentats és el iodur de propidi, però hi ha tres autors que utilitzen el DAPI (4,6 diamidino-2-fenilindol) Els resultats obtinguts són acceptables però s'ha observat que hi ha casos en què aquest fluorocrom ha donat una sobreestimació de ploïdia de fins a un 10% degut a errors en la tinció estequiomètrica del DNA (Heiden 1990). En aquest estudi s'ha utilitzat el iodur de propidi com a la majoria de treballs, i hem trobat una bona qualitat en els resultats.

En tots els articles s'ha escollit el mateix control, o sigui la utilització de teixit no

tumoral inclòs a la peça de recessió quirúrgica. Potser el que falla en aquests treballs és l'explicació poc detallada de la sistemàtica de l'adquisició de les dades pel citòmetre. Algun autor menciona que el pic diploide és el que es troba més prop de l'eix de coordenades, però no fa cap comentari de la utilització prèvia del control o la barreja del control amb el cas problema, amb la finalitat de garantir el pic diploide (Cibas 1989). En el present treball s'ha procedit a processar primerament el control per poder localitzar la posició de la població diploide i posteriorment poder calcular la relació entre el pic diploide i el pic de la població problema, amb la qual cosa s'obté l'índex de DNA.

Pel que fa a les anàlisis dels histogrames, la majoria dels treballs utilitzen criteris semblants (Hiddeman 1984), però hi ha alguns autors que consideren aneuploides els histogrames amb un sol pic G_0/G_1 , però amb un coeficient de variació alt. En el cas del treball d'Isobe (Isobe 1990), es justifica l'existència d'un únic pic G_0/G_1 com a resultat de la superposició de les dues poblacions diploide i aneuploide, cal dir que aquesta última té un índex de DNA baix. Per poder fer una valoració uniforme dels histogrames és recomanable, però, centrar-se en els criteris publicats per Hiddeman i col·l. l'any 1984.

Un altre punt que cal tenir en compte és com es valoren els casos tetraploides; mentre Cibas i col·l. (Cibas 1989) diuen que es pot considerar un cas tetraploide quan el nombre de cèl·lules que es troben en el canal $4n$ és superior al 20% de totes les cèl·lules, –si és menor les consideren doblets nuclears–; altres autors com ara Schmidt i col·l. (Schmidt 1992) valoren la tetraploidia respecte a les fases del cicle i consideren que les cèl·lules que es troben a $4n$ han de tenir un pic més petit a la zona $8n$, que coincidiria amb la seva fase G_2M , i que no s'ha de trobar cap pic a la zona $6n$. Si hi fos seria de triplets. A l'article Schmidt i col·l. fan una valoració a la baixa del pic aneuploide en considerar com a tal per sobre del 3% d'esdeveniments i, tenint en compte que fan servir material parafinat, que ja dona de per si molt detritus; es tradueix en nombroses oscil·lacions a la línia basal.

En el present treball s'han seguit també aquests últims criteris per valorar els tumors tetraploides, però s'ha elevat el llindar fins a un 10%, amb l'avantatge a part que el material era en fresc o bé congelat, el qual dona menys detritus i uns histogrames força clars.

Un altre punt que s'ha de tenir en compte és la quantitat de cèl·lules inflamatòries i de l'estroma que poden emmascarar la població tumoral; en aquests casos cal obtenir més mostres d'altres zones del tumor per assegurar que hi ha una bona representació de la població cel·lular tumoral. Només en dos dels treballs esmentats es comenta la necessitat de repetir l'anàlisi quan la interpretació dels histogrames és dubtosa (Cibas 1989; Sahin 1990).

El coeficient de variació és una altra variable que aporta gran quantitat d'informació sobre la sensibilitat del citòmetre. No s'hauria d'excloure de cap treball d'investigació que empri aquesta metodologia. De la sèrie d'articles seleccionats ni Zimmerman (1987) ni Van Bodegom (1989) ni Tanaka (1995) donen resultats sobre aquesta variable.

6.5.2 Fase de síntesi

Els estudis dels paràmetres de cinètica cel·lular que s'obtenen per citometria de flux són poc freqüents a la literatura. Alguns autors descarten intencionadament aquestes variables perquè les consideren poc fiables quan el material a estudiar és de mostres fixades en formol i incloses en parafina (Sahin 1990), o bé no fan referència dels paràmetres del cicle cel·lular en els seus treballs de recerca. L'any 1988 Volm et al. amb material fresc i en un grup de malalts que estaven definits com d'estadi III, dedueixen que la proliferació té un valor pronòstic independent en els CPCNP, amb una $p < 0,01$. En el mateix any, fent un estudi només de carcinomes escatosos també arriben a la mateixa conclusió (Volm 1988b; Volm 1988c).

L'escàs consens que s'ha comentat per a la ploïdia també es produeix en examinar la fase S, on hi ha una disparitat d'opinions. Per exemple, Cibas et al. (Cibas 1989) estudiant adenocarcinomes en estadi I, neguen cap relació entre la cinètica cel·lular i la supervivència dels malalts. De nou, cal tenir en compte les diferències a l'hora de seleccionar els malalts (l'estadi, els tipus histològics i els aspectes metodològics comentats anteriorment).

És habitual que quan es fa una anàlisi del cicle cel·lular en quedin exclosos alguns casos, per la impossibilitat d'obtenir dades objectives a causa de la superposició de clones poblacionals. Passa el mateix quan existeixen poblacions multiploides o quan l'histograma és de baixa qualitat. En el nostre treball com que s'ha fet servir teixit fresc el percentatge de casos eliminats ha estat relativament baix: un 7%. Altres autors com ara Volm et al. l'any 1988 van eliminar una gran quantitat de casos a les seves sèries, al voltant d'un 35% (Volm 1988c). Per contra, Cibas et al. en el seu treball de l'any 1989 no arriben al 13%.

El resultat de les anàlisis per citometria de flux poden donar unes certes discrepàncies segons del tipus de model matemàtic emprat. Això es pot comprovar fàcilment en qualsevol citòmetre fent servir els models que es tingui introduïts a la memòria de l'ordinador, si se sotmet una mateixa mostra als diferents tipus de models es poden trobar uns resultats diferents en funció del model. Quan es tracta d'una línia cel·lular les diferències poden ser petites però quan es tracta d'analitzar un histograma amb una població aneuploide, segons el model pot passar fins i tot que no sigui analitzable. Per això cal fer-ne servir un que doni més rendiment i emprar-lo sistemàticament. En el present estudi s'ha considerat que el model RFIT del programa *CellFIT* era el més adient.

Són pocs els estudis que intenten relacionar els paràmetres de cinètica cel·lular amb altres variables clinicopatològiques. Cibas (Cibas 1989) no va analitzar estadísticament les variables morfològiques amb les fases del cicle. L'any 1989 Yoshida et al. (Yoshida 1989) demostren, utilitzant com a marcador de la proliferació BrdU, que l'índex de tinció dels nuclis de les cèl·lules dels carcinomes

escatosos i dels carcinomes de cèl·lula petita, eren superiors als de les cèl·lules dels adenocarcinomes. L'any 1988 Volm i col·l. (Volm 1988b; Volm 1988c) no van trobar cap relació entre la fase S i el tipus anatomopatològic. En el present estudi tampoc no s'ha trobat cap relació.

Altres estudis que analitzen la fracció proliferativa arriben a diferents conclusions en funció d'on es col·loqui el rang mitjà de la fase S. Així, Filderman, l'any 1992, quan situava la fracció proliferativa al voltant del 6% demostrà que el pronòstic era millor i si s'augmentava al 8% el resultat de la supervivència dequeia. No va trobar que fos un factor pronòstic per a la supervivència global però va considerar que s'havia de tenir en compte en els tumors en el estadi I, ja que la fase S alta podia indicar un potencial pronòstic desfavorable.

Per contra, altres autors (Sahin 1990; Fontanini 1992b; Rice 1993) no ho consideraren així. Kolodziejwski et al., l'any 1997, fent un estudi amb 207 carcinomes escatosos amb un teixit d'arxiu, no van trobar cap relació entre la proliferació i la supervivència, encara que sí per a la ploïdia (Kolodziejwski 1997).

S'observa també una relació molt estreta amb els paràmetres de citometria que defineix el grau d'aneuploïdia, l'índex de DNA. Els tumors aneuploides generalment tenen una fase S alta i una fase G₀/G₁ diploide baixa, amb una $p < 0,0001$. Respecte del coeficient de variació interespecífic, quan hi ha molta variabilitat, es tradueix amb una gran heterogeneïtat intratumoral, tant pel que fa als diferents índex de DNA, com al percentatge de fase S, amb una $p < 10^{-6}$.

6.5.3 Heterogeneïtat

Un dels objectius d'aquesta tesi doctoral ha consistit a quantificar el grau d'heterogeneïtat intratumoral relacionant-lo amb els paràmetres estudiats i utilitzant les tècniques de citometria de flux. Es tracta de valorar quantes mostres calen per obtenir el perfil de la ploïdia d'un tumor determinat i analitzar de manera

simultània en quina mesura els carcinomes de pulmó són heterogenis. Carey i Lamb ja l'any 1990 en dos articles, per les característiques heterogènies del carcinoma de pulmó, convenien en la necessitat d'adquirir una quantitat proporcional de mostres segons la mida del tumor. D'altra banda, posaven de manifest que per raó d'aquesta heterogeneïtat dins de cada tumor es podia explicar la dificultat en la resposta terapèutica dels malalts i de la seva baixa supervivència (Carey 1990; Stipa 1993). En aquest treball quasi el 23% dels tumors són clarament heterogenis pel que fa al seu contingut de DNA, de tal manera que la variació en els índexs de DNA trobada en les diferents mostres permeten classificar-los de forma objectiva com a heterogenis. Altres investigadors que han valorat l'heterogeneïtat intratumoral per a la ploïdia sempre troben algun grau de l'esmentada heterogeneïtat. El tant per cent de tumors considerats com a heterogenis per a la ploïdia oscil·la molt segons els autors: des d'un 10 fins a un 90% (Carey 1990; Sara 1991; Teodori 1992; Mizobuchi 1994; Ayabe 1994; Miura 1998). Aquestes diferències són explicables en part pels diferents criteris emprats a l'hora de definir l'heterogeneïtat intratumoral pels diferents autors. En el cas d'aquesta tesi s'ha utilitzat el coeficient de variació dels índexs de DNA obtinguts entre les diferents mostres, de manera que s'ha pogut classificar els tumors en tres categories: sense heterogeneïtat, amb un CV igual a zero; poc heterogenis, amb un CV per sota del 0,07; i heterogenis, amb un CV superior a 0,07. Els tumors amb un $CV = 0$ entre les mostres no presenten cap problema d'interpretació, són *no heterogenis*, i constitueixen aproximadament un 24% del total de casos. La resta, un 76% dels tumors, podria interpretar-se com a heterogenis en una anàlisi superficial dels resultats. Però el cert és que els tumors amb un CV de 0,0061 evidencien el repertori d'índex de DNA següent: 1,64, 1,65, 1,66, i 1,66. Nosaltres pensem que catalogar com a heterogenis aquest tipus de tumors és molt qüestionable i explicable per la variabilitat intrínseca de la tècnica.

La disparitat en la detecció de tumors heterogenis entre els diferents autors és explicable també pel diferent nombre de mostres analitzades. Es podria pensar que

com més mostres s'analitzen més possibilitat hi ha de trobar-hi tumors heterogenis. Tot hi que hi ha una part de veritat, la progressió no és aritmètica i ha de tenir un límit. De tota manera es creu que la quantificació d'un nombre de mostres en funció de la mida del tumor permet retratar de forma raonable les variables intratumorals.

Per tant, considerem en aquesta tesi que el percentatge de tumors heterogenis trobats en el treball (23%) deu reflectir en gran mesura la realitat i s'aproxima al d'altres autors amb un disseny de treball i criteris de valoració homologables als nostres (Sara 1991).

El fet que els càncers de pulmó siguin heterogenis gairebé en el 25% dels casos, probablement explica part de la disparitat dels resultats en els estudis de ploïdia amb citometria de flux i és probable que passi alguna cosa semblant amb altres variables moleculars per a les quals hi ha poc consents.

No s'ha trobat cap patró específic de ploïdia en el tumor primari que faci preveure un comportament metastàtic. Tampoc no hem trobat cap relació que associï estadísticament els tumors més heterogenis amb els que han metastatitzat els ganglis regionals.

Conclusions

7. Conclusions

A. Valor pronòstic:

1. Hi ha una relació directa entre l'estadi i la supervivència global dels malalts.
2. El tipus histològic i el grau de diferenciació no tenen valor com a factors pronòstics independents.
3. Hi ha una relació directa entre el grau d'heterogeneïtat per a la fase S i la supervivència global.
4. L'índex de DNA, la fase S, el percentatge de cèl·lules PCNA positives, i el grau d'heterogeneïtat per a l'índex de DNA i de PCNA no es relacionen amb la supervivència dels malalts.
5. Cap de les variables determinades per immunohistoquímica (PCNA, Ki-67, p53, ciclina D1 i ciclina E) no tenen implicacions pronòstiques.

B. Relació entre variables:

6. Hi ha una relació entre el tipus anatomopatològic, el carcinoma indiferenciat de cèl·lula gran i l'expressió augmentada de marcadors de proliferació com ara Ki-67, PCNA i ciclina E per immunohistoquímica i PCNA per citometria de flux.
7. Hi ha una relació directa entre diversos indicadors de la proliferació cel·lular: PCNA i Ki-67; ciclina E i Ki67; p53 i la ciclina E; PCNA i heterogeneïtat a la fase S.
8. La sobreexpressió de ciclina D1 es relaciona directament amb els CPNCP pobrament diferenciats.
9. L'índex de DNA es relaciona directament amb el percentatge de cèl·lules en fase S.
10. La fase S es relaciona amb l'expressió augmentada de PCNA per citometria de flux.
11. L'heterogeneïtat en l'expressió de PCNA es relaciona amb el grau d'heterogeneïtat de l'índex de DNA i de la fase S.

Bibliografia

8. Bibliografia

Abeloff MD, Eggleston JC. Morphologic changes following therapy. In Greco FA, Oldham RK, Bunn PA. (eds): Small cell lung Cancer New York: Grune & Stratton, 1981; p: 235.

Agudo A, Ahrens W, Benhamou E, Benhamou S, Boffetta P, Darby SC et al. Lung cancer and cigarette smoking in women: A multicenter case-control study in Europe. *Int J Cancer* 2000; 88: 820-827.

AJCC Task force on Lung Cancer: Staging of lung cancer 1979. In American Joint Committee for Cancer Staging and End Results Reporting: Manual of Staging of lung cancer. Chicago, American Joint Committee, 1979.

Almendral JM, Huebsch D, Blundell PA, Macdonald-Bravo H, Bravo R. Cloning and sequence of the human nuclear protein cyclin homology with DNA binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 1575-1579.

Amos CI, Caparoso EN, Wenston A. Host factors in lung cancer risk: A review of interdisciplinary studies. *Cancer Epidemiology Biom and Prev* 1992; 1: 503-513.

Anderson KE, Carmella SG, Ye M, Bliss RL, Le C, Murphy L, Hecht SS. Metabolites of a tobacco-specific lung carcinogen in non-smoking women exposed to environmental tobacco smoke. *J Natl Cancer Inst* 2001 Mar 7; 93 (5): 378-81.

Anton RC, Coffey DM, Gondo MM, Stephenson MA, Brown RW, Cagle PT. The expression of cyclins D1 and E in predicting short-term survival in squamous cell carcinoma of the lung. *Mod Pathol* 2000; 13(11): 1167-72.

Apolinario RM, van der Valk P, de Jong JS, Deville W, van Ark-Otte J, Dingemans AM, van Mourik JC, Postmus PE, Pinedo HM, Giaccone G. Prognostic value of the expression of p53, bcl-2, and bax oncoproteins, and neovascularization in patients with radically resected non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1997; 15: 2456-2466.

Arends JW, Schutte B, Wiggers T, Verstijnen CPHJ, Blijham GH, Bosman FT. Comparison of phenotypic and genotypic features in human primary large bowel carcinomas and lymph node metastases. *Cancer Res* 1987; 47: 4342-4344.

Armada-Gil L, Vaque-Rafart J, Rossello J, Olona M, Alseda M. Cigarette smoking and male lung cancer risk with special regard to type of tobacco. *Int J Epidemiol* 1999 Aug; 28 (4): 614-9.

Ayabe H, Tomita M, Kawahara K, Tagawa Y, Tsuji H, Akamine S. DNA stem line heterogeneity of non-small cell lung carcinomas and differences in DNA ploidy between carcinomas and metastatic nodes. *Lung Cancer* 1994 Sep; 11(3-4): 201-8.

- Bagchi S, Weinmann R, Raychaudhuri P. The retinoblastoma protein co-purifies with E2F-I, an E1A-regulated inhibitor of the transcription factor E2F. *Cell* 1991; 65: 1063-1072.
- Baisch H, Gerdes J. Simultaneous staining of exponentially growing versus plateau phase cells with the proliferation associated antibody Ki-67 and propidium iodide: Analysis by flow Cytometry *Cell Tissue Kinet* 1987; 20:387-391.
- Banner BF, Ernstoff MS, Bahnson RR, Titus-Ernstoff L, Taylor SR. Quantitative DNA analysis of small renal cortical neoplasms. *Hum Pathol* 1991; 22: 247-253.
- Baserga R. Growth regulation of the PCNA gene. *J Cell Sci* 1991; 98: 433-436.
- Bates S, Bonetta L, MacAllan D, et al. CDK6 (PLSTIRE) and CDK4 (PSK-J3) are a distinct subset of the cyclin-dependent kinases that associate with cyclin D1. *Oncogene* 1994a; 9: 71-79.
- Bates S, Parry D, Bonetta L, Vousden K, Dickson C, Peters G. Absence of cyclin D/cdk complexes in cells lacking functional retinoblastoma protein. *Oncogene* 1994b; 9: 1633-1640.
- Bauer TW, Tubbs RR, Edinger MG, Suit PF, Gephardt GN, Levin HS. A prospective comparison of DNA quantitation by image and flow cytometry. *Am J Clin Pathol* 1990; 93: 322-326.
- Benchimol S, Lamb P, Crawford LV, et al. Transformation associated p53 protein is encoded by a gene on human chromosome 17. *Somat Cell Mol Genet* 1985; 11: 505-510.
- Benson III, AB, Bauer KD, Lefkopoulou M, et al. Proceedings, 83rd Annual Meeting, American Association for Cancer Research, 1992.
- Betticher DC, Heighway J, Halseton PS, Altermatt HJ, Ryder WDJ, Cerny T, Thatcher N. Prognostic significance of CCND1 (cyclin D1) overexpression in primary resected non-small-cell lung cancer. *Br J of Cancer* 1996; 73: 294-300.
- Bodrug S, Warner B, Bath M, Lindeman G, Harris A, Adams J. Cyclin D1 transgene impedes lymphocyte maturation and collaborates in lymphoma genesis with the myc gene. *EMBO J* 1994; 13: 2124-2130.
- Bolton WE, Mikulka WR, Healey CG, Schmittling RJ, Kenyon NS. Expression of proliferation associated antigens in the cell cycle of synchronised mammalian cells. *Cytometry* 1992; 13: 117-126.
- Borras JM, Fernandez E, Schiaffino A, Borrell C, La Vecchia C. Pattern of smoking initiation in Catalonia (Spain) from 1948-1992. *Am J Public Health* 2000; 90: 1459-1462.
- Brambilla E, Gazzeri S, Moro D, Caron de Fromentel C, Gouyer V, Jacrot M, Brambilla C. Immunohistochemical study of p53 in human lung carcinomas. *Am J Pathol* 1993; 143:

199-210.

Brambilla E, Moro D, Gazzeri S, Brambilla C. Alterations of expression of Rb, p16(INK4A) and cyclin D1 in non-small cell lung carcinoma and their clinical significance. *J Pathol.* 1999 Aug;188(4):341-3.

Bravo R, Frank R, Blundell PA, Macdonald-Bravo H. Cyclin-PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase delta. *Nature* 1987a; 326: 515-517.

Bravo R, Graff T. Synthesis of the nuclear protein cyclin does not correlate directly with transformation in quail embryo fibroblasts. *Exp Cell Res* 1985; 156: 450-454.

Bravo R, Macdonald-Bravo H. Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: Association with DNA replication sites. *J Cell Biol* 1987b; 105: 1549-1554.

Buckley MF, Sweeney KJ, Hamilton JA, et al. Expression and amplification of cyclin genes in human breast Cancer *Oncogene* 1993; 8: 2127-2133.

Bunn PA, Carney DN, Gadzar AF, Whang-Peng J, Matthews MJ. Diagnostic and biological implications of flow cytometric DNA content analysis in lung cancer. *Cancer Res* 1983; 43: 5026-5032.

Cagini I, Monacelli M, Giustozzi G, Moggi L, Bellezza G, Sidoni A, et al. Biological prognostic factors for early stage completely resected non-small-cell lung cancer. *J Surg Oncol* 2000; 74: 53-60.

Caldas C, Hahn SA, da Costa LT, Redston MS, Schutte M, Seymour AB, et al. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet* 1994; 8: 27,

Carey FA, Fabbroni G, Lamb D. Expression of proliferating cell nuclear antigen in lung cancer: A systematic study and correlation with DNA ploidy. *Histopathology* 1992; 22: 95-96.

Carey FA, Lamb D, Bird CC. Intratumoral heterogeneity of DNA content in lung cancer *Cancer* 1990 May 15; 65 (10): 2266-2269.

Carson DA, Lois A. Cancer progression and p53. *Lancet* 1995; 346: 1009-1011.

Castellano VM, Sotelo T, Ballestin C, Lopez-Encuentra A, Varela G. Analisis de la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) en 24 carcinomas primarios de pulmón de células no pequeñas y correlación con la supervivencia. *Arch Bronconeumol* 1996; 32: 127-131.

Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Galle J, Gerdes J. 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: 357-363.

Cattoretto G, Bert E, Schiro R, D'Amato L, Valeggio C, Rilke F. Improved avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) staining. *Histochem J* 1988a; 20: 75-80.

Cattoretto G, Rilke F, Andreola S, D'Amato L, Delia D. p53 expression in breast cancer. *Int J Cancer* 1988b; 41:178-183.

Catzavelos C, Tsao MS, DeBoer G, Bhattacharya N, Shepherd FA, Slingerland JM. Reduced expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in non-small cell lung carcinoma: A prognostic factor independent of Ras. *Cancer Res* 1999 Feb 1;59(3):684-8.

Celis JE, Celis A. Cell cycle dependent variations in the distribution of the nuclear antigen in cultured cells: Subdivision of S phase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 3262-3266.

Celis JE, Fey SJ, Larsen PM, et al. Expression of the transformation sensitive protein "cyclin" in normal, human epidermal basal cells and simian virus 40-transformed keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 3128-3132.

Celis JE, Madsen P, Nielsen S, Celis A. Nuclear patterns of cyclin (PCNA) antigen distribution subdivide S-phase in cultured cells- some applications of PCNA antibodies. *Leuk Res* 1986; 10:237-249.

Chang CD, Ottavio L, Travali S, Lipson KE, Baserga R. Transcriptional and posttranscriptional regulation of the proliferating cell nuclear antigen gene. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 3289-3296.

Charp NZ, Ellison DD, Brophy PF, Watts P, Chang MC, Keller SM. DNA content in correlation with post-surgical stage in non-small-cell lung cancer. *Am Thorac Surg* 1992; 53: 680-3

Chatterjee A, Freeman JW, Busch H. Identification and partial characterisation of a M 105,000 nucleolar antigen associated with cell proliferation. *Cancer Res* 1987; 47: 6329-6334.

Cheng J-Q, Jhanwar SC, Klein WM, Bell DW, Lee W-C, Altomare DA, Nobori T, Olopade OI, Buckler AJ, Testa JR. p16 alterations and deletion mapping of 9p21-p22 in malignant mesothelioma. *Cancer Res* 1994; 54: 5547-51.

Chilosi M, Iannucci A, Menestrina F, et al. Immunohistochemical evidence of active thymocyte proliferation in thymoma. Its possible role in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Am J Pathol* 1987; 128: 464-470.

Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP. Crystal structure of a p53 tumour suppressor-DNA complex: Understanding tumorigenic mutations. *Science* 1994; 265: 3445-3446.

Churg A. The fine structure of large cell undifferentiated carcinoma of the lung. Evidence for its relation to squamous cell carcinomas and adenocarcinomas. *Hum Pathol* 1978; 9: 143-156.

Cibas ES, Melamed MR, Zaman MB, Kimmel M. The effect of tumour size and tumour cell DNA content on the survival of patients with stage I adenocarcinoma of the lung. *Cancer* 1989; 63: 1552-1556.

Clevenger CV, Epstein AL, Bauer KD. Modulation of the nuclear antigen p105 as a function of cell-cycle progression. *J Cell Physiol* 1987; 130: 336-343.

Colditz GA, Stampfer MJ, Willet MJ. Diet and lung cancer: A review of the epidemiologic evidence in humans. *Arch Intern Med* 1987; 147: 157-160.

Collins SJ, Gallo RC, Gallagher RE. Continued growth and differentiation of human myeloid leukemic cells in suspension culture. *Nature* 1977; 270: 346-349.

Cordon-Cardo C Mutation of cell cycle regulators: Biological and clinical implications for human neoplasia. *Am J Pathol* 1995; 147: 545-560.

Costa A, Silvestrini R, Mochen C, Lequaglie C, Boracchi P, Faranda A, Vessecchia G, Ravasi G. p53 expression, DNA ploidy and S-phase cell fraction in operable locally advanced non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 1996; 73: 914-919.

Dalquen P, Moch H, Feichter G, Lehmann M, Soler M, Stulz P, Jordan P, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G. DNA aneuploidy, S-phase fraction, nuclear p53 positivity, and survival in non-small-cell lung carcinoma. *Virchows Arch* 1997; 431: 173-179.

De Vos S, Miller CW, Takeuchi S, Gombart AF, Cho SK, Koeffler HP. Alterations of CDKN2 (p16) in non-small-cell lung. *Cancer Genes Chromosom Cancer* 1995; 14: 164-170.

DeCaprio JA, Ludlow JW, Figge J, et al. SV40 large tumour antigen forms a specific complex with the product of retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* 1988; 54: 275-283.

Denoix PF. Enqueté permanent dans les centres anticancereux . *Bull Inst Nat Hyg* 1946, 1: 70-80.

Department of Health, Education and Welfare. The health consequences of smoking: A report of the Surgeon General. Wasington DC: Government Printing Office, 1972: 121-135.

Desinan L, Scott CA, Pizzolitto S, Avellini C, Rimondi G, Bardus P, Rizzi V, Talmassons G, Puricelli C, Beltrami CA. Non-small cell lung cancer. Morphology and DNA flow cytometry. *Anal Quant Cytol Histol* 1996; 18: 438-452.

Doll R, Hill AB. The mortality of doctors in relation to their smoking habit: A preliminary

report. Brit Med J 1954; 1: 1451-1455.

Dosaka-Akita H, Honmura F, Mishina T, Ogura S, Shimizu M, Katoh H, Kawakami Y. A risk-stratification model of non-small cell lung cancers using cyclin E, Ki-67, and ras p21: Different roles of G1 cyclins in cell proliferation and prognosis. Cancer Res 2001; 15; 61(6): 2500-4.

Dosaka-Akita H, Hu SX, Fujino M, Kinoshita I, Xu HJ, Kuzumaki N, Kawakami Y, Benedict WF. Altered retinoblastoma protein expression in non-small-cell lung cancer: Its synergistic effects with altered ras and p53 protein status on prognosis. Cancer 1997; 79: 1329-1337.

Dressler LG, Bartow SA. DNA flow cytometry in solid tumours: Practical aspects and clinical applications. Semin Diag Pathol 1989; 6: 55-82.

Dulic V, Kaufmann WK, Wilson SJ, et al. p53- dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. Cell 1994; 76: 1013-1023.

Dulic V, Lees E, Reed SI. Association of human cyclin E with a periodic G₁-S phase protein kinase. Science 1992; 257: 1958-1961.

Ebina M, Steinberg SM, Mulshine JL, Linnoila IR. Relationship of p53 overexpression and up-regulation of proliferating cell nuclear antigen with the clinical course of non-small cell lung cancer. Cancer Res 1994; 54: 2496-2503.

El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumour suppression. Cell 1993; 75: 817-825.

El-Naggar AK, Dinh M, Tucker S, et al. Genotypic analysis of primary head and neck squamous carcinoma by combined fluorescence *in situ* hybridisation and DNA flow cytometry. 1996; 105: 102-108.

Ensley JF, Maciorowski Z, Hassan M, et al. Cellular DNA content parameters in untreated and recurrent squamous cell cancers of the head and neck. Cytometry 1989; 10: 334-338.

Esposito V, Baldi A, De Luca A, Micheli P, Mazzarella G, Baldi F, Caputi M, Giordano A. Prognostic value of p53 in non-small cell lung cancer: Relationship with proliferating cell nuclear antigen and cigarette smoking. Hum Pathol 1997b; 28: 233-237.

Esposito V, Baldi A, Luca AD, Groger AM, Loda M, Giordano GG, et al. Prognostic role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in non-small cell lung cancer. Cancer Res 1997a; 57: 3381-5.

Falco JP, Baylin SB, Lupu R, et al. V-HA-RAS induces non-small cell phenotype with associated growth factors in a SCLC cell line. J Clin Invest 1990; 85: 1740-1745.

- Fang F, Newport JW. Evidence that the G₁-S and G₂-M transitions are controlled by different cd2 proteins in higher eukariotes. *Cell* 1991; 66:731-742.
- Feld R, Borges M, Giner V, Ginsberg R, Harper P, Klastersky J, et al. Prognostic factors in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 1994; 11: suppl. 3: S19-S23.
- Fernandez E, Ramón Gonzalez J, Maria Borrás J, Sanchez V, Moreno V, Peris M. Evaluación de la mortalidad por cancer en Cataluña (1975-1998). *Med Clin*. 2001 May 5; 116 (16): 605-9.
- Ferro ML, Riukin M, Tasch M, Porter P, Carcow CE, Firpo E, et al. A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(kip1) deficient mice. *Cell* 1996; 85: 733-44.
- Filderman AE, Silvestri GA, Gatsonis C, Luthringer DJ, Honig J, Flynn SD. Prognostic significance of tumour proliferative fraction and DNA content in stage I non-small cell lung cancer. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 707-710.
- Firpo EJ, Koff A, Solomon MJ, Roberts JM. Inactivation of a cdk2 inhibitor during interleukin 2-induced proliferation of human T lymphocytes . *Mol Cell Biol* 1994; 14: 4889-4901.
- Fischbach W, Mossner J, Seyschab H, Hohn H. Tissue carcinoembryonic antigen and DNA aneuploidy in precancerous and cancerous colorectal lesions. *Cancer* 1990; 65: 1820-1824.
- Fisher RP, Morgan DO. A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* 1994; 78: 713-724.
- Flores-Rozas H, Kelman Z, Dean FB, et al. Cdk-interacting protein 1 directly binds with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication catalysed by the DNA polymerase δ holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 8655-8659.
- Fonatsch C, Duchrow M, Rieder H et al. Assignment of the human Ki-67 gene (MKI-67) to 10q25-qter. *Genomics* 1991; 11: 476-477.
- Fontanini G, Bigini D, Vignati S, Macchiarini P, Pepe S, Angeletti CA, Pingitore R, Squartini F. p53 expression in non-small-cell lung cancer: Clinical and biological correlations. *Anticancer Res* 1993; 13: 737-742.
- Fontanini G, Macchiarini P, Pepe S, Ruggiero A, Hardin M, Bigini D, Vignati S, Pingitore R, Angeletti CA. The expression of proliferating cell nuclear antigen in paraffin sections of peripheral, node-negative non-small cell lung cancer. *Cancer* 1992b; 70: 1520-1527.
- Fontanini G, Pingitore R, Bigini D, Vignati S, Pepe S, Ruggiero A, Macchiarini P. Growth fraction in non-small cell lung cancer estimated by proliferating cell nuclear antigen and comparison with Ki-67 labelling and DNA flow cytometry data. *Am J Pathol* 1992a; 141: 1285-1290.

Fontanini G, Vignati S, Bigini D, Merlo GR, Ribecchini A, Angeletti CA, Basolo F, Pingitore R, Bevilacqua G. Human non-small cell lung cancer: p53 protein accumulation is an early event and persists during metastatic progression. *J Pathol* 1994; 174: 23-31

Fornace AJ, Nebert DW, Hollander MC, et al. Mammalian genes co-ordinately regulated by growth arrest signals and DNA-damaging agents. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 4196-4203.

Forsslund G, Esposti PL, Nilsson B, Zetterberg A. The prognostic significance of nuclear DNA content in prostatic carcinoma. *Cancer* 1992; 69: 1432-1439.

Fossa SD, Berner A, Waehre H, et al. DNA ploidy in cell nuclei from paraffin-embedded material. Comparison of results from two laboratories. *Cytometry* 1992; 13: 395-403.

Frank AL. Epidemiology of lung Cancer En: Roth JA, Ruckdeschel JC, Weisenburger TH (eds.). Thoracic Oncology. WB Saunders Co. 1989 Philadelphia. 6-15.

Fredersdof S, Burns J, Milne AM, Packham G, Fallis L, Gillet CE, et al. High level expression of p27KIP1 and cyclin D1 in some human breast cancer cells: Inverse correlation between the expression of p27 KIP1 and degree of malignancy in human breast and colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 6380-5.

Friedland ML, Dembo AT. Prognostic factors in ovarian cancer. *Semin Oncol* 1991; 18: 205-212.

Friend SH, Bernards R, Rogelj S, et al. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 1986; 323: 643-646.

Frierson HF. Ploidy analysis and S-phase fraction determination by flow cytometry of invasive adenocarcinomas of the breast. *Am J Surg Pathol* 1991; 15: 358-367.

Fukuse T, Hirata T, Naiki H, Hitomi S, Wada H. Prognostic significance of cyclin E overexpression in resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2000; 15: 60(2): 242-4.

Fukuyama Y, Mitsudomi T, Sugio K, Ishida T, Akazawa K, Sugimachi K. K-ras and p53 mutations are an independent unfavourable prognostic indicator in patients with non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 1997; 75: 1125-1130.

Fung YK, Murphree AL, T'Ang A, Qian J, Hinrichs SH, Benedict WF. Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene. *Science* 1987; 236: 1657-1661.

Galand P, Degraf C. Cyclin/PCNA immunostaining as an alternative to triated thymidine pulse labelling for marking S phase cells in paraffin sections from animal and human tissues. *Cell Tissue Kinet* 1989; 22: 383-392.

Garfinkel L, Auerbach O, Jonbert L. Involuntary smoking and lung cancer: A case-control study. *J Natl Cancer Ins* 1985; 75: 4463-4469.

- Gazzeri S, Gaudy V, Vour'ch C, Brambilla C and Brambilla E. Mechanisms of p16^{CDKN2/MTS1} inactivation in non-small cell lung cancers. *Oncogene* 1998; 16: 497-504.
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwaub U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; 133: 1710-1715.
- Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad H-D. Immunobiochemical and molecular biologic characterisation of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 1991; 138: 867-873.
- Glutzer M, Murray AW, Kirschner MW. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 1991; 349: 132-138.
- Gonzalez CA, Agudo A. Occupational cancer in Spain. *Environ Health Perspect* 1999 May; 107 Suppl 2: 273-7.
- Gonzalez Enriquez J, Villar Alvarez F, Banegas Banegas JR, Rodriguez Artalejo F, Martin Moreno JM. Tendencia de la mortalidad atribuible al tabaquismo en España, 1978-1992: 600.000 muertes en 15 años. *Mec Clin* 1997 Nov 1; 109 (15): 577-82.
- Gould VE, Lee I, Warren WH. Immunohistochemical evaluation of neuroendocrine cells and neoplasms of the lung. *Pathol Res Pract* 1988; 183: 200-204.
- Graña X, Reddy EP. Cell cycle control in mammalian cells: Role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKIs). *Oncogene* 1995; 11: 211-219.
- Granone P, Cardillo G, Rumi E, D'Ugo D, Rumi C, Ciletti S, et al. DNA flow cytometric analysis in patients with operable non-small cell lung carcinoma. *Eur J Cardio Thorac Surg* 1993; 7:351-5.
- Gray N. Low-tar cigarettes: Bane or benefit. *Cancer Detect Prev* 1987; 10: 187-192.
- Green MR, Ginsberg R. Induction therapy for stage IV NSCLC: A consensus report. *Lung Cancer* 1994; 11 (suppl 3): s9-s10.
- Groeger AM, Caputi M, Esposito V, De Luca A, Bagella L, Pacilio et al. Independent prognostic role of p16 expression in lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999 Sep; 118(3):529-35.
- Gu Y, Turck CW, Morgan DO. Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. *Nature* 1993; 366: 707-710.
- Gustafson H, Tribukait B. Characterization of bladder carcinomas by flow DNA analysis. *Eur Urol* 1985; 11: 410-417.

Habermann FA, Rabes HM. Simultaneous 3H thymidine labelling and Ki-67 antigen detection in human colonic tumours. European Study Group For Cell Proliferation 1989; Milan.

Hanna Z, Jankowski M, Tremblay P, Jiang X, Milatovich A, Francke U, Jolicoeur P. The *vin-1* gene, identified by provirus insertional mutagenesis, is the cyclin D2. *Oncogene* 1993; 8: 1661-1666.

Hannon GJ, Beach D. p15^{INK4B} is a potential effector of TGF- β -induced cell cycle arrest. *Nature* 1994; 371: 257-261.

Hanse HH. Epidemiology and Aetiology. En: Lung Cancer European Commission Series. Edit. Springer-Verlog 1990: 15-23.

Hansen MF, Koufos A, Gallie BL, et al. Osteosarcoma and retinoblastoma: A shared chromosomal mechanism revealing recessive predisposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 6216-6220.

Harper JW, Adami G, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The 21 Kd Cdk interacting, protein Cip 1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993; 75: 805-816.

Harpole D H, Herndon JE, Wolfe WG, Iglehart JD, Marks JR. A prognostic model of recurrence and death in stage I non-small cell lung cancer utilizing presentation, histopathology, and oncoprotein expression. *Cancer Res* 1995; 55: 51-6.

Harting FH, Hesse W. Der Lungenkrebs, die Bergkrankheit in der Schneeberger Gruben. *Ngschr Med Gerich Off Sanit* 1879; 30: 296-309; 1879; 31: 102-132; 1879; 31: 313-337.

Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 1989; 246: 629-634.

Hayashi N, Sugimoto Y, Tsuchiya E, Ogawa M, Nakamura Y. Somatic mutations of the MTS (multiple tumour supressor) 1/CDK41 (cyclin-dependent kinase-4 inhibitor) gene in human primary non-small cell lung carcinomas. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 202:1426-1430.

Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, et al. Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 1983; 31: 1333-1335.

Heichman KA, Roberts JM. Rules to replicate by. *Cell* 1994; 79: 557-562.

Heiden T, Strang P, Sthendahl U et al. The reproducibility of flow cytometric analysis in human tumours. Methodological aspects. *Anticancer Res* 1990; 10: 49-54.

Henson DE, Ries L, Freedman LS, Carriaga M. Relationship among outcome. *Cancer* 1991; 68: 2142-2149.

- Herman JG, Jen J, Marlo A and Baylin SB. Hypermethylation-associated inactivation indicate a tumour suppressor role for p15^{INK4B}. *Cancer Res* 1996; 56: 722-27.
- Hiddeman W, Schumm J, Andreeff M, et al. Convention on Nomenclature for DNA cytometry. *Cytometry* 1984; 5: 445-446.
- Hiebert SW, Chellappan SP, Horowitz JM, Nevins JR. The interaction of RB with E2F coincides with an inhibition of the transcriptional activity of E2F. *Genes Dev* 1992; 20: 5947-5954.
- Hinds P, Dowdy S, Ng-Eaton E, Arnold A, Weinberg RA. Function of a human cyclin as an Oncogene *Proc Natl Acad Sci USA* 1994a; 91: 709-713.
- Hinds P, Weinberg RA. Tumour suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev* 1994b; 4: 135-141.
- Hirano T, Franzen B, Kato H, Ebihara Y, Auer G. Genesis of squamous cell lung carcinoma. Sequential changes of proliferation, DNA ploidy and p53 expression. *Am J Pathol* 1994; 144: 296-302.
- Hitchcock CL, Norris AJ, Khalifa MA, Wargolz ES. Flow cytometric analysis of granulose tumours. *Cancer* 1989; 64: 2127-2132.
- Hitchcock CL, Norris HJ. Flow cytometric analysis of endometrial stromal sarcoma. *Am J Clin Pathol* 1992; 97: 267-271.
- Holloway SL, Glotzer M, King RW, Murray AW. Anaphase is initiated by proteolysis rather than by the inactivation of maturation-promoting factor. *Cell* 1993; 73: 1393-1402.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253: 49-53.
- Horowitz JM, Yandell DW, Park SH, et al. Point mutational inactivation of the retinoblastoma antioncogene. *Science* 1989; 243: 937-940.
- Hruban RH, Huvos AG, Traganos F, et al. Follicular neoplasms of the thyroid in men older than 50 years of age. *Am J Clin Pathol* 1990; 94: 527-532.
- Huang CI, Taki T, Higashiyama M, Kohno N, Miyake M. p16 protein expression is associated with a poor prognosis in squamous cell carcinoma of the lung. *Br J Cancer* 2000; 82(2): 374-80
- Hug EB, Donnelly SM, Shipley WU, et al. Deoxyribonucleic acid flow cytometry in invasive bladder carcinoma: A possible predictor for successful bladder preservation following transurethral surgery and chemotherapy-radiotherapy. *J Urol* 1992; 148: 47-51.
- Hughes JR. Genetics of smoking: A brief review *Behav Ther* 1986; 17: 335-45.

Inaba T, Matsushime H, Valentine M, Roussel MF, Sherr CJ, Look AT. Genomic organization, chromosomal localization, and independent expression of human cyclin D genes. *Genomics* 1992; 13: 565-574.

Ishida H, Irie K, Itoh T, Furukawa T, Tokunaga O. The prognostic significance of p53 and bcl-2 expression in lung adenocarcinoma and its correlation with Ki-67 growth fraction. *Cancer* 1997; 80: 1034-1045.

Ishihara S, Minato K, Hoshino H, Saito R, Hara F, Nakajima T, Mori M. The cyclin-dependent kinase inhibitor p27 as a prognostic factor in advanced non-small cell lung cancer: Its immunohistochemical evaluation using biopsy specimens. *Lung Cancer* 1999 Dec; 26(3): 187-94

Ishikawa J, Xu HJ, Hu SX, et al. Inactivation of the retinoblastoma gene in human bladder and renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1991; 51: 5736-5743.

Isobe H, Miyamoto H, Shimizu T, et al. Prognostic and therapeutic significance of the flow cytometric nuclear DNA content in non-small cell lung carcinoma. *Cancer* 1990; 65: 1391-1395.

Jacobsen A, Bichel P, Kristensen GB, Nyland M. Prognostic influence of ploidy level and histopathologic differentiation in cervical carcinoma stage Ib. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1988; 24: 969-972.

Janssen-Heijnen ML, Coebergh JW. Trends in incidence and prognosis of the histological subtypes of lung cancer in North America, Australia, New Zealand and Europe. *Lung Cancer* 2001 Feb-Mar; 31(2-3): 123-37.

Jaskulski D, Gatti C, Calabretta B, Baserga R. Regulation of the proliferating cell nuclear antigen/cyclin and thymidine kinase mRNA levels by growth factors. *J Biol Chem* 1988; 263: 10175-10179.

Jen J, Harper JW, Bigner SH, Bigner DD, Popodopoulos N, Markowitz S, et al. Deletions of p16 and p15 genes in brain tumours. *Cancer Res* 1994; 54: 6353-58.

Jiang W, Khan SM, Tomita N, Zhang YJ, Lu SH, Weinstein IB. Amplification and expression of the human cyclin D gene in oesophageal Cancer *Cancer Res* 1992; 52: 2980-2983.

Jiang W, Khan SM, Zhou P, et al. Overexpression of cyclin D1 in rat fibroblasts causes abnormalities in growth control, cell cycle progression and gene expression. *Oncogene* 1993; 8:3447-3457.

Kallioniemi O, Punnonen R, Mattila J, Lehtinen M, Koivula T. Prognostic significance of DNA index, multiploidy, and S phase fraction in ovarian cancer. *Cancer* 1988; 61: 334-339.

- Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumour types. *Science* 1994; 264: 436-440.
- Kawai T, Suzuki M, Kono S, Shinomiya N, Rokutanda M, Takagi K, et al. Proliferating cell nuclear antigen and ki-67 in lung carcinoma. Correlation with DNA flow cytometric analysis. *Cancer* 1994; 74: 2468-2475.
- Keum JS, Kong G, Yang SC, Shin DH, Park SS, Lee JH, Lee JD. Cyclin D1 overexpression is an indicator of poor prognosis in resectable non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 1999 Sep;81(1):127-32.
- Keyomarsi K, O'Leary N, Molnar G, Lees E, Fingert HJ, Pardee AB. Cyclin E, a potential prognostic marker for breast Cancer *Cancer Res* 1994; 54: 380-385.
- Killen JL, Namiki H. DNA analysis of ductal carcinoma *in situ* of the breast. *Cancer* 1991; 68: 2602-2607.
- Knudson AG. Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68: 820-823.
- Koff A, Giordano A, Desai D, et al. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G₁ phase of the human cell cycle. *Science* 1992; 257: 1689-1694.
- Koff A, Ohtsuki M, Polyak K, Roberts JM, Massague J. Negative regulation of G₁ in mammalian cells: Inhibition of cyclin E-dependent kinase by TGF- β . *Science* 1993; 260: 536-539.
- Kolodziejewski L, Niezabitowski A, Gasinska A. Clinical and flow cytometric prognostic factors in surgically treated squamous cell lung cancer. *Lung Cancer* 1997; 16: 173-182.
- Koniecki J, Nugent P, Kordowska J, Baserga R. Effect of SV40T antigen on the post-transcriptional regulation of the proliferating cell nuclear antigen and DNA polymerase- α genes. *Cancer Res* 1991; 51: 1465-1471.
- Konishi T, Lin Z, Fujino S, Kato H, Mori A. Association of p53 protein expression in stage I lung adenocarcinoma with reference to cytological subtypes. *Hum Pathol* 1997; 28: 544-548.
- Krishan A. Rapid flow cytofluorometric analysis of cell cycle distributions using propidium iodide. *J Cell Biol* 1975; 66: 188-193.
- Kurasomo Y, Ito T, Kameda Y, Nakamura N, Kitamura H. Expression of cyclin D1, retinoblastoma gene protein, and p16 MTS1 protein in atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma of the lung. An Immunohistochemical analysis. *Virchows Arch* 1998; 432: 207-215.
- Kurki P, Lotz M, Ogata K, Tan EM. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin in

activated human T-lymphocytes. *J Immunol* 1987; 138: 4114-4120.

Kurki P, Ogata K, Tan EM. Monoclonal antibodies to proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin as probes for proliferating cells by immunofluorescence microscopy and flow Cytometry. *J Immunol Methods* 1988; 109: 49-59.

Kwa HB, Michalides RJAM, Dijkman JH, Mooi WJ. The prognostic value of NCAM, p53 and cyclin D1 in resected non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 1996; 14: 207-17.

Lage JM, Weinberg DS, Huettnner PhC, Mark SD. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in ovarian tumours: Association of ploidy with tumour type, histologic grade, and clinical stage. *Cancer* 1992; 69: 2668-2675.

Lammie GA, Fantl V, Smith R, et al. D11S128, a putative oncogene on chromosome 11q13 is amplified and expressed in squamous cell and mammary carcinomas and lined to BCL-1. *Oncogene* 1991; 6:439-444.

Landberg G, Roos G. Flow cytometric analysis of proliferation associated nuclear antigens using washless staining of unfixed cells. *Cytometry* 1992; 13: 230-240.

Landberg G, Roos G: Antibodies to proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as S-phase probes in flow cytometric cell cycle analysis. *Cancer Res* 1991; 51: 4570-4574.

Landberg G, Tan EM, Roos G. Flow cytometric multiparameter analysis of proliferating cell nuclear antigen/cyclin and Ki-67 antigen: A new view of cell cycle. *Exp Cell Res* 1990; 187: 111-118

Lane DP, Benchimol S. p-53: Oncogene or anti-oncogene?. *Genes Dev* 1990; 4: 1-8.

Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 1979; 278: 261-263.

Lane DP. p53 and human cancers. *Br Med Bull* 1994; 50: 582-589.

Larsen JK, Chritensen IJ, Chritiansen J, Mortensen BT. Washless double staining of unfixed nuclei for flow cytometric analysis of DNA and a nuclear antigen (Ki-67 or bromodeoxyuridine). *Cytometry* 1991; 12: 429-437.

Leach FS, Elledge SJ, Sherr CJ, Willson JK, Markowitz, S, Kinzler KW, Vogelstein B. Amplification of cyclin genes in colorectal carcinomas. *Cancer* 1993; 53: 1986-1989.

Lee JS, Yoon A, Kalapurakal SK, Ro JY, Lee JJ, Tu N, Hittelman WN Hong WK. Expression of p53 oncoprotein in non-small-cell lung cancer: A favourable prognostic factor. *J Clin Oncol* 1995; 13: 1893-1903.

Lee SE, Currin SM, Paulson DF, Walther PJ. Flow cytometric determination of ploidy in prostatic adenocarcinoma: A comparison with seminal vesicle involvement and

histopathological grading as a predictor of clinical recurrence. *J Urol* 1988; 140: 769-774.

Lenner P, Roos G, Johansson H, Lindh J, Dige U. Non-hodgkin's lymphoma. Multivariate analysis of prognostic factors including fraction of S-phase cells. *Acta Oncol* 1987; 26: 179-183.

Leube RE, Wiedmann B, Franke WW. Differentiation markers as an aid in the histological diagnosis of small cell carcinoma of the lung: Synopsis of intermediate filament protein and synaptophysin expression. *Klin Wochenschr* 1988; 66 (suppl XI): 80.

Levi F, Luchini F, Negri E, La Vecchia C. Worldwide patterns of cancer mortality, 1990-1994. *Eur J Cancer Prev* 1999; 8(5): 381-400.

Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991; 351:453-456.

Levine AJ, Perry ME, Chang A, et al. The 1993 Walter Hubert Lecture: The role of the p53 tumour-suppressor gene in tumorigenesis. *Br J Cancer* 1994; 69: 409-416.

Levine DS, Rabinovitch PS, Haggitt RC, et al. Distribution of aneuploid cell populations in ulcerative colitis with dysplasia or cancer. *Gastroenterology* 1991; 101: 1198-1210.

Li R, Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. Different effects of the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature* 1994; 371: 534-537.

Linzer DI, Levine AJ. Characterization of a 54 K dalton cellular SV40 tumour antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 1979; 17: 43-52.

Liu Q, Yan YX, McClure M, Nakagawa H, Fujimura F, Rustgi AK. MTS1 (CDKN2) tumour suppressor gene deletions are a frequent event in oesophagus squamous cancer and pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Oncogene* 1995; 10: 619-622.

Ljungberg B, Forsslund G, Stenling R, Zetterberg A. Prognostic significance of the DNA content in renal cell carcinoma. *J Urol* 1986; 135: 422-426.

Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Fiorentino M, Draetta GF, et al. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat Med* 1997; 3: 231-4.

Look AT, Hayes FA, Nitschke R. Cellular DNA content as a predictor of response to chemotherapy of infants with unresectable neuroblastoma. *N Engl J Med* 1984; 311: 231-235.

Lovec H, Grzeschiczek A, Kowalski M, Moroy T. Cyclin D1/Bcl-1 co-operates with myc genes in the generation of B-cell lymphoma in transgenic mice. *EMBO J* 1994b; 13: 3487-

3495.

Lovec H, Sewing A, Lucibello F, Mueller R, Moroy T. Oncogenic activity of cyclin D1 revealed through co-operation with Ha-Ras: Link between cell cycle control and malignant transformation. *Oncogene* 1994a; 9: 323-326.

Lux SE, John KM, Bennett V. Analysis of cDNA for human erythrocyte ankyrin indicates a repeated structure with homology to tissue-differentiation and cell-cycle control proteins. *Nature* 1990; 344: 36-42.

Madsen P, Celis J. S-phase patterns of cyclin (PCNA) antigen staining resemble topographical patterns of DNA synthesis: A role for cyclin in DNA replication? *FEBS Lett* 1985; 193:5-11.

Maneckjee R, Minna J. Opioid and nicotin receptors affect growth regulation of human lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 3294-3298.

Marchetti A, Doglioni C, Barbareschi M, Buttitta F, Pellegrini S, Gaeta P, et al.. Cyclin D1 and retinoblastoma susceptibility gene alterations in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 1998 Jan 19;75(2):187-92.

Mate JL, Ariza A, Aracil C, Lopez D, Isamat M, Perez-Piteira J, Navas-Palacios JJ. Cyclin D1 overexpression in non-small-cell lung carcinoma: Correlation with Ki-67 labelling index and poor cytoplasmic differentiation. *J Pathol* 1996; 180: 395-399.

Mayall BR. Cytometry in the clinical laboratory: Quo vadis?. *Ann NY Acad Sci* 1986; 468: 1-17.

McDuffie HH, Klaassen DJ, Dosman JA: Female-male differences in patient with primary lung cancer. *Cancer* 1987; 59: 1825-1830.

McLaren R, Kuzu I, Dunnill M, Harris A, Lane D, Gatter KC. The relationship of p53 immunostaining to survival in carcinoma of the lung. *Br J Cancer* 1992; 66: 735-738.

Mercer WE, Shields MT, Ling D, Appella E, Ullrich SJ. Growth suppression induced by wild-type p53 protein is accompanied by selective down-regulation of proliferating -cell nuclear antigen expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 1958-1962.

Milner J. Different forms of p53 detected by monoclonal antibodies in non dividing and dividing lymphocytes. *Nature* 1984; 310: 143-145.

Mishina T, Dosaka-Akita H, Honmura F, Nishi M, Kojima T, Ogura S et al. Cyclin E expression, a potential prognostic marker for non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* 2000; 6(1): 11-6.

Mishina T, Dosaka-Akita H, Kinoshita I, Hommura F, Morikawa T, Katoh H, Kawakami Y. Cyclin D1 expression in non-small cell lung cancers: Its association with altered p53

expression, cell proliferation and clinical outcome. *Br J Cancer* 1999; 80 (8): 1289-1295

Mitsudomi T, Hamjima N, Ogawa M, Takahashi T. Prognostic significance of p53 alterations in patients with non-small cell lung cancer: A meta-analysis. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4055-63.

Mitsudomi T, Lylama T, Kqsano T et al. Mutations of the p53 gene as predictor of poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1993; 34: 516

Miura H, Taira O, Hiraguri S, Hagiwara M, Kato H. Intratumoral heterogeneity of DNA content in lung adenocarcinoma. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg* 1998 Aug; 46 (8): 712-8.

Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 1978; 121: 2228-2234.

Miyamoto H, Harada M, Isobe H, Akita HD, Haneda H, Yamaguchi E, Kuzumaki N, Kawakami Y. Prognostic value of nuclear DNA content and expression of the ras oncogene product in lung cancer. *Cancer Res* 1991; 51: 6346-6350.

Mizobuchi K, Fujita Y, Hashikura H, Arimoto T, Nakagaki Y, Goto T, Fujii T, Iwasaki Y, Nakamura T, Nakagawa M. Detection of intratumoral DNA heterogeneity in primary lung cancer using a multiple sampling method. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 1994 Oct ; 32 (10): 963-9.

Mohler JL, Partin AW, Epstein JI, et al. Prediction of prognosis in untreated stage A2 prostatic carcinoma. *Cancer* 1992; 69: 511-519.

Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ. The mdm-2 oncogen product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53 mediated transactivation. *Cell* 1992; 63: 1237-1245.

Montgomery BT, Nativ O, Blute ML, et al. Stage B prostate adenocarcinoma. Flow cytometric nuclear analysis. *Arch Surg* 1990; 125: 327-331.

Morabia A, Wynder EL. Dietary habits of smokers, people who never smoked, and exsmokers. *Am J Clin Nutr* 1990; 52: 923-7.

Mori N, Yokota J, Akiyama T, et al. Variable mutations of the retinoblastoma gene in small-cell lung carcinoma. *Oncogene* 1990; 5: 1713-1717.

Mørkve O, Halvorsen OJ, Stangeland L, Gulsvik A, Laerum OD. Quantitation of biological tumour markers (p53, c-myc, Ki-67 and DNA ploidy) by multiparameter flow cytometry in non-small-cell lung Cancer *Int J Cancer* 1992; 52: 851-855.

Mørkve O, Laerum OD. Flow cytometric measurement of p53 protein expression and DNA content in paraffin-embedded tissue from bronchial carcinomas. *Cytometry* 1991; 12: 438-

444.

Morris GF, Matthews MB. Regulation of proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle. *J Biol Chem* 1989; 264: 13856-13864.

Motokura T, Keyomarsi K, Kronenberg HM, Arnold A. Cloning and characterisation of human cyclin D3, a cDNA closely related in sequence to the PRAD1/ cyclin D1 proto-oncogene. *J Biol Chem* 1992; 267: 20412-20415

Mountain CF. A new International Staging System for Lung Cancer. *Chest* 1986; 89: 225S-232S.

Mountain CF. The new International Staging System for Lung Cancer. *Surg Clin North Am* 1987; 67: 925-935.

Mountain CF. Revisions in the international system for staging lung cancer. *Chest* 1997 Jun; 111(6): 1710-1717.

Mugüerza JM, Diez M, Torres AJ, Lopez-Asenjo JA, Picardo AL, Gomez A, Hernado F, Cayon R, Granell J, Balibrea JL. Prognostic value of flow cytometric DNA analysis in non-small-cell lung cancer: Rationale of sequential processing of frozen and paraffin-embedded tissue. *World J Surg* 1997; 21: 323-329.

Müller H, Lukas J, Schneider A, et al. Cyclin D1 expression is regulated by the retinoblastoma protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2945-2949.

Muller-Tidow C, Metzger R, Kugler K, Diederichs S, Idos G, Thomas M, et al. Cyclin E is the only cyclin-dependent kinase 2-associated cyclin that predicts metastasis and survival in early stage non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2001; 15; 61(2): 647-53.

Murakami Y, Hayashi K, Hirohashi S, Sekiya T. Aberrations of the tumour suppressor p53 and retinoblastoma (Rb) genes in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* 1991; 51: 5520-5525.

Murray AW. Creative blocks: Cell-cycle checkpoints and feedback control. *Nature* 1992; 359:599-604.

Nativ O, Winkler HZ, Raz Y, et al. Stage C prostatic adenocarcinoma: Flow cytometric nuclear DNA ploidy analysis. *Mayo Clin Proc* 1989; 64: 911-919.

Nguyen VN, Mirejovsky P, Mirejovsky T, Melinova L, Mandys V. Expression of cyclin D1, Ki-67 and PCNA in non-small cell lung cancer: Prognostic significance and comparison with p53 and bcl-2. *Acta Histochem* 2000 Aug; 102 (3): 323-38

Nigg EA. Cellular substrates of p34^{cdc2} and its companion cyclin-dependent kinases. *Trends Cell Biol* 1993; 3: 296-301.

Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 1989; 342: 705-708.

Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 1994; 368: 753-756.

Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereira-Smiths OM, Smith JR. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res* 1994; 211: 90-98.

Norbury C, Nurse P. Animal cell cycles and their control. *Ann Rev Biochem* 1992; 61: 441-470.

Nurse P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 1990; 344: 503-508.

Ogata K, Kurki P, Celis JE, Nakamura RM, Tan EM. Monoclonal antibodies to a nuclear protein (PCNA/Cyclin) associated with DNA replication. *Exp Cell Res* 1987; 168: 475-486.

Ohtsubo M, Roberts J. Cyclin dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts. *Science* 1993; 259: 1908.

Oka K, Hoshi T, Arai T. Prognostic significance of the PC10 index as a prospective assay for cervical cancer treated with radiation therapy alone. *Cancer* 1992; 70: 1545-1550.

Okamoto A, Demetrick DJ, Spillare EA, Hagiwara K, Hussain SP, Bennett WP, et al. Mutations and altered expression of p16^{CDK2} in human cancer. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91: 11045-49.

Okamoto A, Hussain SP, Hagiwara K, Spillare EA, Rusin MR, Demetrick DJ et al. Mutations in the p16^{INK4/MTS1/CDKN2}, p15^{INK4B/MTS2}, and p18 genes in primary and metastatic lung cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 1448-51.

Ottavio L, Chang CD, Rizzo MG, Travali S, Casadevall C, Baserga R.. Importance of introns in the growth regulation of mRNA levels of the proliferating cell nuclear antigen gene. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 303-309.

Oyama T, Mitsudomi T, Mizoue T, Ohgami A, Osaki T, Nakanishi R, Yasumoto K. Proliferating cell nuclear antigen may be superior to argyrophilic nucleolar organizer regions in predicting shortened survival of patients with non-small cell lung cancer. *Surg Oncol* 1995; 4: 83-89.

Pagano M, Pepperkok R, Lukas J, et al . Regulation of the cell cycle by the cdk2 protein kinase in cultured human fibroblasts. *J Cell Biol* 1993; 121: 101-111.

Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Ansorge W, Draetta G. Cyclin A is required at two points

in the human cell cycle. *EMBO J* 1992; 11:961-971.

Parkin DM, Läärä E, Muir CS. Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancers in 1980. *Int J Cancer* 1988; 41: 184-197.

Passlick B, Izbicki JR, Haussinger K, Thetter O, Pantel K. Immunohistochemical detection of p53 protein is not associated with a poor prognosis in non-small-cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995a; 109: 1205-1211.

Passlick B, Izbicki JR, Riethmuller G et al. p53 in non-small-cell lung cancer : A favourable prognostic factor. *J Clin Oncol* 1995b; 13: 1893-1903.

Pastorino U, Andreola S, Tagliabue E, Pezzella F, Incarbone M, Sozzi G, Buyse M, Menard S, Pierotti M, Rilke F. Immunocytochemical markers in stage I lung cancer: Relevance to prognosis. *J Clin Oncol* 1997; 15: 2858-2865.

Pence JC, Kerns BJM, Dodge RK, Iglehart JD. Prognostic significance of the proliferation index in surgically resected non-small-cell lung cancer. *Arch Surg* 1993; 128: 1382-1390.

Perry ME, Piette J, Zawadzki JA, Harvey D, Levine AJ. The mdm-2 gene is induced in response to UV light in a p53-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11623-11627.

Pershagan G, Hrubec Z, Svensson C. Passive smoking and lung cancer in Swedish women. *Am J Epidemiol* 1987; 125: 17-24.

Pines J. Cell cycle. P21 inhibits cyclin shock. *Nature* 1994; 369: 520-521.

Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Estimates of worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999 Sep 24; 83 (1): 18-29.

Pla de salut de Catalunya 1993- 1995.

Polyak K, Kato J-Y, Salomon MJ, et al. p27kip1, a cyclin-cdk inhibitor, links transforming growth factor- β and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 1994a; 8: 9-22.

Polyak K, Lee M-H, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Massague J. Cloning of p27kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 1994b; 78: 59-66.

Prelich G, Kostura M, Marshak DR, Mathews MB, Stillman B. The cell-cycle regulated proliferating cell nuclear antigen is required for SV40 DNA replication in vitro. *Nature (Lond)* 1987a; 326: 471-475.

Prelich G, Tan CK, Kostura M, et al. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and DNA polymerase- δ auxiliary protein. *Nature* 1987b; 326: 517-520.

Pujol JL, Simony J, Jolimoy G, Demoly P, Quantin X, Marty-Ane C, Boher JM, Charpentier R, Michel FB. Hypodiploidy, Ki-67 growth fraction and prognosis of surgically resected lung cancers. *Br J Cancer* 1996; 74: 964-970.

Quinlan DC, Davidson AG, Summers CL, Warden HE, Doshi HM. Accumulation of p53 protein correlates with a poor prognosis in human lung cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 4828-4831.

Reed SI. The role of p34 kinases in the G1 to S-phase transition. *Annu Rev Cell Biol* 1992; 8: 529-561.

Reich NC, Levine AJ. Growth regulation of cellular tumour antigen p53, in non transformed cells. *Nature* 1984; 308: 199-201.

Reissmann PT, Simon MA, Lee WH, Slamon DJ. Studies of the retinoblastoma gene in human sarcomas. *Oncogene* 1989; 4: 839-843.

Rice TW, Bauer TW, Gephardt GN, Medendrop SV, McLain DA, Kirby TJ. Prognostic significance of flow cytometry in non-small-cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 106: 210-217.

Richard S, Yoshinori M, Masahiko S, Kenshi H, Takao S. DNA aberrations at the retinoblastoma gene locus in human squamous cell carcinomas of lung. *Oncogene* 1994; 9: 39-47.

Ritchie AW, Dorey F, Layfield LJ, Hannah J, Lovrekovich H, deKernion JB. Relationship of DNA content to conventional prognostic factors in clinically localised carcinoma of the prostate. *Br J Urol* 1988; 62: 245-260.

Roberts JM. Turning DNA replication on and off. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5:201-206.

Roos R, Dige U, Lenne P, et al. Prognostic significance of DNA-analysis by flow cytometry in non-Hodgkin's lymphoma. *Hematol Oncol* 1985; 3: 233-242.

Rosell R, Pifarre A, Monzo M, Astudillo J, Lopez-Cabrerizo MP, Calvo R, Moreno I, Sanchez-Cespedes M, Font A, Navas-Palacios JJ. Reduced survival in patients with stage-I non-small-cell lung cancer associated with DNA-replication errors. *Int J Cancer* 1997; 74: 330-334.

Rusin MR, Okamoto A, Chorazy M, Czyzewski K, Harasim J, Spillare EA, et al. Intragenic mutations of the p16(INK4), p15(INK4B) and p18 genes in primary non-small-cell lung cancers. *Int J Cancer* 1996 Mar 15;65(6):734-9.

Rustgi AK, Dyson N, Bernards R. Amino-terminal domains of c-myc and n-myc proteins mediate binding to the retinoblastoma gene product. *Nature* 1991; 352: 541-544.

Sabiston DC. Carcinoma of the lung. In: Sabiston DC, Spencer FC (eds) *Surgery of the*

Chest. Philadelphia: WB Saunders, 1990; 65: 530-537.

Sahin AA, Ro JY, el-Naggar AK, et al. Flow cytometric analysis of the DNA content of non-small cell lung cancer. *Cancer* 1990; 65: 530-537.

Saitoh G, Sugio K, Ishida T, Sugimachi K. Prognostic significance of p21waf1 , cyclin D1 and retinoblastoma expression detected by immunohistochemistry in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2001; 8(4): 737-743.

Sara A, El-Naggar AK. Intratumoral DNA content variability. A study of non-small cell lung cancer. *Am J Clin Pathol* 1991 Sep; 96 (3): 311-317.

Sasaki K, Murakami T, Kawasaki M, Takahashi M. The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive nuclear antigen expression . *J Cell Physiol* 1987; 133: 579-584.

Scagliotti GV, Micela M, Gubetta L, Leonardo E, Cappia S, Borasio P, Pozzi E. Prognostic significance of Ki-67 labelling in resected non small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 1993; 29: 363-365.

Schabath MB, Spitz MR, Zhang X, Delclos GL, Wu X. Genetic variants of myeloperoxidase and lung cancer risk. *Carcinogenesis* 2000 Jun; 21 (6): 1163-6.

Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by papillomavirus types 16 and 18 promotes degradation of p53. *Cell* 1990; 63: 1129-1136.

Schmidt RA, Rusch VW, Piantadosi S. A flow cytometric study of non-small cell lung cancer classified as T1N0. *Cancer* 1992; 69: 78-85.

Seike M, Gemma A, Hosoya Y, Hemmi S, Taniguchi Y, Fukuda Y, Yamanaka N, Kudoh S. Increase in the frequency of p16INK4 gene inactivation by hypermethylation in lung cancer during the process of metastasis and its relation to the status of p53. *Clin Cancer Res* 2000 Nov; 6 (11): 4307-13.

Sellers TA, Bailey-Wilson JE, Elston RC, et al: Evidence for mendelian inheritance in the pathogenesis of lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 1272-1279.

Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclin D/cdk4. *Nature* 1993; 366: 704-707.

Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997; 88: 593-602.

Sherr CJ. G1 phase progression: Cycling on cue. *Cell* 1994;79: 551-555.

Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded

tissues: An enhancement method for Immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1991; 39: 741-748.

Shipman-Appasamy P, Cohen KS, Prystowsky MB. Interleukin 2-induced expression of proliferating cell nuclear antigen is regulated by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem* 1990; 265: 19180-19184.

Slingerland JM, Hengst L, Pan CH, Alexander D, Stampfer MF, Reed SI. A novel inhibitor of cyclin-cdk activity detected in transforming growth factor β -arrested epithelial cells. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 3683-3694.

Smetana K, Gyorkey F, Chan PK, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and human malignant tumour nucleolar antigens (HMTNA) in nucleoli of human haematological malignancies. *Blut* 1983; 46: 133-141.

Smith ML, Chen IT, Zhen Q, et al. Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science* 1994; 266: 1376-1380.

Soomro IN, Whimster WF. Growth fraction in lung tumours determined by Ki-67 immunostaining and comparison with Ag-NOR scores. *J Pathol* 1990; 162: 217-222.

Sorensen JB, Hirsch FR, Olsen J. The prognostic implication of histopathologic subtyping of pulmonary adenocarcinoma according to the classification of the World Health Organization. *Cancer* 1988; 62: 361-367.

Soussi T, Caron de Fromentel C, Mechali M, May P, Kress M. Cloning and characterization of a cDNA from *Xenopus laevis* coding for a protein homologues to human and murine p53. *Oncogene* 1987; 1: 71-78.

Stanley KE. Lung cancer and tobacco: A global problem. *Cancer Detect* 1986; 9: 83-89.

Steinmetz KA, Potter JD. Vegetables, fruit and cancer I *Epidemiology Cancer Causes Control* 1991; 2: 325-7.

Stipa S, Tirindelli-Danesi D, Mondini C, Cicconetti F, Mauro F, Schillaci A, Mecozzi A, Nicolanti V, Stipa F, Mancini M, Bangrazi C, Botti C. The importance of heterogeneity and of multiple site sampling in the prospective determination of deoxyribonucleic acid flow cytometry. *Surg Gynecol Obstet* 1993; 176: 427-434.

Suzuka I, Daidoji H, Matsuoka M, et al. Gene for proliferating-cell nuclear antigen (DNA polymerase- δ auxiliary protein) is present in both mammalian and higher plant genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 3189-3193.

Takasaki Y, Deng JS, Tan EM. A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation: Its distribution in synchronized cells. *J Exp Med* 1981; 154: 1899-1909.

- Takasaki Y, Fishwild D, Tan EM. Characterization of proliferating cell nuclear antigen recognized by autoantibodies in Lupus sera. *J Exp Med* 1984b; 159: 981-992.
- Takasaki Y, Robinson WA, Tan EM. Proliferating cell nuclear antigen in blast crisis cells of patients with chronic myeloid leukaemia. *J Natl Cancer Inst* 1984a; 73: 655-661.
- Takeuchi S, Mori N, Koike M, Slater J, Park S, Miller CW et al. Frequent loss of heterozygosity in region of the KIP1 locus in non-small cell lung cancer: Evidence for a new tumour suppressor gene on the short arm of chromosome 12. *Cancer Res* 1996; 56: 738-40
- Takise A, Kodama T, Shimosato Y, et al. Histopathologic prognostic factors in adenocarcinomas of the peripheral lung less than 2 cm in diameter. *Cancer* 1988; 61: 2083-2088.
- Tam SW, Shay JW, Pagano M. Differential expression and cell cycle regulation of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor p16^{INK4}. *Cancer Res* 1994b; 54: 5816-5820.
- Tam SW, Theodoras AM, Shay JW, Draetta GF, Pagano M. Differential expression and regulation of cyclin D1 protein in normal and tumour human cells: Association with cdk4 is required for cyclin D1 function in G₁ progression. *Oncogene* 1994a; 9: 2663-2674.
- Tan CK, Castillo C, So AG, Downey KM. An auxiliary protein for DNA polymerase- δ from foetal calf thymus. *J Biol Chem* 1986; 261: 12310-12316.
- Tanaka I, Masuda R, Furuhashi Y, Inoue M, Fujiwara M, Takemura T. Flow cytometric analysis of the DNA content of adenocarcinoma of the lung, especially for patients with stage I disease with long term follow-up. *Cancer* 1995; 75: 2461-2465.
- Task force on Lung Cancer: Staging of lung cancer 1979. In American Joint Committee for Cancer Staging and End Results Reporting: Manual of Staging of lung Cancer Chicago, American Joint Committee, 1979.
- Teague K, El-Naggar A. Comparative flow cytometric analysis of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) antibodies in human solid neoplasms. *Cytometry* 1994; 15: 21-27.
- Teodori L, Tirindelli-Danesi D, Mauro F, De Vita R, et al. Non-small cell lung carcinoma: Tumour characterization on the basis of flow cytometrically determined cellular heterogeneity. *Cytometry* 1983; 4: 174-183.
- Teodori L, Trinca ML, Salvatti F, Berettoni L, Storniello G, Gohde W. Cellular heterogeneity of DNA/total-protein content in human lung tumours, as determined by flow cytometry. *Int J Cancer* 1992 Apr 1; 50(6): 845-53.
- Theunissen PH, Leers MP, Bollen EC. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in formalin-fixed tissue of non-small cell lung carcinoma. *Histopathology* 1992; 20: 251-255.

Tinnemans MM, Lenders MH, ten Velde GP, Wagenaar SS, Blijham GH, Ramaekers FC, Schutte B. Evaluation of proliferation parameters in vivo bromodeoxyuridine labelled lung cancers. *Virchows Arch* 1995; 427: 295-301.

Tirindelli-Danesi D, Teodori L, Mauro F, et al. Prognostic significance of flow cytometry in lung cancer. A 5-year study. *Cancer* 1987; 60: 844-851.

Tokuhashi GK, Lilienfeld AM: Familial aggregation of lung cancer in humans. *J Natl Cancer Inst* 1963; 30: 289-312.

Totoshima H, Hunter T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 1994; 78: 67-74.

Travali S, Ferber A, Reis K et al. Effect of the myb gene product on expression of the PCNA gene in fibroblasts. *Oncogene* 1991; 6: 887-894.

Tribukait B. Flow cytometry in assessing the clinical aggressiveness of genito-urinary neoplasms. *World Journal of Urology* 1987; 5: 108-122.

Tsuruta H, Sakamoto H, Onda M, Terada M. Amplification and overexpression of EXP1 and EXP2/cyclin D1 genes in human oesophageal carcinomas. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 196: 1529-1536.

Tungekar MF, Gatter KC, Dunnill MS and Mason DY. Ki-67 immunostaining and survival in operable lung cancer. *Histopathology* 1991;19: 545-550.

Umehara Y, Kimura T, Yoshida M, Oba N, Harada Y. Comparison of flow cytometric DNA content in primary gastric carcinoma and metastases. *J Surg Oncol* 1992; 50: 156-160.

Van Bodegom PC, Baak JPA, Stroet-Van Galen C, Schipper NW, Wisse-Brekelmans ACM, Vanderschueren RGJRA, Wagenaar SSC. The percentage of aneuploid cells is significantly correlated with survival in accurately staged patients with stage I resected squamous cell lung cancer and long-term follow-up. *Cancer* 1989; 63: 143-147.

Van den Heuvel S, Harlow E. Distinct roles for cyclin -dependent kinases in cell cycle control. *Science* 1993; 262: 2050-2054.

Van Dierendonck JH, Wijsman JH, Keijzer R, van de Velde CJH, Cornelisse CJ. Cell cycle-related staining patterns of anti-proliferating cell nuclear antigen monoclonal antibodies *Am J Pathol* 1991; 138: 1165-1172.

Vega FJ, Iñesta P, Caldes T, Sanchez A, Lopez JA, de Juan C, et al. P53 exon 5 mutations as a prognostic indicator of shortened survival in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 1997; 76: 44-51.

Verde F, Dogterom M, Stelzer E, Karsenti E, Leibler S. Control of microtubule dynamics

and length by cyclin A- and cyclin B-dependent kinases in *Xenopus* egg extracts. *J Cell Biol* 1992; 118: 1097-1108.

Viberti L, Papotti M, Abbona GC, Celano A, Filosso PL, Bussolati G. Value of Ki-67 immunostaining in preoperative biopsies of carcinomas of the lung. *Hum Pathol* 1997; 28: 189-192.

Vindeløv LL, Christensen IJ, Nissen NI. A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* 1983; 3: 323-327.

Visakorpi T, Kallioniemi OP, Paronen IY, Isola JJ, Heikkinen AI, Koivula TA. Flow cytometric analysis of DNA ploidy and S-phase fraction from prostatic carcinomas: Implications for prognosis and response to endocrine therapy. *Br J Cancer* 1991; 64: 578-582.

Volm M, Back M, Hahn EW, Mattern J, Weber E. DNA and S-phase distribution and incidence of metastasis in human primary lung carcinoma. *Cytometry* 1988a; 9: 183-188.

Volm M, Efferth T, Mattern J. Oncoprotein (c-myc, c-erbB1, c-erbB2, c-fos) and supressor gene product (p53) expression in squamous cell carcinomas of the lung. Clinical and biological correlations. *Anticancer Res* 1992; 12: 11-20.

Volm M, Hahn EW, Mattern J, Muller T, Vogt-Moykopf I, Weber E. Five-year follow-up study of independent clinical and flow cytometric prognostic factors for the survival of patients with non-small-cell lung carcinoma. *Cancer Res* 1988b; 48: 2923-2928.

Volm M, Mattern J, Sonka J, Vogt-Schaden M, Wayss K. DNA distribution in non-small-cell lung carcinomas and it's relationship to clinical behaviour. *Cytometry* 1985; 6: 348-56.

Volm M, Mattern J, Muller T, Drings P. Flow cytometry of epidermoid lung carcinomas: Relationship of ploidy and cell cycle phases to survival. A five-year follow up study. *Anticancer Res* 1988c; 8: 105-112.

Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. The p21 inhibitor of cyclin -dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 1994; 369: 574-578.

Wald N, Namchahal K, Thompson S, et al. Does breathing other people's tobacco smoke cause lung cancer? *Br Med J* 1986; 293: 1217-1222.

Waseem NH, Lane DP. Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) structural conservation and the detection of a nucleolar form. *J Cell Sci* 1990; 96: 121-129.

Weaver DL, Bagwell CB, Hitchcox SA, Wetstone SD, Baker DR, Herbert DJ, Jones MA. Improved flow cytometric determination of proliferative activity (S-phase fraction) from paraffin-embedded tissue. *Am J Clin Pathol* 1990; 94: 576-584.

Wheless LL, Coon JS, Cox C, et al. Precision of DNA flow cytometry in inter-institutional analysis. *Cytometry* 1991; 12: 405-412.

Wilcock D, Lane DP. Localisation of p53, retinoblastoma and host replication proteins at sites of viral replication in herpes-infected cells. *Nature* 1991; 349: 429-432.

Wilson GD, Camplejohn RS, Martindale CA, Brock A, Lane DP, Barnes DM. Flow cytometric characterisation of proliferating cell nuclear antigen using the monoclonal antibody PC10. *Eur J Cancer* 1992; 28(A): 2010-2017.

Witzig TE, Loprinzi CL, Gonchoroff NJ, et al. DNA ploidy and cell kinetic measurements as predictors of recurrence and survival in stages B2 and C colorectal adenocarcinoma. *Cancer* 1991; 68: 879-888.

Woods AL, Hall PA, Shepherd NA, et al. The assessment of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining in primary gastrointestinal lymphomas and its relationship to histological grade, S+G₂+M phase fraction (flow cytometric analysis) and prognosis. *Histopathology* 1991; 19: 21-27.

World Cancer Research Fund. Food nutrition and the prevention of cancer: A global perspective. World Cancer Research Fund/ American Institute for cancer Research. Washington DC, 1997.

World Health Organization Histological Typing of Lung Tumours, 2nd ed. *Am J Clin Pathol* 1982; 77: 123-136.

Xiao S, Li D, Corson JM, Vijg J and Fletcher JA. Deletion of p15 and p16 genes in primary non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 1995; 55: 2968-71.

Xiong Y, Zhang H, Beach D. D-type cyclins associate with multiple protein kinases and DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* 1992; 71: 505-514.

Xiong Y, Zhang H, Beach D. Subunit rearrangement of the cyclin-dependent kinases is associated with cellular transformation. *Genes Dev* 1993a;7: 1572-1583.

Xiong Y, Hannon GJ, Zhang GJ, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993b; 366: 701-704.

Yamanouchi H, Furihata M, Fujita J, Murakami H, Yoshinouchi T, Takahara J Ohtsuki Y. Expression of cyclin E and cyclin D1 in non-small cell lung cancers. *Lung Cancer* 2001 Jan;31(1): 3-8.

Yang WI, Chung KY, Shin DH, Kim YB. Cyclin D1 protein expression in lung cancer. *Yonsei Med J* 1996; 37: 142-50.

Yatabe Y, Masuda A, Koshikawa T, Nakamura S Kuroishi T, Osada H, et al. p27 KIP 1 in human lung cancers: Differential changes in small cell and non-small cell carcinoma.

Cancer Res 1998; 58: 1042-7.

Yokota J, Akiyama T, Fung YKT, et al. Altered expression of the retinoblastoma gene in small-cell carcinoma of the lung. *Oncogene* 1988; 3: 471-475.

Yonemura Y, Oyama S, Miyazaki I, et al. Retrospective analysis of the prognostic significance of DNA ploidy patterns and S-phase fraction in gastric carcinoma. *Cancer Res* 1990; 50: 509-514.

Yonemura Y, Sugiyama K, Miyazaki I, et al. Correlation of DNA ploidy and proliferative activity in human gastric cancer. *Cancer* 1988; 62: 1492-1509.

Yoshida K, Morinaga S, Shimosato Y, et al. A cell kinetic study of pulmonary adenocarcinoma by an immunoperoxidase procedure after bromodeoxyuridine labelling. *Cancer* 1989; 64: 2284-2291.

Zhang H, Hannon GJ, Beach D. p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev* 1994; 8: 1750-1758.

Ziegler RG, Mayne ST, Swanson CA. Nutrition and lung cancer. *Cancer Causes Control* 1996; 7: 157-77.

Zimmerman PV, Bint MH; Hawson GAT, Persons PG. Ploidy as a prognostic determinant in surgical treated lung cancer. *Lancet* 1987; 2: 530-533.

Zinche H, Bergstralh EJ, Larson-Keller JJ, et al. Stage D1 prostate cancer treated by radical prostatectomy and adjuvant hormonal treatment. Evidence for valuable survival in patients with DNA diploid tumours. *Cancer (suppl 1)* 1992; 70: 311-323.