

Detección tisular de mutaciones K-ras en cáncer de pulmón: contribución a los resultados de CEA y CYFRA 21-1 en suero. Resultados preliminares*

J. Mora¹, G. Gómez², S. Martínez¹, E. Urgell¹, E. Zapico¹, L. Comas¹, R. Boluda¹, A. Antonijuan¹, F. González-Sastre¹.

Resumen

Objetivo: Evaluar mediante dos técnicas de diferente sensibilidad la detección de mutaciones K-ras en muestras de tumores pulmonares y valorar su contribución a la información aportada por el CEA y CYFRA 21-1 séricos.

Material y métodos: Se obtuvieron 42 muestras de tejido tumoral pulmonar. Los diagnósticos histológicos fueron 14 adenocarcinomas, 19 escamosos y 9 de células grandes. La detección de mutaciones en el codón 12 del gen K-ras se realizó mediante dos métodos RFLP/PCR para BstNI: de sensibilidad estándar y de alta sensibilidad. Las determinaciones de CEA y CYFRA 21-1 se realizaron mediante inmunoanálisis.

Resultados: La mutación K-ras se detectó en 5 de los 14 (36%) adenocarcinomas estudiados. No hubo diferencias entre los dos métodos. No se detectaron mutaciones en los restantes tipos histológicos. CEA presentó mayor sensibilidad diagnóstica que CYFRA 21-1 en adenocarcinomas (50%), mientras que la de CYFRA 21-1 fue superior en el tipo escamoso (37%). La combinación con el marcador molecular K-ras incrementó la sensibilidad conjunta de CEA y CYFRA 21-1 hasta un 79% en el grupo de adenocarcinomas.

Conclusiones: La presencia de una mutación K-ras en una muestra de tejido pulmonar es altamente sugestiva de adenocarcinoma e incrementa la sensibilidad diagnóstica de los marcadores séricos.

Palabras Clave: K-ras, cáncer de pulmón no microcítico, CEA, CYFRA 21-1, polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP).

Summary: Tissue detection of K-ras mutations in lung cancer: contribution to serum CEA and CYFRA 21-1 measurements. Preliminary results.

Purpose: To evaluate the clinical utility of K-ras mutation analysis in tissue samples from non-small cell lung cancer, using two techniques of different sensitivity and to assess its contribution to serum CEA and CYFRA 21-1 measurements.

Material and methods: 42 lung tumour tissue samples were obtained. Tumours were classified as 14 adenocarcinomas, 19 squamous cell carcinomas and 9 large cell carcinomas. K-ras codon 12 mutations were analysed using two RFLP/PCR methods with standard and high sensitivity. CEA and CYFRA 21-1 were measured by immunoassay.

Results: K-ras mutations were detected in 5 of 14 (36%) adenocarcinomas. No differences between methods were observed. No mutations were detected in the other histological subtypes. CEA showed higher sensitivity than CYFRA 21-1 in adenocarcinomas (50%) while CYFRA 21-1 was superior in the squamous cell group (37%). The combination with K-ras increased the CEA and CYFRA 21-1 sensitivity up to 79% in the adenocarcinoma group.

Conclusions: The presence of a K-ras mutation in a lung tumour sample strongly suggests the diagnosis of adenocarcinoma and enhances the diagnostic sensitivity of serum tumour markers.

Key words: K-ras, non-small cell lung cancer, CEA, CYFRA 21-1, restriction fragment length polymorphism techniques (RFLP).

INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón es la neoplasia más frecuente en el varón y el segundo en la mujer. Actualmente, es el cáncer que presenta mayor mortalidad, siendo la supervivencia a los 5 años menor del 15%. La principal causa de este mal pronóstico es el retraso en el diagnóstico, siendo un factor determinante de la supervivencia el estadio en el momento del diagnóstico. Un 85% de los cánceres de pulmón son adenocarcinomas y carci-

nomas de células escamosas que, junto con el carcinoma de células grandes, se clasifican como grupo de cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP). El tipo escamoso, que es el más común en Europa, suele presentar una localización central, mientras que el tipo adenocarcinoma, cuya prevalencia está aumentando especialmente en mujeres, tiene una localización periférica que lo hace más inaccesible al diagnóstico por técnicas convencionales como la broncoscopia (1). El tratamiento de elección en los casos de CPCNP es la resección quirúrgica.

La frecuencia de mutaciones en el codón 12 del gen K-ras en el cáncer de pulmón oscila entre un 25-48% dependiendo de la sensibilidad de la técnica y del tipo de muestra analizada. Las mutaciones se detectan en el tipo histológico adenocarcinoma, aunque también se han descrito en una pequeña

¹Servicio de Bioquímica Clínica. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona.

²Servicio de Cirugía Torácica. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona.

*Este trabajo corresponde a una comunicación científica presentada y premiada en el XXI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, celebrado en Gijón del 9-11 de octubre de 2002.

proporción de tumores escamosos y de células pequeñas. Estas mutaciones se asocian a tumores poco diferenciados que presentan peor pronóstico (2).

La aplicación diagnóstica de la detección de mutaciones K-ras mediante técnicas de alta sensibilidad en pacientes con sospecha de cáncer de pulmón ha sido descrita en muestras de aspirados bronquiales (3) y en esputos (4), mientras que en tejido tumoral la presencia de mutaciones K-ras se ha identificado como un factor pronóstico negativo (5). La detección de mutaciones K-ras en muestras no tisulares precisa de técnicas altamente sensibles capaces de detectar una célula tumoral cuando ésta se encuentra junto con un gran número de células epiteliales normales, linfocitos, macrófagos etc. Así, para el análisis mutacional de K-ras en muestras de broncoaspirados (6) y esputos (7) se han utilizado técnicas con límites de detección superiores a 1 célula tumoral entre 10⁴ células normales. En muestras de tejidos de adenocarcinomas de pulmón, se han descrito también aumentos en la prevalencia de mutaciones K-ras cuando se incrementaba la sensibilidad de la técnica utilizada (8). Respecto a los marcadores tumorales séricos utilizados en el cáncer de pulmón, el antígeno carcinoembrionario (CEA) ha demostrado ser más sensible para el tipo histológico adenocarcinoma mientras que el fragmento de citoqueratina 21-1 (CYFRA 21-1) lo ha sido para el tipo escamoso.

El objetivo del presente estudio es evaluar mediante dos técnicas de diferente sensibilidad la detección de mutaciones K-ras en muestras de tejido de CPCNP y valorar su contribución a la información aportada por las determinaciones séricas de los marcadores tumorales CEA y CYFRA 21-1.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes y muestras

Se han estudiado 42 muestras de tejido tumoral procedentes de 42 pacientes con CPCNP que acudían al servicio de Cirugía Torácica de nuestro hospital para resección quirúrgica del tumor (35 hombres y 7 mujeres; edad media: 64 años). Los diagnósticos histológicos fueron 14 adenocarcinomas (2 eran metástasis pulmonares, una de adenocarcinoma de colon y la otra de recto), 19 carcinomas de células escamosas y 9 de células grandes.

Las muestras analizadas correspondieron en 24 casos a muestras tumorales congeladas a -80 °C y en 18 casos a muestras tumorales incluidas en parafina.

En todos los casos se obtuvieron muestras de suero de estos pacientes antes de la cirugía.

Detección de Mutaciones en el codón 12 del gen K-ras

En el caso de las muestras parafinadas se siguió el procedimiento habitual de eliminación de parafina mediante unos lavados con xilol, etanol 100% y cloruro de sodio 0,9%. El material celular obtenido en las muestras congeladas y desparafinadas se resuspendió en 0,5 mL de tampón Tris-EDTA 10:1 y las células se lisaron mediante la adición de dodecil sulfato de sodio (SDS) y proteinasa K a una concentración final de 0,5% y 100 mg/L, respectivamente, incubando a 37 °C durante toda la noche. La extracción del DNA se realizó mediante el método estándar del fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (utilizando 1 volumen de fenol, 1 volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 25:24:1 y 1 volumen de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1) y posterior precipi-

tación del DNA con isopropanol. El DNA, una vez precipitado y tras unos lavados con etanol al 70% , se resuspendió en 100 µL de agua autoclavada.

La detección de mutaciones en el codón 12 del gen K-ras se realizó mediante dos técnicas basadas en los polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP) para la enzima *Bst*NI en productos amplificados mediante la reacción en cadena por la polimerasa (PCR): a) Método estándar no enriquecido (NE-RFLP/PCR), con una detección de 1 alelo mutado en hasta 10² alelos normales y b) Método enriquecido por digestión enzimática continua (CED-RFLP/PCR) que consigue detectar 1 alelo mutado en hasta 10⁵ alelos normales.

a) Para la detección de mutaciones mediante el método NE-RFLP/PCR se realizó una primera PCR utilizando el cebador K-ras 5' (5'-ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT-3'), que introduce un cambio de una G por una C y permite crear una diana (CCTGG) para la enzima de restricción *Bst*NI (New England Biolabs Inc., MA, USA), y el cebador DD5P (5'-TCATGAAATGGTCAGAGAA-3'), que no introduce ningún cambio. Esta diana se pierde cuando existe una mutación en el codón 12 del gen K-ras, por lo que el fragmento obtenido cuando el alelo está mutado es de 143 pb mientras que el del alelo normal es de 114 pb. Las condiciones de amplificación de la primera PCR fueron 10 ciclos (44 °C, 15 s; 72 °C, 15 s; 92 °C, 15 s). A continuación se realizó una segunda PCR utilizando los cebadores K-ras 5' y K-ras 3' (5'-TCAAAGAATGGTCCTG-GACC-3') y 35 ciclos de amplificación. El cebador K-ras 3' introduce otra diana para *Bst*NI que permite obtener un control interno de digestión (128 pb). La digestión final con *Bst*NI se realizó a 60 °C un mínimo de 2 horas y la separación de los fragmentos se obtuvo por electroforesis en un gel de poli-acrilamida al 8% y posterior tinción con bromuro de etidio (0,5 mg/mL). Como controles se utilizaron dos líneas celulares pancreáticas, la NP9 y la NP18 que son positivas y negativas para la mutación, respectivamente. Los reactivos y las concentraciones utilizadas en la PCR han sido descritos previamente (9).

b) El método CED-RFLP/PCR se basa en la termoestabilidad de la enzima para combinar dos etapas de PCR con una digestión enzimática que enriquece el alelo mutado desde el inicio de la primera PCR. Los cebadores son los mismos que se utilizan en el método anterior pero añadiendo a la mezcla de la primera PCR la enzima *Bst*NI (10 U). Con la adición de la enzima se consigue digerir de forma continua los productos amplificados no mutados, con lo cual se potencian los productos que contienen la mutación ya que no son digeridos. Las condiciones de amplificación fueron 54 °C, 15 s; 72 °C, 15 s; 90 °C, 15 s con 12 ciclos para la primera PCR y 35 ciclos para la segunda PCR. Para la digestión final y la electroforesis se procedió como en el método anterior. Los reactivos utilizados también han sido descritos previamente (10).

Determinación de CEA y CYFRA 21-1

La determinación en el suero de la concentración de CEA se realizó mediante un inmunoanálisis enzimo-quimioluminométrico en el analizador automático Immulite® 2000 (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, EE.UU.), y la medida de la concentración de CYFRA 21-1 utilizando un método inmunoradiométrico manual (Centocor®, Fujirebio Diagnostics Inc., Malvern, PA, EE.UU.). Los valores discriminantes utilizados para CEA y CYFRA 21-1 fueron de 5 µg/L y 3,3 µg/L, respectivamente.

RESULTADOS

En la tabla I se indican los resultados obtenidos del estudio de la detección de mutaciones *K-ras* en las 42 muestras de tejido tumoral utilizando los dos métodos descritos. La mutación *K-ras* se detectó en 5 de los 14 (36%) adenocarcinomas estudiados y no se evidenció la presencia de *K-ras* mutado en los restantes tumores con histología diferente de adenocarcinoma. Los dos métodos detectaron las mismas mutaciones indicando que, en los casos positivos, la mutación *K-ras* estaba presente en una fracción elevada de células (por lo menos en la proporción de 1 célula mutada entre 100 células normales). Los adenocarcinomas positivos para la mutación *K-ras* presentaron los siguientes estadios: Ia, Ib, IIIb y 2 IV (una era metástasis de adenocarcinoma de colon y la otra de recto).

En la figura 1 se presenta el patrón de bandas obtenido en un gel de poliacrilamida cuando se utiliza el método NE-RFLP/PCR para la detección de mutaciones *K-ras*. La banda de 143 pares de bases (pb) que aparece corresponde al alelo mutado y la banda de 114 pb indica el alelo normal. En cada gel se incluyeron los controles positivo (C⁺) y negativo (C⁻) para la mutación, el control de reactivos de la PCR que asegura la no-contaminación del experimento (H) y el marcador de peso molecular (ϕ x174, *Hae* III).

Los resultados de sensibilidad diagnóstica obtenidos con los marcadores tumorales séricos CEA y CYFRA 21-1 de forma individual o asociados a la detección tisular de mutaciones *K-ras* se resumen en la tabla II. CEA presentó mayor sensibilidad diagnóstica en el grupo de carcinomas de células grandes (56%) y en adenocarcinomas (50%), mientras que CYFRA 21-1 fue más sensible en el grupo de carcinomas de células escamosas (37%). La combinación de CEA y CYFRA 21-1 incrementó hasta un 47% la sensibilidad en el tipo escamoso. De los 5 adenocarcinomas positivos para la mutación *K-ras*, 4 tenían concentraciones de CEA en suero inferiores a 5 μ g/L, con lo que al asociar la determinación de *K-ras* con la de CEA se incrementó la sensibilidad hasta un 79%, detectando un total de 11/14 adenocarcinomas (6 casos detectados con el CEA, 4 por presentar la mutación y 1 caso, correspondiente a la metástasis de adenocarcinoma rectal, por tener el CEA elevado además de presentar la mutación).

Tabla I. Detección de mutaciones *K-ras* en muestras de tejidos utilizando dos métodos de diferente sensibilidad

Diagnósticos	n	Análisis de mutaciones <i>K-ras</i>	
		Método NE-RFLP/PCR ¹	Método CED-RFLP/PCR ²
Adenocarcinomas	14	5/14 (36%)	5/14 (36%)
C. Células Escamosas	19	0/19	0/19
C. Células Grandes	9	0/9	0/9

RFLP/PCR: Polimorfismos de los fragmentos de restricción en productos amplificados mediante la reacción en cadena de la polimerasa

¹NE-RFLP/PCR: Método estándar no enriquecido

²CED-RFLP/PCR: Método enriquecido por digestión enzimática continua

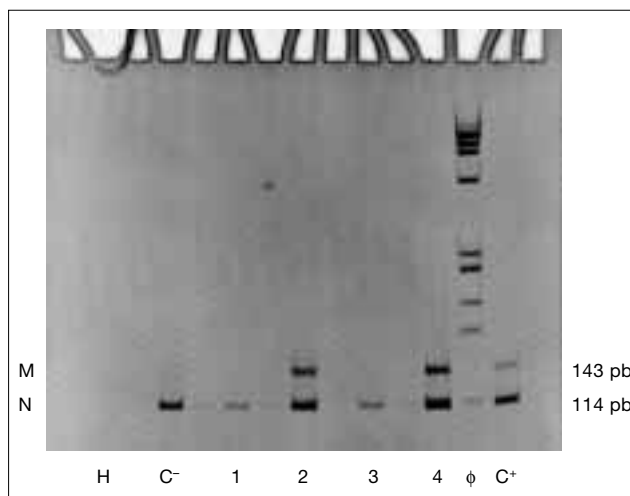


Figura 1 Método NE-RFLP/PCR: método estándar no enriquecido de los polimorfismos de los fragmentos de restricción en productos amplificados mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Control negativo (C⁻), control positivo (C⁺), marcador de peso molecular (ϕ x 174, *Hae* III), muestra negativas (1, 3), muestras positivas (2, 4) y control de reactivos (H). La banda que corresponde al alelo mutado (M) es de 143 pares de bases y la banda del alelo normal (N) de 114 pb

DISCUSIÓN

Existen numerosos trabajos que sugieren que la detección de mutaciones *K-ras* puede ser de utilidad en el diagnóstico y pronóstico del cáncer de pulmón de células no pequeñas, especialmente en el tipo adenocarcinoma (2). En muestras de tejido muchos autores demuestran que la mutación *K-ras* se asocia a tumores con peor pronóstico (5,11,12). La detección de mutaciones parece estar asociada al estadio, oscilando entre el 18%, en pacientes en estadios I (12) hasta el 30% en estadios III (11, 13, 14) cuando se utilizan técnicas de sensibilidad estándar. En nuestro caso, utilizando el método NE-RFLP/PCR (límite de detección de 10⁻²), la detección fue del 36% y se correspondieron en 3/5 casos a estadios no localizados (dos de ellos metastásicos). En nuestro estudio no se detectaron mutaciones en los otros tipos histológicos diferen-

Tabla II. Sensibilidad diagnóstica de los diferentes marcadores según el tipo histológico

Marcador	Sensibilidad		
	Adenocarcinomas (n=14)	C. Células Escamosas (n=19)	C. Células Grandes (n=9)
<i>K-ras</i>	5/14 (36%)	0/19 (0%)	0/9 (0%)
CEA	7/14 (50%)	3/19 (16%)	5/9 (56%)
CYFRA 21-1	3/14 (21%)	7/19 (37%)	0/9 (0%)
CEA + CYFRA 21-1	7/14 (50%)	9/19 (47%)	5/9 (56%)
<i>K-ras</i> + CEA + CYFRA 21-1	11/14 (79%)	9/19 (47%)	5/9 (56%)

tes del adenocarcinoma. No obstante, existen algunos estudios en donde, aunque la mutación K-ras mayoritariamente se detecta en adenocarcinomas (11, 14), también se describe su presencia en un 10% en los tipo adenoescamosos, hasta un 12,8% en carcinomas de células grandes, y oscilando entre un 1,6% (11) y 8% en escamosos (14).

El porcentaje de detección depende del tipo de muestra y de la sensibilidad de la técnica utilizada. En nuestro caso, al analizar estos tumores con el método de alta sensibilidad CED-RFLP/PCR (límite de detección de 10^{-5}), no se observó ninguna diferencia respecto al porcentaje de detección (36%). En la literatura se han descrito frecuencias de hasta 46% al analizar tumores por técnicas de alta sensibilidad (8). Otros autores han constatado que al aumentar la sensibilidad de la técnica la mutación era detectada en tumores de tipo escamoso que eran negativos con las técnicas estándar (7, 15). Esto se explicaría por la alta heterogeneidad presente en estas neoplasias. Esta heterogeneidad permitiría detectar, por técnicas altamente sensibles, mutaciones que estaban presentes en una pequeña subpoblación celular (15, 16). No obstante, hay autores que indican que la utilización de estos métodos para analizar muestras de tejido tumoral, podría oscurecer diferencias entre tumores cuya mutación se halla a lo largo del tumor, de aquellos en los que la mutación está únicamente presente en pequeñas subpoblaciones (15). En los tumores analizados en este trabajo no se observaron diferencias al incrementar 1.000 veces la sensibilidad de la técnica, lo cual indicaría que los adenocarcinomas positivos para la mutación la contienen en una fracción elevada de células (como mínimo en 1 célula de cada 100). No está demostrado si pueden existir diferencias pronósticas entre los llamados tumores *high fraction* (tumores que contienen la mutación en una fracción elevada de células) o tumores *low fraction* (que la contienen en una pequeña fracción) (15, 16).

La utilidad diagnóstica y pronóstica de los marcadores tumorales CEA y CYFRA 21-1 en cáncer de pulmón ha sido también evaluada en numerosos trabajos (17-19). Respecto a los tipos histológicos, CEA ha sido reconocido como un marcador de adenocarcinoma mientras que CYFRA 21-1 se asocia a tipo escamoso (20). Nuestros resultados también presentan una mejor sensibilidad del CEA para adenocarcinomas (50%) y para carcinomas de células grandes (56%) respecto a los de CYFRA 21-1 (21% y 0% respectivamente). El grupo de Nisman *et al.* (20) obtiene para el CEA, en estos tipos histológicos, sensibilidades del mismo orden, de 56 y 61%, respectivamente, y para CYFRA 21-1 de 36% en adenocarcinomas. En el tipo escamoso los resultados obtenidos fueron de 37% para CYFRA 21-1 y de 16% para CEA. Estos resultados son sensiblemente inferiores a los indicados por otros autores en el tipo escamoso, en donde se aportan sensibilidades para CYFRA 21-1 de 52% (20), 63% (21) y hasta de 67% (22) y para CEA de hasta 26% (22), si bien al analizar la sensibilidad del CYFRA 21-1 según los estadios ésta era menor en estadios localizados, siendo de 33% y 52% en estadios I y II respectivamente (21).

La combinación de los dos marcadores CEA y CYFRA 21-1 con la finalidad de incrementar la sensibilidad diagnóstica en CPCNP ha sido descrita en diversos trabajos (23). En nuestro estudio la combinación de CEA y CYFRA 21-1 incrementó la sensibilidad global hasta un 50% y hasta 47% en el tipo escamoso.

La información aportada por un marcador molecular debe ser evaluada en combinación con la que nos ofrecen los marcadores tumorales séricos.

En el presente estudio al analizar la detección de mutaciones K-ras en combinación con los marcadores tumorales CEA y CYFRA 21-1 se incrementó la sensibilidad en el grupo de adenocarcinomas hasta un 79%.

La determinación conjunta del oncogen K-ras con marcadores tumorales séricos ha sido descrita en cáncer de colon con el marcador CEA (24) y con CA 19.9 en cáncer de páncreas (25) aumentando en todos los casos la sensibilidad diagnóstica.

Los resultados obtenidos indican que la presencia de una mutación K-ras en una muestra de tejido pulmonar es altamente sugestiva de adenocarcinoma e incrementa la sensibilidad diagnóstica de los marcadores tumorales séricos. El seguimiento prospectivo de estos pacientes con K-ras mutado permitirá confirmar si identifica un subgrupo de riesgo en los que estaría indicado un tratamiento más agresivo. Con respecto a las técnicas de alta sensibilidad para detección de estas mutaciones, si bien en tejidos no han demostrado un aumento en el porcentaje de tumores detectados, sí tendrían su aplicación diagnóstica en cáncer de pulmón en aquellas muestras con poca celularidad y donde las células tumorales están en minoría respecto a las normales como ocurre en broncoaspirados y esputos (3, 4, 6).

Correspondencia:
Josefina Mora Brugués
Servicio de Bioquímica Clínica.
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau
Avd. Antoni M. Claret 167
08025 Barcelona.
e-mail: jmora@hsp.santpau.es

BIBLIOGRAFÍA

- Hoffman PC, Mauer AM, Vokes EE. Lung cancer. *Lancet* 2000; 355: 479-85.
- Slebos RJ, Kibbelaar RE, Dalesio O, Kooistra A, Stam J, Meijer CJ, et al. K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med* 1990; 323: 561-65.
- Ahrendt SA, Chow JT, Xu LH, Yang SC, Eisenberger CF, Esteller M, et al. Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 332-339.
- Mao L, Hruban RH, Boyle JO, Tockman M, Sidransky D. Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 1634-7.
- Huncharek M, Muscat J, Geschwind JF. K-ras oncogene mutation as a prognostic marker in non-small cell lung cancer: a combined analysis of 881 cases. *Carcinogenesis* 1999; 20: 1507-10.
- Oshita F, Nomura I, Yamada YK, Tanaka G and Noda K. Detection of K-ras mutations of bronchoalveolar lavage fluid cells aids the diagnosis of lung cancer in small pulmonary lesions. *Clin Cancer Res* 1999.
- Somers VA, Pietersen AM, Theunissen PH, Thunnissen FB. Detection of K-ras point mutation in sputum from patients with adenocarcinoma of the lung by point-EXACCT. *J Clin Oncol* 1998; 16: 3061-8.
- Mills NE, Fishman CL, Rom WN, Dubin N, Jacobson DR. Increased prevalence of K-ras oncogene mutations in lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 1995; 55: 1444-7.
- Mora J, Puig P, Boadas J, Urgell E, Montserrat E, Lerma E, et al. K-ras gene mutations in the diagnosis of fine-needle aspirates of pancreatic masses: prospective study using two techniques with different detection limits. *Clin Chem* 1998; 44: 2243-8.
- Puig P, Urgell E, Capellà G, Villanueva A, Grau M, Sancho FJ et al. Improved detection of K-ras codon 12 mutations in fecal exfoliated cells. *Lab Invest* 1999; 79: 617-8.
- Graziano SL, Gamble GP, Newman NB, Abbott LZ, Rooney M, Mookherjee S, et al. Prognostic significance of K-ras codon 12 mutations in patients with resected stage I and II non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 668-75.
- Grossi F, Loprevite M, Chiamomondia M, Ceppa P, Pera C, Ratto GB, et al. Prognostic significance of K-ras, p53, bcl-2, PCN, CD34 in radi-

- cally resected non-small cell lung cancers. *Eur J Cancer* 2003; 39: 1242-50.
13. Hatzaki A, Razi E, Anagnostopoulou K, Iliadis K, Kodaxis A, Papaioannou D, et al. A modified mutagenic PCR-RFLP method for K-ras codon 12 and 13 mutations detection in NSCLC patients. *Mol Cell Probe* 2001; 15: 243-7.
 14. Broermann P, Junker K, Brandt BH, Heinecke A, Freitag L, Klinke F, et al. Trimodality treatment in stage III nonsmall cell lung carcinoma. Prognostic impact of K-ras mutations after neoadjuvant therapy. *Cancer* 2002; 94: 2055-62.
 15. Clayton SJ, Scott FM, Walker J, Callaghan K, Haque K, Liloglou T, et al. K-ras point mutation detection in lung cancer: comparison of two approaches to somatic mutation detection using ARMS allele-specific amplification. *Clin Chem* 2000; 46: 1929-38.
 16. Keohavong P, Zhu D, Melacrinis AC, DeMichele MA, Weyant RJ, Luketich JD, et al. Detection of low-fraction K-ras mutations in primary lung tumors using a sensitive method. *Int J Cancer* 1997; 74: 162-70.
 17. Reinmuth N, Brandt B, Semik M, Kunze WP, Achatzy R, Scheld HH, et al. Prognostic impact of Cyfra 21-1 and other serum markers in completely resected non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2000; 36: 265-70.
 18. Pujol JL, Boher JM, Grenier J, Quantin X. Cyfra 21-1, neuron specific enolase and prognosis of non-small cell lung cancer: prospective study in 621 patients. *Lung Cancer* 2001; 31: 221-31.
 19. Vollmer RT, Govindan R, Graziano SL, Gamble G, Garst J, Kelley MJ, et al. Serum Cyfra 21-1 in advanced stage non-small cell lung cancer: an early measure of response. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1728-33.
 20. Nisman B, Lafair J, Heching N, Lyass O, Baras M, Peretz T, et al. Evaluation of tissue polypeptide specific antigen, Cyfra 21-1, and carcinoembryonic antigen in nonsmall cell lung carcinoma. Does the combined use of cytokeratin markers give any additional information? *Cancer* 1998; 82: 1850-9.
 21. Niklinski J, Furman M, Chyczewski L, Chyczewski F, Rogowski F, Laudanski J. Diagnostic and prognostic value of the new tumor marker Cyfra 21-1 in patients with squamous cell lung cancer. *Eur Respir J* 1995; 8: 291-4.
 22. Kulpa J, Wojcik E, Reinfuss M, Kolodziejski L. Carcinoembryonic antigen, squamous cell carcinoma antigen, Cyfra 21-1, and neuron-specific enolase in squamous cell lung cancer patients. *Clin Chem* 2002; 48: 1931-7.
 23. Muraki M, Tohda Y, Iwanaga T, Uejima H, Nagasaka Y, Nakajima S. Assessment of serum Cyfra 21-1 in lung cancer. *Cancer* 1998; 77: 1274-7.
 24. Salbe C, Trevisiol C, Ferruzzi E, Mancuso T, Nascimbeni R, Di Fabio F, et al. Molecular detection of Codon 12 K-ras mutations in circulating DNA from serum of colorectal cancer patients. *Int J Biol Markers* 2000; 15: 300-7.
 25. Urgell E, Puig P, Boadas J, Capellà G, Queraltó JM, Boluda R, et al. Prospective evaluation of the contribution of K-ras mutational analysis and CA 19.9 measurement to cytological diagnosis in patients with clinical suspicion of pancreatic cancer. *Eur J Cancer* 2000; 36: 2069-75.