
Frecuencia y asociación clinicopatológico de las mutaciones del oncogen *K-ras* en pacientes venezolanos con cáncer colorectal.

*Pedro Estrada*¹, *Alicia Rojas-Atencio*², *William Zabala*², *Lisbeth Borjas*², *Lazaro Soca*², *Karelis Urdaneta*², *Francisco Alvarez-Nava*², *Jenny Cañizales*², *Janeth Rojas*² y *Marisol Soto*².

¹Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado, Barquisimeto, Venezuela y

²Unidad de Genética Médica, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

Palabras clave: Mutación *K-ras*, cáncer de colon, pronóstico.

Resumen. Las mutaciones en el oncogén *K-ras* son comunes en cáncer colo-rectal, afectan el comportamiento biológico y podrían influir en la susceptibilidad terapéutica en estos tumores. El objetivo de este trabajo fue identificar los tipos de mutación *K-ras* observados en pacientes referidos con cáncer colo-rectal y relacionarlos con el grado de diferenciación histológica y con el estadio clínico. Se obtuvo ADN genómico tanto de tejido tumoral incluido en parafina, como de tejido fresco. Se amplificó el gen *K-ras* a través de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) y se digirieron los fragmentos amplificados con enzimas de restricción, por último se obtuvieron datos clínicos e histopatológicos de las historias clínicas. Se encontraron mutaciones en los codones 12 y 13 del oncogén *K-ras* en el 23,33% de los pacientes. De estos 28,57% en el codón 12, en el codón 13 se encontró un 57,14% y 14,29% para ambos codones. Fueron más frecuentes en el hemicolon izquierdo con 78,57% y según la clasificación histológica en los adenocarcinomas bien diferenciados (58,70%) y en los mucinosos (28,57%). Las mutaciones identificadas fueron mas frecuentes en estadios avanzados C2 de la clasificación de Dukes`. El análisis molecular del oncogén *K-ras* permitió evidenciar mutaciones que sirven como parámetro diagnóstico y pronóstico en los tumores colo-rectales. La frecuencia de mutaciones encontradas en este trabajo es similar a algunas de las reportadas a nivel mundial, sin embargo difieren en el tipo de mutación mas frecuente, que en nuestro medio fue la mutación del codón 13 del gen con más de un 50%

Frequency and clinicopathological associations of K-ras mutations in Venezuelan patients with colo-rectal cancer.

Invest Clin 2009; 50(1): 55 - 63

Key words: *K-ras* mutations, colo-rectal cancer, prognostic.

Abstract. Mutations in the K-ras oncogene are common in colo-rectal cancer, which affect the biological behaviour and may influence the susceptibility to therapy in these tumors. The objective of this work was to identify the types of K-ras mutations observed in referred patients with colo-rectal cancer and to relate them to their degree of histological differentiation and clinical stage. Histopathological and clinical data were obtained from medical records. DNA was obtained from both, fresh tissue and tumor tissue embedded in paraffin. The K-ras gene was amplified through the polymerase chain reaction (PCR) and the amplified fragments were digested with restriction enzymes. We found mutations in codons 12 and 13 of the K-ras oncogene in 23.33% of patients. Of these, 28.57% were located at codon 12, 57.14% were at codon 13 and 14.29% at both codons. They were more frequent in tumors located in the left hemicolon and, according to their histological type, were more frequent in well differentiated adenocarcinomas (58.70%) and in mucinous (28.57%). The identified mutations were more frequent in advanced stages (C2) of Dukes' classification. The molecular analysis of the K-ras oncogene made mutations evident, which could be useful in the diagnosis and prognosis of colorectal tumors. The frequency of mutations found in this work is similar to some of those reported worldwide; however, they differ in the more frequent type of mutation, which, in our study, was located at codon 13 in more than 50% of the cases.

Recibido: 10-03-2008, Aceptado: 26-06-2008.

INTRODUCCIÓN

El carcinoma de colon es uno de los cánceres del tracto gastrointestinal más comunes en Venezuela donde ocupa el 5º lugar como causa de muerte por cáncer en los adultos y es en algunas partes del país, la primera causa de origen gastrointestinal (1). Las causas y la patogénesis del carcinoma de colon y recto, están relacionadas tanto a factores ambientales como genéticos. Los factores ambientales son fundamentalmente dietéticos, en particular, la ingesta de grasas y de proteína animal por su influencia sobre la microflora intestinal y so-

bre la composición química del líquido intraluminal (2-3). El cáncer se desarrolla como resultado de alteraciones genéticas que causan un desorden progresivo de los mecanismos normales que controlan el crecimiento celular (4). Los carcinomas de colon pueden presentarse en forma de sangrado rectal, cambios en el hábito intestinal, anemia resultante de pérdida sanguínea crónica y dolor abdominal vago. La obstrucción intestinal es común cuando el tumor está situado en el colon izquierdo; la perforación puede ocurrir en raras ocasiones.

Desafortunadamente, la aparición de síntomas es con frecuencia indicativa de en-

fermedad avanzada; por esta razón se han realizado numerosos intentos para detectar los tumores en estadios tempranos. Uno de los grandes avances en la genética molecular de los tumores colo-rectales fue la identificación de mutaciones en el oncogén *K-ras* (3). La mayoría de las mutaciones *K-ras* identificadas (85%) está confinada a los codones 12 y 13, el resto al codón 61 y recientemente un estudio japonés demostró la presencia de tres mutaciones en el codón 19 de este mismo gen (5). Las mutaciones en los codones 12 y 13 están asociadas a más del 50% de estos tumores. Las relaciones entre el tipo de mutación *K-ras* y el pronóstico del cáncer de colon y recto han sido investigadas intensamente (6-9). Cerrhini y col. reportaron una clasificación genotípica pronóstica según el tipo de mutación *K-ras* (10) La detección de estas mutaciones en estadios tempranos de la secuencia adenoma-carcinoma, permite el seguimiento estricto de los pacientes; la determinación de la relación de las mutaciones con su pronóstico es vital para establecer la secuencia de eventos moleculares que ocurren previos al desarrollo de carcinoma (11). Recientemente se ha descrito la relación de actividad del gen *K-ras* con nuevas terapias que podrían ser específicas en pacientes con que presentan cáncer con actividad de *K-ras* (12).

El objetivo de este trabajo fue identificar los tipos de mutación *K-ras* observados en los pacientes referidos con cáncer colo-rectal y relacionarlo con el grado de diferenciación histológica y el estadio clínico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 52 muestras de tejido incluido en parafina y 8 muestras de tejido fresco, de pacientes con edades comprendidas entre 50 y 59 años, de sexo masculino y femenino, padres venezolanos, referidos de los servicios de Gastroenterología de los

hospitales públicos o privados de la región, con diagnóstico anatomopatológico de adenocarcinomas de colon o recto. Se recopiló la historia clínica de estos pacientes los datos epidemiológicos, clínicos, y de laboratorio pertinentes y se registraron en una ficha elaborada para tal fin. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes. Así mismo el proyecto fue aprobado por el comité de ética de la Unidad de Genética Médica de la Universidad del Zulia. Las muestras frescas fueron guardadas a -70°C hasta el aislamiento del ADN genómico mediante tratamiento con SDS, proteína K y extracción con fenol-cloroformo, descrito por Senagore y col. (13). En cuanto a las muestras de tejido incluido en parafina, se procedió a realizar cortes de $10\mu\text{m}$, calentados posteriormente a 60°C por 30 min, luego fueron desparafinados e incubados con proteína K como ha sido descrito por Cotran y col. (14). Se procedió luego a la identificación de las mutaciones en los codones 12 y 13 mediante la utilización de la técnica de RCP y enzimas de restricción. Para el codón 12 se empleó la enzima BstNI y para el codón 13 la enzima HAE III (15). Se realizó el análisis estadístico de los resultados mediante prueba de χ^2 , la cual se consideró significativa si la *p* era menor a 0,05.

RESULTADOS

El grupo de estudio estuvo constituido por 60 pacientes, 32 (53,33%) de sexo masculino y 28 (46,67%) del femenino. El promedio de edades fue de $59,86 \pm 1,3$ años. En cuanto a la clasificación histológica 34/60 (56,67%) eran adenocarcinomas bien diferenciados, 6/60 (10,00%) fueron carcinomas moderadamente diferenciados, 8/60 (13,33%) eran adenocarcinomas pobremente diferenciados y 12/60 (20,00%) fueron carcinomas mucinosos (Tabla I). En la distribución de los tumores según su localiza-

ción anatómica, se evidenciaron 38 (63,33%) en el colon izquierdo y 22 (36,67%) en el colon derecho.

Se identificaron mutaciones del oncogén *K-ras* en 14/60 tumores (23,33%), 4/14 (28,57%) en el codón 12, 8/14 (57,14%) en el codón 13, y 2/14 (14,29%) en ambos codones. El promedio de edad de los pacientes sin mutaciones fue de 60,47 \pm 1,5 años y el grupo etario más afectado fue el de 50 a 59 años. Al analizar la distribución de los tumores de colon y recto según la localización anatómica y el estado *K-ras*, hubo un predominio del lado izquierdo en ambos grupos con 78,57% en los mutados y de 58,78% en los no mutados, no se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos con un $X^2 = 1.25$ ($p = 0,263$) (Tabla I)

Los tipos histológicos más frecuentes en los pacientes que no presentaron la mutación, fueron el adenocarcinoma bien diferenciado con 56,52% y los adenocarcinomas pobremente diferenciados con 17,39%, mientras que en los pacientes que tenían la mutación del oncogén *K-ras* fueron los ade-

nocarcinomas bien diferenciados y los carcinomas mucinosos con 57,14% y 28,57% respectivamente (Tabla I).

Al comparar el estado *K-ras* con el estadio clínico del cáncer se evidenció que el 52,17% de los pacientes sin la mutación estaban ubicados en estadio B2 y 30,43% en el C2, mientras que los pacientes con la mutación se ubicaron 57,14% en estadio C2 y 42,86% en estadio B2 (Tabla II).

Para realizar adecuadamente el análisis estadístico, los pacientes fueron clasificados en dos grupos según el estadio clínico de Dukes: estadios tempranos (A y B) y estadios avanzados (C y D) y se distribuyeron de acuerdo al estado *K-ras*, evidenciándose que el 69,56% de los pacientes que no presentaban la mutación se ubicaban en estadios clínicos tempranos, mientras que el 57,14% de los que presentaban la mutación en cualquiera de los codones, se encontraban en estadios clínicos avanzados; sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p = 0,334$).

La Fig. 1 muestra los casos 06, 15 y 34, con bandas de 103, y 86 pb indicando

TABLA I
DISTRIBUCIÓN DE LOS TUMORES COLO-RECTALES SEGÚN EL TIPO HISTOLÓGICO Y EL ESTADO *K-ras* (AÑOS 1999-2006)

Tipo histológico	Estado <i>K-ras</i>							
	No mutados				Mutados			
	N	(%)	Der	Izq	N	(%)	Der	Izq
Adenocarcinoma bien diferenciado	26	56,52	6	20	8	57,14	1	7
Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	4	8,69	2	2	2	14,28	0	2
Adenocarcinoma pobremente diferenciado	8	17,39	5	3	0	0	0	0
Carcinoma mucinoso	8	17,39	6	2	4	28,57	2	2
Total	46	100	19	27	14	100	3	11

% Mutación colon izquierdo: 78,57%. No mutados colon izquierdo: 58,70%. $P = 0,263$.

TABLA II
DISTRIBUCIÓN DE LOS TUMORES COLO-RECTALES SEGÚN EL ESTADÍO CLÍNICO DE DUKES
Y EL ESTADO K-RAS (AÑOS 1999-2006)

Estado Clínico (DUKES)	Estado <i>K-ras-2</i>			
	No Mutado	%	Mutado	%
A	0	0	0	0
B1	8	17,39	0	0
B2	24	52,17	6	42,86
C1	0	0	0	0
C2	14	30,43	8	57,14
D	0	0	0	0
Total	46	100%	14	100%



Los casos 06, 15 y 34, con bandas de 103, y 86 pb indicando mutación en el codón 12 de tipo heterocigota (Enzima BstNI). La muestra 15, a su vez, presenta una banda de 71 pb indicando mutación en el codón 13 (Enzima HAE III).

MPM: Marcador de peso molecular. c/sd: control sin digerir.

Fig. 1. Diagnóstico molecular de mutaciones *K-ras* en los codones 12 y 13.

mutación de tipo heterocigoto, en el codon 12, mientras que en la muestra 15 a su vez se observa una banda de 71 pb que indica mutación en el codón 13.

DISCUSIÓN

La identificación de factores pronóstico de los tumores malignos, ha constituido uno de los propósitos más importantes a los

cuales se han dirigido la mayor parte de las investigaciones en los últimos años, aspectos como la edad, sexo, tipo histológico, grado de infiltración y edad de aparición ha sido objeto de profundos análisis. La definición de las alteraciones genéticas asociadas con las neoplasias se ha utilizado como herramienta en la evaluación del pronóstico de los tumores.

El oncogén *K-ras* ha sido asociado con el desarrollo del cáncer de colon y constituye uno de los eventos tempranos que suceden en la secuencia adenoma-carcinoma y su identificación permite tener un indicador temprano de malignidad. Esto ha llevado a los investigadores a nivel mundial a emplear técnicas que permiten la identificación temprana de esta mutación en muestras biológicas que son más accesibles para su análisis (15).

En cuanto a la distribución por sexo se observó que no hubo diferencias, lo cual coincide con lo observado por Senagore y col. (13). El grupo de edad más afectado se ubicó entre los 50 y 59 años, esto contrasta con los resultados reportados por Cotram y col (14), que lo ubicaron entre los 60 y 69 años, esta diferencia puede deberse al tamaño de la muestra y a la localización anatómica de los tumores estudiados, aunque no pueden descartarse otros factores como la influencia de la dieta y los hábitos como el alcohol y el tabaco en el adelanto de la edad de aparición.

Al considerar la clasificación histológica, el 34/60 (56,67%) eran adenocarcinomas bien diferenciados, porcentaje mayor a los mostrados por Senagore y col. (15%) (13), estos tumores independientemente de otros factores se consideran de buen pronóstico. En cuanto a la localización anatómica hubo un predominio de los tumores de colon y recto localizados en el colon izquierdo con 63,33%, resultados similares a los obtenidos por Martínez-Garza y col. (16), pero que contrastan con los ha-

llados por Bleeker y col. (17) y Rosai y col. (2) quienes encontraron una mayor frecuencia en el colon derecho. Esto ubica a la muestra investigada, al menos desde el punto de vista topográfico, relacionada con la población del Noreste de México. Los tumores de colon izquierdo son por lo general, más agresivos y de aparición más temprana, lo que podría explicar la discrepancia en la edad de aparición del tumor, al compararla con los estudios de autores norteamericanos.

El porcentaje de mutaciones del oncogén *K-ras* observado fue del 23,33% de los tumores colo-rectales evaluados, estos resultados son menores a los reportados por Bos y col. (40,7%) (6), Capella y col. (40,1%) (18), Benhattar y col. (71%)(7), Finkelstein y col. (35%)(10), pero similares a lo hallado por Martínez-Garza y col. (38%) (16), y Wu y col. (19), quienes encontraron un 26%. Estas discrepancias son debidas quizás, a diferencias étnicas, como fue enumerado por Neuhausen y col. (20), o variaciones en la metodología de estudio. Recientemente se han incluido en el mercado, estuches para la identificación de mutaciones en los codones 12 y 13 del oncogén *K-ras* para lo cual se utiliza un secuenciador de alta eficiencia, como fue señalado por Amado R y col. (21). Los criterios de inclusión en el estudio, como en el caso de Benhattar y col. (7), que incluyen en su investigación sólo pólipos vellosos o tubulovellosos, excluyendo los adenomas tubulares. Estos datos sugieren que epidemiológica y étnicamente existen semejanzas entre la población estudiada en esta investigación y la del Noreste de México.

Al comparar el grupo de pacientes según el tipo histológico y el estado *K-ras* es notable que entre los no mutados el 17,39% sean carcinomas mucinosos, comparados con 28,57% en los mutados. Los carcinomas mucinosos son histológicamente más agresivos que el resto de los adenocarcinomas

de colon y recto, lo que se explica por su mayor frecuencia de mutaciones. Al analizar la distribución anatómica y el estado *K-ras* hubo un predominio del hemicolon izquierdo tanto en los pacientes que presentan la mutación (78,57%) como en aquellos que no la presentan (58,70%), sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, resultados similares a los reportados por Martínez-Garza y col. (16), mientras Benhattar y col. (7), reportaron un predominio de mutaciones en el colon izquierdo lo cual fue significativo estadísticamente.

Se compararon los grupos de pacientes cuyos tumores presentaban mutación del oncogén *K-ras* con los que no lo presentaban, utilizando como parámetro de comparación al estadio clínico, ubicándose a los pacientes en estadios Dukes A y B, como estadios tempranos y Dukes B y C, como estadios avanzados. El 30,43% de los pacientes cuyos tumores no presentaban mutación del oncogén *K-ras*, se ubicaba en estadios avanzados de la enfermedad comparados con 57,14% en aquellos pacientes que presentaban algún tipo de mutación, estos resultados aunque estadísticamente no significativos son notablemente similares a los reportados por Benhattar y col. (7), 26% de los tumores sin mutaciones *K-ras*, se encuentran en estadios avanzados del cáncer y presentan recurrencia del tumor posterior a cirugía, comparado con 57% en los que son positivos para mutaciones del oncogén, resultados estos que fueron estadísticamente significativos, esto permite utilizar la identificación de las mutaciones del oncogén *K-ras* como factor pronóstico independiente, como fue previamente propuesto por Pajkos y col. (22), Cerottini y col. (10) y Benhattar y col. (7). Más recientemente, las mutaciones en este gen han sido relacionadas con resistencia a la acción de medicamentos utilizados en esta enfermedad (11, 23).

Lograr establecer la presencia de mutaciones *K-ras* es especialmente importante en los carcinomas colo-rectales con estadio clínico B de Dukes. En este caso, los tumores investigados que resulten negativos para la mutación, podrían ser tratados sólo con cirugía, mientras que en los casos que presenten mutaciones *K-ras* la quimioterapia o quimioradioterapia adyuvante a la cirugía estarían justificadas.

En conclusión, este estudio, el primero realizado en epidemiología molecular del carcinoma de colon y recto en Venezuela, proporciona nuevos argumentos que dan soporte a la hipótesis que el oncogén *K-ras* mutado contribuye a la progresión del tumor y en conjunción con otras investigaciones provee evidencia que asocia la activación mutacional *K-ras* con estadios tempranos de la tumorigénesis colo-rectal, estadio precoz de la secuencia adenoma-carcinoma. Por otro lado, esta investigación relaciona las mutaciones del oncogén *K-ras*, con el tiempo de supervivencia y la asocia con otros parámetros clínicos e histopatológicos tales como edad, estadio clínico, tipo histológico, grado de diferenciación tumoral y localización del tumor primario y logra evidenciar su importancia como factor pronóstico independiente. Es importante señalar la aparición de medicamentos creados contra receptores de factores de crecimiento epidérmico (EGFR), donde la presencia de mutación *K-ras* ha sido asociada a resistencia a esta droga (23-25).

REFERENCIAS

1. **Anuario de epidemiología y estadística MPPS.** 2006, Venezuela.
2. **Rosai J. Ackerman's.** Surgical Pathology. Ed. Mosby Company. 1995 (1) 832-840.
3. **Scriver C, Beaudet A., Sly W, Valle D.** The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease on CD-ROM. 1997.
4. **Vogelstein B, Fearon E., Hamilton S, Kern S. Preisinger A, Leppert M,**

- Nakamura Y, Whiter, Smits A, Bos J. Genetics Alteration During Colorectal Tumor Development. *N Engl J. Med* 1988; 319: 525-531.
5. Akagi K, Uchibori R, Yamaguchi K, Kurosawa K, Tanaka Y, Koza T. Characterization of a novel oncogenic *K-ras* mutation in colon cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 352:728-732.
 6. Benhattar J, Losi L, Chaubert P, Givel J, Costa J. Prognostic Significance of K-RAS mutation in colorectal carcinoma. *Gastroenterology* 1993; 104:1044-1048.
 7. Spandidos D, Glarakis I, Kotsinas A, Ergasaki M, Kiaris H. RAS Oncogene Activation in Bening and Malignant Colo-rectal Tumours. *Tumori* 1995; 81:7-11.
 8. Finkelstein S, Sayegh R, Bakker A, Swalski P. Determination of Tumor Aggressiveness in Colorectal Cancer by K-RAS-2 Analysis. *Arch Surg* 1993; 128: 526-532.
 9. Finkelstein S, Sayegh R, Christensen S, Swalski P. Genotypic Classification of Colorectal Adenocarcinoma. *Cancer* 1993; 71:3827-3838.
 10. Cerottini J, Caplin S, Saraga E, Givel J, Benhattar J. The type of *K-RAS* Mutation Determines Prognosis in Colorectal Cancer. *Am J. Surg* 1998; 175:198-202.
 11. Sarthy AV, Morgan-Lappe S, Zakula D, Verneti L, Schurdak M, Packer JC, Anderson MG, Shirasawa S, Sasazuki T, Fesik S. Survivi depletion preferentially reduces the survival of activated *K-ras* transformed cells. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 269-276.
 12. Goelz SE, Stainley R, Hamilton SR, Vogelstein B. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 130:118-126.
 13. Senagore AJ, Biener JT. A newly identified pattern of *K-ras* mutations at codons 12 and 13 is associated with long-term survival in colorectal cancer *Surgery* 1997; 122:765-770.
 14. Cotran R, Kumar V, Robbins S. *Patología Estructural y Funcional*. Ed. Mc Graw Hill 1995; pp 289-305.
 15. Rennert G, Kislitsin D, Brenner D, Rennert HS, Lev Z. Detecting *K-ras* mutation instool from fecal occult blood test card in multiphasic screening for colorectal cancer. *Cancer Letts* 2007; 253: 258-264
 16. Martinez-Garza S.G, Nuñez-Salazar A, Calderon AL, Bosques FJ, Niderhauser A, Barrera-Saldaña H. Frequency and clinicopathology associations of *K-ras* mutations in colorectal cancer in a northeast Mexican population. *Dig Dis* 1999; 17(4):225-9.
 17. Bleeker W.A, Hayes V.M, Karrenbeld A, Hofstra M.W, Hermans J, Buys C.H, Pluckker M. Impact of *K-ras* and TP53 mutations on survival in patients with left and right side Duckes' colon cancer. *Am J of Gastroenterol* 2000; 95: 2953-2957.
 18. Wu CM, Tang R, Wang JY, Changchien CR, Hsieh LL. Frequency and spectrum of K-RAS codons 12 and 13 mutations in colorectal adenocarcinomas from Taiwan. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; 158:55-60.
 19. Capella G, Cronauer-Mitra S, Peinado M, Perucho M. Frequency and Spectrum of Mutation at Codon 12 and 13 of the *K-ras* Gene in Human Tumors. *Environ Health Perspect* 1991; 93:125-131.
 20. Neuhausen SL. Ethnic differences in cancer risk resulting from genetic variation. *Cancer* 1999; 86(II Suppl):2575-2582.
 21. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, Chang DD. Wild-Type *KRAS* is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26:1626-1634.
 22. Pajkos G, Kiss I, Sandor J, Ember I, Kishazi P. Prognostic value of the presence of the mutation of the codons 12, 13 and 61 in *K-ras* oncogene in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2000; 20:1695-1701.
 23. Massarelli E, Varella Garcia M, Tang X, Xavier A, Ozburn N, Liu D, Bekele B, Herbst R, Wistuba I. *KRAS* Mutation is an important predictor of resistance to therapy with Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in

- Non-Small Cell Lung Cancer. Clin Cancer Res 2007; 13:2890-2896.
24. **Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, Cote JF, Tomasic G, Penna CH, Ducreux M, Rougier P, Penault-Llorea F, Laurent-Puig P.** *K-ras* mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. Cancer Res 2006; 66:3992-3995.
25. **Baselga J, Rosen N.** Determinants of RASistance to anti-epidermal growth factor receptor agents. J Clin Oncol 2008; 26:1582-1584.