



IMPACTO DAS MUTAÇÕES KRAS E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS EM CÂNCER COLORRETAL

Impact of KRAS mutations in clinical features in colorectal cancer

Renato Morato ZANATTO¹, Gianni SANTOS², Júnea Caris OLIVEIRA¹, Eduardo Marcucci PRACUCHO¹, Adauto José Ferreira NUNES³, Gaspar Jesus LOPES-FILHO^{4,5}, Sarhan Sydney SAAD^{4,5}

RESUMO – Racional: Mutações KRAS são eventos importantes na carcinogênese colorretal como preditores negativos de resposta ao tratamento. **Objetivo:** Investigar a associação de características clinicopatológicas com mutações no KRAS em pacientes com câncer colorretal tratados. **Métodos:** Sessenta e nove pacientes com câncer colorretal metastáticos ao diagnóstico ou posteriormente foram analisados. As técnicas de sequenciamento direto e pirosequenciamento foram relacionadas ao éxon 2 do KRAS e o diagnóstico da mutação e seu tipo foram determinados. **Resultados:** A mutação KRAS foi identificada em 43,4% dos pacientes, c.35G>T (p.G12V), c.35G>A (p.G12D) e c.38G>A (p.G13D). Não foi encontrada correlação entre a mutação KRAS e a idade (p=0,646) ou o gênero (p=0,815). No entanto, o grupo mutado apresentou níveis mais altos de CEA na admissão (p=0,048). A mutação do códon 13 foi associada ao envolvimento de mais de um local metastático na progressão da doença (p=0,029); não houve associação entre o local primário do tumor e o diagnóstico de mutação (p=0,568); a doença primária do cólon foi associada com pior sobrevida global (p=0,009). **Conclusão:** A mutação KRAS foi identificada em quase metade dos pacientes. O grupo KRAS mutado apresentou níveis mais altos de CEA na admissão e a mutação no códon 13 foi associada ao envolvimento de mais de um local metastático no curso da doença. A doença do cólon foi associada com pior sobrevida global.

DESCRIPTORIOS: Neoplasias colorretais. Frequência do gene. Mutação.

Mensagem central

Mutações no gene KRAS estão presentes em quase metade dos pacientes com câncer colorretal e a mutação do códon 13 associa-se com mais de um sítio de metástase.

Perspectiva

Alta prevalência de mutação do gene KRAS foi identificada em quase metade dos pacientes com câncer colorretal. O grupo KRAS mutado apresentou níveis mais altos de CEA na admissão e a mutação no códon 13 foi associada ao envolvimento de mais de um sítio de metástases ao longo do tratamento no curso da doença. A doença do cólon em comparação ao reto foi associada com pior sobrevida global.

ABSTRACT – Background: KRAS mutations are important events in colorectal carcinogenesis, as well as negative predictors of response to EGFR inhibitors treatment. **Aim:** To investigate the association of clinical-pathological features with KRAS mutations in colorectal cancer patients treated. **Methods:** Data from 69 patients with colorectal cancer either metastatic at diagnosis or later, were retrospectively analyzed. The direct sequencing and pyrosequencing techniques were related to KRAS exon 2. The mutation diagnosis and its type were determined. **Results:** KRAS mutation was identified in 43.4% of patients. The most common was c.35G>T (p.G12V), c.35G>A (p.G12D) and c.38G>A (p.G13D). No correlation was found between KRAS mutation and age (p=0.646) or gender (p=0.815). However, mutated group had higher CEA levels at admission (p=0.048) and codon 13 mutation was associated with involvement of more than one metastatic site in disease progression (p=0.029). Although there was no association between primary tumor site and mutation diagnosis (p=0.568), primary colon was associated with worse overall survival (p=0.009). **Conclusion:** The KRAS mutation was identified in almost half of patients. Mutated KRAS group had higher levels of CEA at admission and the mutation at codon 13 was associated with involvement of more than one metastatic site in the course of the disease. Colon disease was associated with the worst overall survival.

HEADINGS: Colorectal neoplasms. Gene frequency. Mutation.



www.facebook.com/abcdrevista



www.instagram.com/abcdrevista



www.twitter.com/abcdrevista

Trabalho realizado no ¹Departamento de Cirurgia Abdominal e Pélvica, Hospital Amaral Carvalho, Jaú, SP, Brasil; ²Departamento de Bioestatística, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil; ³Departamento de Patologia, Hospital Amaral Carvalho, Jaú, SP, Brasil; ⁴Departamento de Cirurgia do Aparelho Digestivo, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil; ⁵Programa de Pós-Graduação de Cirurgia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

Como citar esse artigo: Zanatto RM, Santos G, Oliveira JC, Pracucho EM, Nunes AJF, Lopes-Filho GJ, Saad SS. Impacto das mutações KRAS e características clínicas em câncer colorretal. ABCD Arq Bras Cir Dig. 2020;33(3):e1524. DOI: /10.1590/0102-672020200003e1524

Correspondência:
Renato Morato Zanatto
E-mail: renato.zanatto@gmail.com

Fonte de financiamento: não há
Conflito de interesse: não há
Recebido para publicação: 17/01/2020
Aceito para publicação: 29/04/2020

INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) é doença comum e letal. É o terceiro câncer diagnosticado com mais frequência em homens e o segundo em mulheres no mundo, com 1,65 milhão de novos casos e quase 835.000 mortes em 2015⁷. No Brasil, para o biênio 2018-2019, estima-se que 36.360 novos casos ocorram a cada ano¹⁴.

O tratamento da CCR é baseado na apresentação da doença, ou seja, dependendo do local e do estágio do tumor, podem ser utilizadas estratégias que usem tratamento cirúrgico, combinado ou não com quimioterapia e radioterapia. Não se espera que a maioria dos pacientes seja curada em situações de doença metastática, exceto, os com envolvimento hepático e/ou pulmonar isolado que podem ser tratados com intenção curativa e resgatados com operações. A maioria dos pacientes é tratada com quimioterapia sistêmica paliativa, com o objetivo clínico de melhorar a qualidade de vida e o ganho de sobrevida²¹.

Recentemente, inibidores do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), como cetuximab e panitumumab, foram incorporados no tratamento da CCR metastático em combinação com quimioterapia. Atuam no bloqueio de receptores e demonstraram eficácia melhorada do tratamento para muitos tumores. No câncer colorretal metastático, resultou em ganho de sobrevida livre de progressão e benefício significativo foi relatado na continuação desses medicamentos após a progressão como tratamento de primeira linha^{27,5}. No entanto, os inibidores de EGFR são ineficazes quando o KRAS é mutado²⁶. A taxa de mutação varia de 30-50% e causa ativação contínua da via intracelular de EGFR, independente do bloqueio farmacológico do receptor, promovendo a proliferação e a sobrevivência do tumor^{23,13}. Portanto, como a mutação KRAS é preditora de resposta negativa, a análise mutacional do gene se torna obrigatória antes da instituição de tratamento com inibidores de EGFR. Essa estratégia, além de otimizar os custos de saúde, evita efeitos adversos relacionados a esses medicamentos, principalmente a toxicidade cutânea^{19,16}.

Aproximadamente 90% das mutações genéticas na família RAS (H, N e K-RAS) ocorrem no éxon 2 do KRAS (códon 12 e 13). A mutação mais frequente do códon 12 é c.35G>A (p.G12D) e no códon 13 é c.38G>A (p.G13D), ambos resultam da troca do aminoácido glicina por ácido aspártico nas posições 35 e 38, respectivamente¹⁹. Outras mutações no KRAS como o éxon 3 (códon 59, 60, 61), o éxon 4 (códon 119, 146, 147) e o NRAS representam pequena proporção dessas mutações¹¹.

A mutação KRAS é um preditor de resposta negativa ao tratamento com inibidores de EGFR e, de acordo com outros estudos, confere pior prognóstico, mas não todos^{3,24,6}.

Portanto, este estudo tem por objetivo analisar a frequência, os tipos de mutação do gene KRAS e a correlação com os dados clínicos e patológicos em pacientes diagnosticados com CCR metastático.

MÉTODOS

Desenho do estudo e padrões éticos

Estudo retrospectivo, transversal e de centro único. Todas as informações clínicas foram obtidas dos prontuários médicos e incluíram pacientes diagnosticados e tratados entre agosto de 2005 a fevereiro de 2017. O estudo foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Amaral Carvalho em 3 de novembro de 2016 sob o número de registro 1.803.348. O consentimento individual para a participação do paciente não foi exigido devido à natureza retrospectiva do estudo e está de acordo com a legislação reguladora brasileira.

Sessenta e nove pacientes com adenocarcinoma de cólon e reto foram avaliados, independentemente do tratamento realizado. Eles foram divididos em dois grupos: metastático no diagnóstico (n=43) e que desenvolveram metástases durante

o acompanhamento pós-operatório oncológico (n=26). As características clinicopatológicas registradas e analisadas incluíram idade, gênero, local do tumor primário, metástase e níveis de CEA na admissão. Todos os blocos de parafina foram testados em áreas representativas discriminadas do tumor e enviados aos laboratórios para realizar a extração e sequenciamento do DNA do éxon 2 do KRAS (códon 12 e 13). As amostras de DNA foram derivadas de tumor primário (n=58) ou metástase (n=11). Vinte e quatro foram sequenciadas no Progenetics Molecular Diagnostics usando a técnica de sequenciamento direto e 45 amostras no AC Camargo Cancer Center usando a técnica de pirosequência^{13,10}.

Análise estatística

Após análise descritiva dos dados, foram realizadas duas análises inferenciais para confirmar ou refutar a correlação: teste qui-quadrado de Pearson ou exato de extensão de Fisher, comparando gênero, idade, local primário, nível de CEA na admissão, estadiamento patológico e local metastático de acordo com a mutação do gene KRAS¹, regressão múltipla de Cox comparando o tempo de sobrevida, local primário e mutação do gene KRAS¹². Em todas as conclusões obtidas através de análises inferenciais, o nível de significância alfa foi de 5%. Os dados foram inseridos e armazenados nas planilhas do Excel 2010 para Windows. As análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico R, versão 3.3.2²⁵.

RESULTADOS

A mutação KRAS foi diagnosticada em 30 pacientes (43,5%). Vinte e dois estavam no códon 12 (73,3%) e oito (26,7%) no códon 13. As mutações mais frequentes foram c.35G>T (p.G12V), 33,3%, seguida pela mutação c.35G>A (p.G12D), 23,3% e c.38G>A (p.G13D), 23,3%. Essas três mutações corresponderam a 79,9% do total de mutações na série. Em um caso, foi identificada a mutação dupla c.34_36GGT>TGG (p.G12W), 0,03%, que envolve a troca do aminoácido glicina por tirosina na posição 34 e tirosina por glicina na posição 36 (Figura 1).

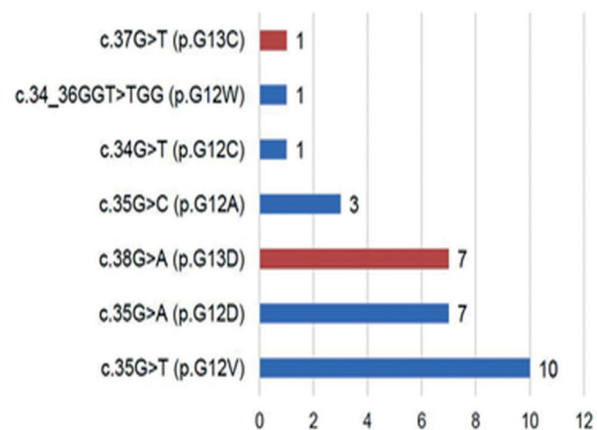


FIGURA 1 - Tipos de mutações e alteração de aminoácidos correspondentes

A correlação da mutação KRAS com os dados epidemiológicos está descrita na Tabela 1. O grupo selvagem do KRAS foi composto principalmente por homens (53,8%), maiores de 50 anos (71,8%), com localização primária do cólon (66,7%), CEA nível de admissão de até 5 ng/ml (53,8%) e estadiamento patológico IV (64,1%). O local metastático preferido foi fígado (46,2%), seguido de peritônio (12,8%), linfonodo retroperitoneal (7,7%) e pulmão (5,1%). O grupo mutado do KRAS também foi formado pela maioria com homens (56,7%), acima de 50 anos (66,7%), sítio primário do cólon (60,0%), nível de CEA na admissão acima de 5 ng/ml (70,0%) e estadiamento patológico IV (60,0%). O local metastático preferido foi fígado (43,3%), e após pulmão (23,3%), peritônio (10,0%) e linfonodo

retroperitoneal (3,3%). A mutação KRAS não foi relacionada ao gênero (p=0,815), faixa etária (p=0,646), local primário (p=0,568), estadiamento patológico (p=0,935) e local metastático (p=0,263). Pacientes portadores de KRAS mutado apresentaram níveis mais altos de CEA quando comparados aos portadores de tumores com KRAS do tipo selvagem. Pacientes KRAS mutado apresentavam níveis de CEA superiores a 5 ng/ml em 70% dos casos, contra 46,2% dos com KRAS selvagem (p=0,048).

TABELA 1 - Distribuição das características gerais dos pacientes de acordo com a mutação KRAS

KRAS selvagem	%	KRAS Mutado	%	Total	%	p
Gênero						
Masculino	21 (53,8%)	17 (56,7%)	38	(55,1%)	0,815a	
Feminino	18 (46,2%)	13 (43,3%)	31	(44,9%)		
Total	39 (100%)	30 (100%)	69	(100%)		
Intervalo de idade						
Até 50 anos	11 (28,2%)	10 (33,3%)	21	(30,4%)	0,646a	
Acima de 50 anos	28 (71,8%)	20 (66,7%)	48	(69,6%)		
Total	39 (100%)	30 (100%)	69	(100,0%)		
Sítio primário						
Colon	26 (66,7%)	18 (60,0%)	44	(63,8%)	0,568a	
Reto	13 (33,3%)	12 (40%)	25	(36,2%)		
Total	39 (100%)	30 (100%)	69	(100%)		
Nível de CEA na admissão						
Até 5 ng/ml	21 (53,8%)	9 (30,0%)	30	(43,5%)	0,048a	
Acima de 5 ng/ml	18 (46,2%)	21 (70,0%)	39	(56,5%)		
Total	39 (100%)	30 (100%)	69	(100%)		
Estadio patológico						
I	1 (2,6%)	-	1	(1,4%)	0,935b	
II	7 (17,9%)	6 (20,0%)	13	(18,8%)		
III	6 (15,4%)	6 (20,0%)	12	(17,4%)		
IV	25 (64,1%)	18 (60,0%)	43	(62,3%)		
Total	39 (100%)	30 (100%)	69	(100%)		
Sítio metastático						
Fígado	18 (46,2%)	13 (43,3%)	31	(44,9%)	0,263b	
Peritônio	5 (12,8%)	3 (10,0%)	8	(11,6%)		
Pulmão	2 (5,1%)	7 (23,3%)	9	(13,0%)		
Linfonodo de retroperitônio	3 (7,7%)	1 (3,3%)	4	(5,8%)		
Mais que um sítio	11 (28,2%)	6 (20,0%)	17	(24,6%)		
Total	39 (100%)	30 (100%)	69	(100%)		

a=teste de Pearson qui-quadrado; b=teste exato de Fisher

A distribuição do número de sítios metastáticos, de acordo com o tipo de mutação no CCR, está descrita na Tabela 2. Dos 30 pacientes com mutação KRAS, encontrou-se mutação no códon 12 (22), a maioria tinha apenas um sítio metastático (90,9%). O mesmo não ocorreu com os pacientes com mutação no códon 13 (8), dos quais metade (50,0%) apresentava apenas um local metastático (p=0,029).

TABELA 2 - Distribuição do número de sítios de metástase, segundo tipo de mutação do KRAS

Tipo de mutação	Número de sítios metastáticos				Total	
	Apenas um	Mais que um	Apenas um	Mais que um	n	%
p.G12A	3	12,5%	-	-	3	10,0%
p.G12C	1	4,2%	-	-	1	3,3%
p.G12D	7	29,2%	-	-	7	23,3%
p.G12V	8	33,3%	2	33,3%	10	33,3%
p.G13C	-	-	1	16,7%	1	3,3%
p.G13D	4	16,7%	3	50,0%	7	23,3%
p.G12W	1	4,2%	-	-	1	3,3%
Total	24	100%	6	100%	30	100%

n=número de mutação

A Figura 2 ilustra a sobrevida global do paciente por local primário e status do KRAS. De acordo com ela, a sobrevida global dos pacientes estimada em 60 meses foi de 26,7%. Investigando a sobrevida, de acordo com o local primário e o KRAS, o modelo de regressão de Cox foi ajustado, e o efeito da interação entre o local primário e o status do KRAS não foi detectado (p=0,961). Assim, o sítio primário de sobrevivência não foi influenciado pelo KRAS. Os resultados revelaram que pacientes portadores de tumores retais primários apresentaram melhor sobrevida quando comparados com os diagnosticados com tumores primários do cólon (p=0,009). Não foi possível mostrar relação do tipo KRAS com a sobrevida dos pacientes (p=0,144).

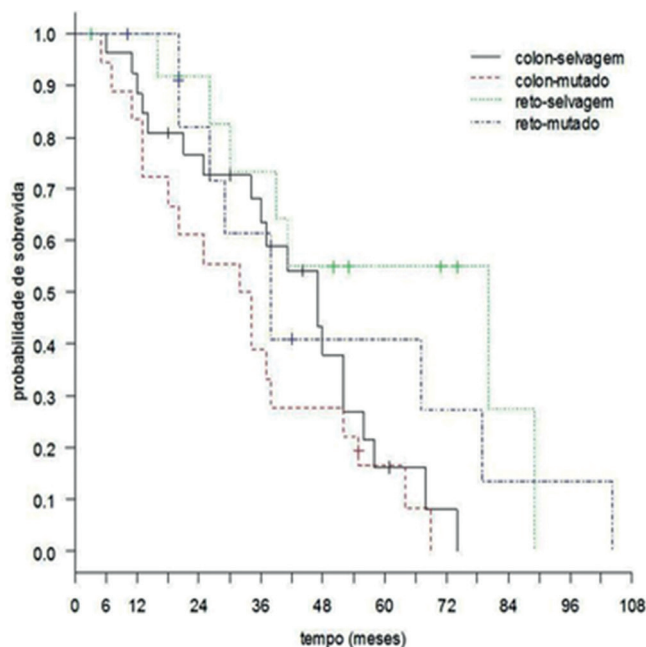


FIGURA 2 - Curva de sobrevida global dos pacientes, de acordo com o local primário e a mutação KRAS

DISCUSSÃO

Neste estudo, a prevalência da mutação KRAS foi de 43,4%. Na maioria das séries, ela é identificada em 30-50% dos casos e são importantes fatores genéticos que contribuem para a ocorrência da doença¹³. As mutações mais frequentes foram c.35G>T (p.G12V), 33,3%, c.35G>A (p.G12D), 23,3% e c.38G>A (p.G13D), 23,3% que corresponderam a 79,9 % do total de mutações nesta amostra. Relatos mostram prevalência de mutação no KRAS em cerca de 39,3% entre 1018 pacientes alemães, e a mutação mais prevalente foi p.G12D seguida por p.G12V e p.G13D¹⁹.

No Brasil são observadas variações na prevalência da mutação KRAS de acordo com a região, por exemplo, cerca de 18,3% entre 60 pacientes da região amazônica⁹. No maior estudo brasileiro que avaliou 8234 pacientes, a frequência dessa mutação foi de 31,9%. Na análise de regiões separadas, na região sudeste ela foi de 34,7%¹³.

Portanto, a distribuição dos códons e as três mutações mais prevalentes no presente estudo são semelhantes às descritas em outras séries, denotando amostra representativa comparada aos achados globais^{13,29,28}.

No presente estudo, a frequência de mutação do KRAS não se correlacionou com gênero (p=0,815), faixa etária (p=0,646), sítio primário (p=0,568), estadiamento patológico (p=0,935) e sítio metastático (p=0,263). Relatos mostram alta prevalência entre mulheres (34,8% mulheres vs. 32,5% homens, p=0,03)¹³. Assim, o gênero, a idade ou a influência hormonal na mutação KRAS são conflitantes porque alguns estudos mostram maior frequência de mutações para mulheres²², mas outros não¹⁷. As diferenças etnológicas nas populações estudadas podem explicar

a disparidade.

Em relação ao local primário e à terapia multimodal geralmente empregada, foram identificados dois grupos de pacientes: reto extra-peritoneal, no qual a radioterapia faz parte da terapia local, somado à ressecção cirúrgica e quimioterapia adjuvante, e cólon/reto intraperitoneal, no qual a operação de ressecção é a base da terapia local, com quimioterapia adjuvante complementar de acordo com a estratificação de risco. Além disso, a quimioterapia sistêmica com quimioterapia à base de fluoropirimidina, com ou sem anticorpo monoclonal panitumumabe/cetuximabe ou bevacizumabe é a base da terapia para pacientes com doença metastática. Embora a mutação KRAS não esteja correlacionada com o local primário no presente estudo, por um grupo diferente, os tumores do lado direito (antes da flexura esquerda) e os tumores do lado esquerdo (após a flexura esquerda) mostraram influência do local primário no prognóstico em tumores não tratados anteriormente. No entanto, esses dados ainda são objeto de investigação¹⁸.

O status de mutação do KRAS parece influenciar o padrão de disseminação metastática na CCR. Estudos mostram diferença na frequência das mutações no KRAS em pacientes com metástases hepáticas, pulmonares e cerebrais²⁴. No estudo, as mutações no KRAS foram menos prevalentes nas metástases hepáticas (32,3%), mas mais nas pulmonares (62,0%) e cerebrais (56,5%, $p=0,003$). Há alguns relatos de que o CCR metastático com mutação no KRAS tem maior probabilidade de se espalhar para os pulmões em comparação ao KRAS do tipo selvagem (22% vs. 13%, $p<0,01$)³⁰. Embora essa informação não tenha sido relatada no presente estudo, as mutações na distribuição dos códons foram correlacionadas com o número de sítios metastáticos afetados e, no códon 12, a maioria possuía apenas um sítio metastático. O mesmo não ocorreu com o grupo de mutação do códon 13, porque metade do grupo tinha mais de um sítio metastático ($p=0,029$).

No grupo KRAS mutado, os níveis de CEA acima de 5 ng/ml, foram identificados com mais frequência quando comparados ao grupo KRAS do tipo selvagem ($p=0,048$). Estudo recente não mostra correlação entre os níveis de CEA (ponto de corte 200) e o status KRAS entre 193 pacientes com CCR metastático⁸. Portanto, é difícil sustentar a correlação entre os níveis de CEA e o status de KRAS devido à heterogeneidade dos pontos de corte, metodologia laboratorial diversificada empregada, número e etnia dos pacientes entre os estudos.

A taxa de sobrevida global estimada em 60 meses para os pacientes foi de 26,7%. O efeito da interação entre o site primário e o status KRAS não foi detectado ($p=0,961$). Além disso, os resultados revelaram que os pacientes com localização retal apresentaram maior sobrevida quando comparados aos com localização no cólon ($p=0,009$). Não foi possível mostrar relação do tipo KRAS com a sobrevida ($p=0,144$).

A mutação KRAS confere pior prognóstico, como mostrado em muitos estudos^{3,24}, mas alguns achados discordantes foram relatados⁶. Uma explicação para essa controvérsia é que diferentes mutações no mesmo gene podem causar influências prognósticas diferentes. Por exemplo, no estudo RASCAL multicêntrico, foi avaliada a significância prognóstica das mutações no códon 12 ou 13 em 2721 pacientes de 13 países. A análise multivariada mostrou que apenas as mutações no códon 12 foram associadas independentemente a um risco aumentado de recorrência e morte. No entanto, após expandir a amostra para incluir 4268 pacientes, análises subsequentes mostram 12 possíveis mutações nos códons 12 e 13, mas apenas uma mutação específica no códon 12 (9%) foi significativamente associada a um resultado adverso, e principalmente em pacientes com linfonodos positivos². Embora haja menos informação disponível, as mutações no NRAS também estão associadas a um pior prognóstico⁴.

Embora a eficácia do tratamento e a avaliação dos resultados clínicos não sejam os objetivos deste estudo, ela também pode influenciar a sobrevida, pois os resultados da frequência das mutações do RAS também podem, mas infelizmente esses dados não estavam disponíveis (exceto o KRAS exon 2). Além disso,

considerando o possível impacto das mutações RAS nos resultados gerais da população analisada, isso pode não ser expressivo devido às poucas frequências de mutações não-KRAS exon 2 registradas. Além disso, somente em 2015 a Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) recomendou o uso prolongado do teste RAS para todos os pacientes candidatos ao tratamento com inibidores de EGFR.

As amostras de DNA deste estudo foram derivadas de tumor primário ou metástase, porque a literatura mostrou que as mutações no KRAS, NRAS e BRAF são semelhantes nos dois tipos de amostras^{15,20,29} e não há discordância no status do KRAS em diferentes períodos dos pacientes avaliados, inclusive no momento do diagnóstico inicial do tumor e posteriormente no curso da doença no período metastático e após quimioterapia citotóxica. No entanto, dados desafiadores foram recentemente demonstrados que o teste de tumor primário em um único local na doença colorretal metastática sincrônica pode resultar em perfil incompleto da mutação do KRAS e, conseqüentemente, uma escolha incorreta do uso de inibidores do EGFR como tratamento¹⁰. Este estudo apontou diferença estatisticamente significante de sobrevida em pacientes brasileiros metastáticos com tumores primários do cólon tratados em um centro de oncologia médica, de acordo com a rotina estabelecida da prática clínica. Há expectativa de com pesquisas futuras, levar a ampliar nosso reconhecimento por caracterizar vários biomarcadores envolvidos na carcinogênese colorretal e estabelecer variáveis clinicopatológicas para buscar novos tratamentos eficazes e personalizados.

CONCLUSÃO

A mutação KRAS foi identificada em quase metade dos pacientes. Níveis elevados de CEA foram observados com mais frequência no grupo mutado e a mutação no códon 13 foi associada ao envolvimento de mais de um local metastático no curso da doença. A doença primária do cólon foi associada com pior sobrevida global. Nenhuma das outras características clinicopatológicas avaliadas foi relacionada à presença de mutação.

REFERÊNCIAS

1. Agresti A. Categorical data analysis. New York: Wiley; 1990.
2. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, Iacopetta BJ, et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the "RASCAL II" study. *Br J Cancer* [Internet]. 2001 Sep 1;85(5):692–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11531254>
3. Andreyev HJN, Norman AR, Clarke PA, Cunningham D, Oates JR. Kirsten ras Mutations in Patients With Colorectal Cancer: the Multicenter "RASCAL" Study. *JNCI J Natl Cancer Inst* [Internet]. 1998 May 6;90(9):675–84. Available from: <https://doi.org/10.1093/jnci/90.9.675>
4. Cercek A, Braghieri MI, Chou JF, Hechtman JF, Kemeny N, Saltz L, et al. Clinical Features and Outcomes of Patients with Colorectal Cancers Harboring NRAS Mutations. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2017 Aug 15;23(16):4753LP–4760. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/23/16/4753.abstract>
5. Ciardiello F, Normanno N, Martinelli E, Troiani T, Pisconti S, Cardone C, et al. Cetuximab continuation after first progression in metastatic colorectal cancer (CAPRI-GOIM): a randomized phase II trial of FOLFOX plus cetuximab versus FOLFOX. *Ann Oncol* [Internet]. 2016 Jun 1;27(6):1055–61. Available from: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw136>
6. Clarke GA, Ryan E, Crowe JP, O'Keane JC, MacMathúna P. Tumour-derived mutated K-ras codon 12 expression in regional lymph nodes of stage II colorectal cancer patients is not associated with increased risk of cancer-related death. *Int J Colorectal Dis* [Internet]. 2001;16(2):108–11. Available from: <https://doi.org/10.1007/s003840100291>
7. Collaboration GB of DC, Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol*. 2017 Apr 1;3(4):524–48.
8. Connell LC, Chou JF, Boucher TM, Capanu M, Kemeny NE. Relevance of CEA and LDH in relation to KRAS status in patients with unresectable colorectal liver metastases. *J Clin Oncol* [Internet]. 2016 Feb 1;34(4_suppl):762. Available from: https://doi.org/10.1200/jco.2016.34.4_suppl.762

9. de Carvalho LEW, Sarraf JS, Oliveira ACM, Neto NDB, Câmara TF, Fonseca FLA, et al. What Is Different in the Population of the Brazilian Amazon Region so that They Have a Low Frequency of KRAS Gene Mutations? *Case Rep Oncol* [Internet]. 2017 Aug 23;10(2):777–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28966582>
10. de Macedo MP, de Melo FM, Ribeiro J da S, de Mello CAL, de Souza Begnami MDF, Soares FA, et al. RAS mutations vary between lesions in synchronous primary colorectal cancer: testing only one lesion is not sufficient to guide anti-EGFR treatment decisions. *Oncoscience* [Internet]. 2015 Feb 9;2(2):125–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25859555>
11. Douillard J-Y, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Panitumumab–FOLFFOX4 Treatment and RAS Mutations in Colorectal Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2013 Sep 11;369(11):1023–34. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1305275>
12. Enrico Antônio Colosimo SRG. Análise de Sobrevida Aplicada. 1o. Blucher; 2006. 392 p.
13. Gil Ferreira C, Aran V, Zalcborg-Renault I, Victorino AP, Salem JH, Bonamino MH, et al. KRAS mutations: variable incidences in a Brazilian cohort of 8,234 metastatic colorectal cancer patients. *BMC Gastroenterol* [Internet]. 2014 Apr 10;14:73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24720724>
14. INCA. Estimativa 2018-Incidência de câncer no Brasil [Internet]. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. 2017. 130 p. Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>
15. Knijn N, Mekenkamp LJM, Klomp M, Vink-Börger ME, Tol J, Teerenstra S, et al. KRAS mutation analysis: a comparison between primary tumours and matched liver metastases in 305 colorectal cancer patients. *Br J Cancer* [Internet]. 2011/03/01. 2011 Mar 15;104(6):1020–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21364579>
16. Lièvre A, Bachet J-B, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, et al. KRAS Mutations As an Independent Prognostic Factor in Patients With Advanced Colorectal Cancer Treated With Cetuximab. *J Clin Oncol* [Internet]. 2008 Jan 20;26(3):374–9. Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.12.5906>
17. Liu Z, Zhang Y, Niu Y, Li K, Liu X, Chen H, et al. A systematic review and meta-analysis of diagnostic and prognostic serum biomarkers of colorectal cancer. *PLoS One* [Internet]. 2014 Aug 8;9(8):e103910–e103910. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25105762>
18. Loupakis F, Yang D, Yau L, Feng S, Cremolini C, Zhang W, et al. Primary tumor location as a prognostic factor in metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2015 Feb 24;107(3):dju427. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25713148>
19. Neumann J, Zeindl-Eberhart E, Kirchner T, Jung A. Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer. *Pathol - Res Pract* [Internet]. 2009;205(12):858–62. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0344033809002003>
20. Paliogiannis P, Cossu A, Tanda F, Palmieri G, Palomba G. KRAS mutational concordance between primary and metastatic colorectal adenocarcinoma. *Oncol Lett* [Internet]. 2014/08/04. 2014 Oct;8(4):1422–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25202344>
21. Shah SA, Haddad R, Al-Sukhni W, Kim RD, Greig PD, Grant DR, et al. Surgical resection of hepatic and pulmonary metastases from colorectal carcinoma. *J Am Coll Surg*. 2006;202(3):468–75.
22. Shen H, Yuan Y, Hu H-G, Zhong X, Ye X-X, Li M-D, et al. Clinical significance of K-ras and BRAF mutations in Chinese colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2011 Feb 14;17(6):809–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21390154>
23. Soulières D, Greer W, Magliocco AM, Huntsman D, Young S, Tsao M-S, et al. KRAS mutation testing in the treatment of metastatic colorectal cancer with anti-EGFR therapies. *Curr Oncol* [Internet]. 2010 Jul;17 Suppl 1(Suppl 1):S31–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20680106>
24. Taieb J, Zaanan A, Le Malicot K, Julié C, Blons H, Mineur L, et al. Prognostic Effect of BRAF and KRAS Mutations in Patients With Stage III Colon Cancer Treated With Leucovorin, Fluorouracil, and Oxaliplatin With or Without Cetuximab: A Post Hoc Analysis of the PETACC-8 Trial. *JAMA Oncol* [Internet]. 2016 May 1;2(5):643–53. Available from: <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.5225>
25. Team RC. R: A language and environment for statistical computing. [Internet]. R Foundation for Statistical Computing. 2018. Available from: <https://www.r-project.org/>
26. Van Cutsem E, Köhne C-H, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien C-R, Makhson A, et al. Cetuximab and Chemotherapy as Initial Treatment for Metastatic Colorectal Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2009 Apr 2;360(14):1408–17. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0805019>
27. Van Cutsem E, Köhne C-H, Láng I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, et al. Cetuximab Plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin As First-Line Treatment for Metastatic Colorectal Cancer: Updated Analysis of Overall Survival According to Tumor KRAS and BRAF Mutation Status. *J Clin Oncol* [Internet]. 2011 Apr 18;29(15):2011–9. Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.33.5091>
28. Van Cutsem E, Lenz H-J, Köhne C-H, Heinemann V, Tejpar S, Melezinek I, et al. Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan Plus Cetuximab Treatment and RAS Mutations in Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 2015 Jan 20;33(7):692–700. Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.4812>
29. Veldore V, Rao R, Prabhudesai SA, Tejaswi R, Kakara S, Pattanayak S, et al. Prevalence of KRAS mutations in metastatic colorectal cancer: A retrospective observational study from India. *Indian J Cancer*. 2014 Oct 1;51:531.
30. Yaeger R, Cowell E, Chou JF, Gewirtz AN, Borsu L, Vakiani E, et al. RAS mutations affect pattern of metastatic spread and increase propensity for brain metastasis in colorectal cancer. *Cancer* [Internet]. 2014/12/09. 2015 Apr 15;121(8):1195–203. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25491172>