

ARTÍCULO ORIGINAL

Frecuencia de las mutaciones en los genes KRAS, NRAS y BRAF en biopsias de pacientes con cáncer colorrectal primario y metastásico que llegan a una IPS de tercer Nivel en la Ciudad de Medellín, durante el periodo Junio 2017 - Abril 2021

Frequency of mutations in the KRAS, NRAS and BRAF genes in biopsies of patients with primary and metastatic colorectal cancer who reach a third-level IPS in the City of Medellín, during the period June 2017 - April 2021

Erika Pino¹, Claudia Benítez¹, Laura Orozco¹, Olga Rincón², Beatriz Aristizábal², Clara Aristizábal²

Fecha de sometimiento: 04/02/2021, fecha de aceptación: 12/10/2021
Disponible en internet: 26/09/2022
<https://doi.org/10.35509/01239015.766>

Abstract

Background: Colorectal cancer (CRC) is a complex entity; it comprises a set of neoplastic diseases that present various genetic and epigenetic alterations. These changes play an important role in the development, response to treatment, and prognosis of CRC. **Objective:** To determine the frequency of the KRAS, NRAS and BRAF genes in biopsies of patients with primary and metastatic colorectal cancer who reach a third level laboratory in the City of Medellín during the period June 2017 - April 2021. **Methods:** Retrospective study where Paraffin-embedded biopsies were included from patients with primary and metastatic CRC. KRAS, NRAS and BRAF genes were evaluated by real-time PCR using the Idylla platform. **Results:** A total of 816 biopsies were included in the study, 81.9% corresponded to patients with primary CRC, with a predominance of cases in the rectum. The distribution of mutational status for the total study population was: mutated 463 cases (56,7%), wild type or non-mutated 307 cases (37,6%) and inconclusive 46 cases (5,7%). Of the mutated cases, 393 (84,9%), 43 (9,3%), 26 (5,6%), and 1 (0,2%) occurred in KRAS, BRAF, NRAS, and NRAS/BRAF respectively. **Conclusion:** CRC is a heterogeneous disease due to the various factors associated with its development, especially genetic changes and/or alterations. Exploring the KRAS, NRAS, and BRAF mutational status of patients with primary and metastatic CRC proves important due to their influence on prognosis and overall survival..

Keywords: Colorectal cancer, KRAS, NRAS, BRAF, EGFR.

Resumen

Antecedentes: El cáncer colorrectal (CCR) es una entidad compleja; comprende un conjunto de enfermedades neoplásicas que presenta diversas alteraciones genéticas y epigenéticas. Estas alteraciones desempeñan un papel importante en el desarrollo, la respuesta al tratamiento y el pronóstico del CCR. **Objetivo:** Determinar la frecuencia de los genes KRAS, NRAS y BRAF en biopsias de pacientes con cáncer colorrectal primario y metastásico que llegan a un laboratorio de tercer nivel en la Ciudad de Medellín, durante el periodo Junio 2017 - Abril 2021. **Métodos:** Estudio retrospectivo donde se incluyeron biopsias embebidas en parafina de pacientes con CCR primario y metastásico. Se evaluaron los genes KRAS, NRAS y BRAF mediante PCR en tiempo real utilizando la plataforma Idylla. **Resultados:** Un total de 816 biopsias fueron incluidas en el estudio, el 81,9% de los casos correspondían a pacientes con CCR primario, con predominio en recto. La distribución del estado mutacional para el total de la población de estudio fue: mutados 463 casos (56,7%), tipo salvaje o no mutados 307 casos (37,6%) y no concluyente 46 casos (5,7%). De los casos mutados, 393 (84,9%), 43 (9,3%), 26 (5,6%) y 1 (0,2%) se presentaron en KRAS, BRAF, NRAS, y NRAS/BRAF respectivamente. **Conclusión:** El CCR es una enfermedad heterogénea debido a los diversos factores asociados a su desarrollo, especialmente los cambios y/o alteraciones genéticas. Explorar el estado mutacional en KRAS, NRAS y BRAF de los pacientes con CCR primario y metastásico demuestra ser importante debido a la influencia que ejercen sobre el pronóstico y la supervivencia general.

Palabras clave: Cáncer colorrectal, KRAS, NRAS, BRAF, EGFR.

¹Unidad de Investigación Genética Molecular (UNIGEM) y Grupo Biomoléculas. Antioquia, Colombia.

²Unidad de Investigación Genética Molecular (UNIGEM) y Grupo Biomoléculas. Antioquia, Colombia.

Autora para correspondencia: Erika Pino. Correo electrónico: erika.pino@udea.edu.co

Introducción

El cáncer colorrectal (CCR) es el tercer cáncer más común en todo el mundo (1) y su prevalencia ha aumentado debido a factores de riesgo externos como la dieta, la obesidad y el sedentarismo (2). También se consideran factores de riesgo los antecedentes familiares y personales de cáncer (entre ellos colon, recto, ovario y endometrio), enfermedades intestinales inflamatorias crónicas (enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa), antecedentes de pólipos en el colon (adenomas con histología tubular con más de 10 mm de tamaño, adenomas de histología vellosa independiente del tamaño y pólipos con displasia de alto grado), y las mutaciones en el gen supresor de tumor *APC*, responsable del 85% de los CCR esporádicos y de la poliposis adenomatosa familiar (3-5).

Para el año 2020, la tasa de incidencia a nivel mundial osciló en 1,9 millones de casos (incluyendo ambos sexos y todas las edades), lo que equivale al 10% de todos los tipos de cáncer (6). La enfermedad es más común en hombres que en mujeres y representó la segunda causa de muerte neoplásica después del cáncer de pulmón ese mismo año (6-7). Debido al aumento en las tasas de incidencia y mortalidad, el CCR es un importante problema de salud mundial, con una tasa de supervivencia general estimada a cinco años de aproximadamente el 59% (8). Es considerado una entidad esporádica y compleja, comprende un conjunto de enfermedades neoplásicas, asociada a inestabilidad cromosómica, microsatelital y mutaciones en los genes que integran las vías RAS-RAF, quienes desempeñan un papel importante en el desarrollo y la progresión del CCR (2, 5).

La familia de protooncogenes RAS están involucrados en la regulación del crecimiento, la proliferación, la migración y la diferenciación celular (3, 5). Comprende tres isoformas (*HRAS*, *KRAS* y *NRAS*). Las mutaciones en los genes *KRAS* y *NRAS* son en su mayoría cambios en un nucleótido que implican la producción de un aminoácido diferente y una proteína alterada, la cual pierde su función de GTPasa; esto conlleva a una activación constitutiva de la vía MAPK, independiente de la estimulación de ligandos del factor del crecimiento epidérmico a su receptor o EGFR (del inglés: Epidermal Growth Factor Receptor), acelerando la progresión del

proceso de oncogénesis (3,9). La familia RAF se compone de tres isoformas quinasas, *ARAF*, *CRAF* (RAF-1), y *BRAF*, mutaciones en estos genes desencadenan una activación de las proteínas MEK/ERK favoreciendo la proliferación y supervivencia celular (resistencia a señales proapoptóticas) (5,10). En promedio, las mutaciones del gen *KRAS* (exones 2, 3 y 4) ocurren entre el 30-50%, en el gen *NRAS* (exones 2, 3 y 4) entre el 3-5% y en el gen *BRAF* (exón 15) entre el 8-15% (11-12). El hallazgo de estas mutaciones representa que el paciente podría no beneficiarse de la terapia dirigida con tratamiento anti-EGFR; sin embargo, el paciente podría recibir terapias diferentes a las utilizadas contra EGFR (13).

En Colombia, el Observatorio Global del Cáncer (GLOBOCAN), para el año 2020, reportó 10.783 casos nuevos para CCR, siendo la tercera causa de cáncer en nuestro país, lo que equivale al 9.5% de los casos incidentes de cáncer. Durante el mismo periodo 4.048 (7.4%) y 1.265 (2,3%) pacientes murieron por cáncer de colon y recto respectivamente (6). La información publicada acerca del comportamiento clínico y epidemiológico del CCR en nuestro medio es escasa, a pesar de ser uno de los tipos de cáncer más frecuente. Bohórquez et al. encontraron que el 53% y 42% de los casos de pacientes con CCR se presentaba en mujeres y se localizaba en el recto respectivamente (14). Para el 2019, se publicó un estudio realizado en Bucaramanga donde reportaron una tasa cruda de CCR en mujeres (16.2 casos/100,000 habitantes) y en hombres (13.7 casos/100,000 habitantes), con un 25% de los casos en el recto (15). A nivel genético, el panorama de CCR es similar; Torres et al. reportaron que el 36,4% de los casos tenían mutaciones en el gen *KRAS* codones 12 y 13 y está aumentando al 43.4% cuando el análisis incluía los codones 12,13, 59, 61, 117 y 146 para los genes *KRAS* y *NRAS* (16). No se encontraron artículos publicados acerca del comportamiento de las mutaciones del gen *BRAF* en CCR en nuestro medio. La falta de información acerca de la distribución de estos marcadores genéticos desfavorece la identificación de grupos de riesgo y tratamiento oportuno, afectando directamente el pronóstico del paciente. De acuerdo con lo anterior, nos planteamos como objetivo determinar la frecuencia de las mutaciones en los genes *KRAS*, *NRAS* y *BRAF* en biopsias de pacientes con cáncer

colorrectal primario y metastásico, que llegan a un laboratorio de tercer nivel en la Ciudad de Medellín durante el periodo Junio 2017 - Abril 2021.

Metodología

Se revisaron los resultados de los análisis realizados para los genes *KRAS*, *NRAS* y *BRAF* en biopsias embebidas en parafina de pacientes con CCR primario y metastásico, recibidos desde junio de 2017 hasta abril de 2021, procesados en el laboratorio Unidad de Investigación Genética Molecular (UNIGEM) en la ciudad de Medellín. La determinación de las mutaciones en los genes fue evaluada mediante PCR en tiempo real utilizando la plataforma Idylla™ de Biocartis. La interpretación de los resultados (análisis de las mutaciones) se realizó automáticamente a partir del software del mismo.

Características clínicas: El sexo, la edad, el sitio de tumor primario y metastásico, tipo y grado histológico, estadio TNM al momento del diagnóstico, invasión perineural y linfovascular e inestabilidad microsatelital, fueron recopilados a través de los reportes de anatomía patológica y resultados de inmunohistoquímica para los casos en los cuales se requirió identificar la localización del tumor primario. El sitio primario del tumor se categorizó en 4 niveles: **Colon izquierdo** (ángulo esplénico, colon descendente y colon sigmoide), **Colon derecho** (ciego, colon ascendente, ángulo hepático y colon transversal), **Colon nos** para aquellos casos sin localización específica (del inglés: not specified otherwise) y **Recto**.

Selección, preparación y procesamiento de las muestras: Las muestras que llegaron al laboratorio para el análisis mutacional eran remitidas de un programa de apoyo diagnóstico de cáncer colorrectal. El laboratorio recibió el bloque parafinado a procesar junto con el informe de anatomía patológica. Para la selección de la muestra se tuvieron en cuenta los datos consignados en el reporte de anatomía patológica correspondientes a la coloración de hematoxilina y eosina. Si una muestra contenía el 10% de células neoplásicas o más, no se realizaba una macrodissección, mientras que si contenía menos

del 10% de células neoplásicas se tenía que realizar una macrodissección para poder llegar a un contenido de al menos el 10% de células neoplásicas. El área de tejido de la muestra de parafina debía tener como mínimo 50 mm² cuando se usaban secciones de tejido de 5 µm, o 25 mm² cuando se usaban secciones de tejido de 10 µm. Se podían usar varias secciones de tejido para cumplir con este requisito. El área de tejido de la muestra debía tener como máximo 600 mm² cuando se usaban secciones de tejido de 5 µm, y 300 mm² cuando se usaban secciones de tejido de 10 µm. **Preparación:** Se utilizaron pinzas para humedecer los filtros de papel y luego se colocaron en un portaobjetos de vidrio. Con las pinzas se colocó uno o más cortes de tejido parafinado en uno de los filtros de papel humedecidos y luego se cubrió con el segundo filtro de papel. Para el montaje de la prueba se colocó la muestra dentro del cartucho siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Análisis mutacional: Los cartuchos utilizados para la detección de mutaciones en los genes *KRAS*, *NRAS* y *BRAF* son para diagnóstico in vitro y fueron validados internamente en el laboratorio para su uso, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se emplearon dos tipos de cartuchos (Idylla™ *KRAS* Mutation Test e Idylla™ *NRAS-BRAF* Mutation Test), ambos kits constan de 5 reacciones multiplexadas. Estos cartuchos contienen los reactivos necesarios para realizar la preparación de la muestra, la amplificación y detección por PCR en tiempo real a partir de la inserción del tejido embebido en parafina fijado con formalina en el cartucho. Los pasos del proceso en la prueba son la licuefacción del tejido y la lisis celular, seguida de PCR en tiempo real usando cebadores específicos de alelos.

El Idylla™ *KRAS* Mutation Test detecta 21 mutaciones relevantes en *KRAS*: 7 mutaciones en codones 12 y 13 (exón 2), 9 mutaciones en codones 59 y 61 (exón 3) y 5 mutaciones en codones 117 y 146 (exón 4). El límite de detección es ≤ 5% para todas las mutaciones de *KRAS*, excepto para G13D y A146P/T/V que es alrededor del 10%. Cuando las biopsias fueron negativas para *KRAS*, se procedió a utilizar el segundo kit, Idylla™ *NRAS-BRAF* Mutation Test; en este se analizaron 18 mutaciones

relevantes en *NRAS*: 8 mutaciones en codones 12 y 13 (exón 2), 6 mutaciones en codones 59 y 61 (exón 3) y 4 mutaciones en codones 117 y 146 (exón 4) y 5 mutaciones en *BRAF* codón 600 (exón 15). El límite de detección es $\leq 5\%$ para las mutaciones más prevalentes en *NRAS* y *BRAF*.

Control de calidad de la prueba: Cada kit contenía un fragmento conservado para cada uno de los genes analizados, que actúa como control de procesamiento en cada una de las 5 reacciones multiplexadas; esto permitió comprobar la correcta ejecución del proceso, que incluye desde la inserción de la muestra hasta la obtención del resultado (la validación del test, se caracteriza por una curva de amplificación en los 5 canales de lectura). Estas reacciones de control son una medida de la cantidad de ADN amplificable en la muestra y se utilizan en el análisis del estado mutacional de la misma.

La presencia de un genotipo mutante se determina calculando la diferencia (valor ΔCq) entre el ciclo de cuantificación (Cq) del control de procesamiento y el Cq obtenido para las señales mutantes. Se consideró que una muestra era positiva cuando el valor ΔCq se encontraba dentro del intervalo predefinido por el software específico para cada test. Las muestras con una señal de control válida, pero con un valor fuera del intervalo predefinido para todas las señales mutantes, se consideraron como mutaciones negativas. En caso de múltiples mutaciones, solo se informó la mutación detectada de forma dominante (valor ΔCq más bajo). Los posibles resultados para las muestras fueron: mutado, no mutado y no concluyente (no válido), para este último las muestras fueron procesadas por duplicado, obteniéndose en ambas corridas el mismo resultado.

Análisis estadístico: Para el análisis univariado, las características sociodemográficas, clínico-histopatológicas y genéticas de los pacientes se resumieron con estadísticas descriptivas. Se utilizó la prueba de Chi-cuadrado para el análisis bivariado, utilizando el programa estadístico IBM SPSS versión 21.0 y el valor de p se consideró significativo si era < 0.05 .

Consideraciones éticas: Según las categorías dictadas en la Resolución 8430 de 1993, establecidas por el Ministerio de Salud y Protección Social, los riesgos para la realización de la investigación fueron mínimos. Las pruebas genéticas fueron realizadas en UNIGEM, posteriormente al diligenciamiento y firma del consentimiento informado por los pacientes en las diferentes instituciones remitentes. Al firmar el consentimiento informado, los pacientes aceptaron que los datos obtenidos de la prueba genética fueran presentados en congresos nacionales e internacionales, publicaciones médicas u otros escenarios. Este estudio está exento de aprobación por un comité de ética local. Durante el desarrollo del trabajo se protegieron los derechos, integridad y confidencialidad de los sujetos del estudio.

Resultados

Se incluyeron en el estudio 816 biopsias embebidas en parafina para evaluación molecular de los genes *KRAS*, *NRAS* y *BRAF* durante el periodo Junio 2017 y Abril 2021. Para el total de la población, la media de edad al momento del diagnóstico fue de 60 años (DE 12,8), con un rango de 15 a 90 años, en donde el 54,2% (442/816) de los casos se encontraron en pacientes >60 años y el 50,9% (415/816) en mujeres. El 81,9% (668/816) correspondió a pacientes con CCR primario y el 18,1% (148/816) a CCR metastásico.

El análisis de las variables sociodemográficas, clínico-histopatológicas y genéticas, se realizó diferenciando los casos de CCR primario y metastásico. Para el primer grupo, el 50,3%, 54,0%, 72,5% y 74,3% de los casos pertenecían al sexo femenino, grupo >60 años, régimen de salud contributivo y departamento de Antioquia respectivamente. De acuerdo a la categorización del origen primario del tumor, el mayor número de casos se presentó en el recto, con 231 (34,6%) (Tabla 1). Observamos que los casos en recto y colon derecho eran más frecuentes en hombres y mujeres respectivamente (valores $p < 0,05$), mientras que para la edad, los casos en >60 años predominaban en el colon derecho ($p < 0,05$).

Tabla 1. Distribución del sitio primario del tumor según características sociodemográficas de los pacientes (n=668)

Características	n (%)	Colon derecho n (%) 210 (31,4)	Colon izquierdo n (%) 195 (29,2)	Colon NOS n (%) 32 (4,8)	Recto n (%) 231 (34,6)
Sexo					
Hombre	332 (49,7)	88 (41,9)	88 (45,1)	14 (43,8)	142 (61,5)
Mujer	336 (50,3)	122 (58,1)	107 (54,9)	18 (56,2)	89 (38,5)
Edad					
≤60	307 (46,0)	80 (38,1)	92 (47,2)	22 (68,7)	113 (48,9)
>60	361 (54,0)	130 (61,9)	103 (52,8)	10 (31,3)	118 (51,1)
Régimen de seguridad social					
Contributivo	484 (72,5)	168 (80,0)	139 (71,3)	21 (65,6)	156 (67,5)
Subsidiado	155 (23,2)	35 (16,7)	49 (25,1)	10 (31,3)	61 (26,4)
Especial	9 (1,3)	1 (0,5)	3 (1,5)	0 (0,0)	5 (2,2)
Sin Dato	20 (3,0)	6 (2,8)	4 (2,1)	1 (3,1)	9 (3,9)
Departamento de procedencia					
Antioquia	496 (74,3)	156 (74,2)	141 (72,3)	25 (78,1)	174 (75,3)
Santander	79 (11,8)	23 (10,9)	26 (13,3)	2 (6,2)	28 (12,1)
Valle del Cauca	27 (4,0)	10 (4,8)	10 (5,1)	0 (0,0)	7 (3,0)
Atlántico	23 (3,4)	10 (4,8)	7 (3,6)	2 (6,2)	4 (1,7)
Bolívar	9 (1,3)	1 (0,5)	3 (1,5)	0 (0,0)	5 (2,2)
Otros*	34 (5,1)	10 (4,8)	8 (4,1)	3 (9,4)	13 (5,6)

*Departamento con número de casos menor a 10: Chocó 7, Nariño 5, Córdoba 4, Risaralda 4, Sucre 4, Cesar 2, Magdalena 2, Norte de Santander 2, Quindío 2, La Guajira 1, Putumayo 1.

Para las características clínico-histopatológicas y genéticas en el CCR primario, el 86,4%, 48,8% y el 48,5% de los casos presentaban un adenocarcinoma clásico, grado de diferenciación moderado y mutaciones en KRAS respectivamente. El 60.3% de los casos no tenían ninguna descripción para la variable estadio patológico (T y N); sin embargo, para los casos que pudieron clasificarse, el 37,1% se encontraban en el estadio T3-T4 y el 27,7% cursaron con invasión a ganglios linfáticos regionales (Tabla

2). Para el estado mutacional, observamos que el mayor número de asociaciones se presentaron en BRAF con las variables: sexo, rango de edad, tumores pobremente diferenciados, casos ubicados en recto y colon derecho (valores $p < 0,05$), mientras que KRAS se asoció con tumores bien diferenciados ($p < 0,05$) y el genotipo no mutado con los casos en colon izquierdo (valores $p < 0,05$). No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas para las mutaciones en NRAS y las variables de estudio).

Tabla 2. Distribución del sitio primario del tumor según características clínico-patológicas y genéticas de los pacientes (n=668)

Características	n (%)	Colon derecho n (%) 210 (31,4)	Colon Izquierdo n (%) 195 (29,2)	Colon NOS n (%) 32 (4,8)	Recto n (%) 231 (34,6)
Tipo histológico					
Adenocarcinoma clásico	577 (86,4)	167 (79,5)	174 (89,2)	27 (84,4)	209 (90,5)
Adenocarcinoma mucinoso	68 (10,2)	33 (15,7)	16 (8,2)	4 (12,5)	15 (6,5)
Carcinoma de células en anillo de sello	12 (1,8)	5 (2,4)	3 (1,5)	1 (3,1)	3 (1,3)
Otros	11 (1,6)	5 (2,4)	2 (1,0)	0 (0,0)	4 (1,7)
Grado histológico					
Bien diferenciado	228 (34,1)	73 (34,8)	63 (32,3)	13 (40,6)	79 (34,2)
Moderadamente diferenciado	326 (48,8)	92 (43,8)	109 (55,9)	12 (37,5)	113 (48,9)
Pobremente diferenciado	49 (7,3)	26 (12,4)	10 (5,1)	4 (12,5)	9 (3,9)
Sin dato	65 (9,7)	19 (9,0)	13 (6,7)	3 (9,4)	30 (13,0)
Estadio patológico (T)					
T1-T2	17 (2,5)	4 (1,9)	4 (2,1)	0 (0,0)	9 (3,9)
T3-T4	248 (37,1)	89 (42,4)	87 (44,6)	8 (25,0)	64 (27,7)
Sin dato	403 (60,3)	117 (55,7)	104 (53,3)	24 (75,0)	158 (68,4)
Estado mutacional					
KRAS Mutado	324 (48,5)	113 (53,8)	84 (43,1)	18 (56,3)	109 (47,2)
NRAS Mutado	20 (3,0)	7 (3,3)	4 (2,1)	0 (0,0)	9 (3,9)
BRAF Mutado	36 (5,4)	23 (11,0)	9 (4,6)	1 (3,1)	3 (1,3)
NRAS-BRAF Mutado	1 (0,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,4)
No Mutado	252 (37,7)	58 (27,6)	92 (47,1)	12 (37,5)	90 (39,0)
No concluyente	35 (5,2)	9 (4,3)	6 (3,1)	1 (3,1)	19 (8,2)

En el CCR metastásico, el análisis de las variables se realizó de acuerdo al estado mutacional. Los sitios metastásicos con presentación de un solo caso se agruparon en la categoría “Otros” (Epidídimo, Ganglio inguinal, Ganglio del meso, Ganglio linfático, Hipocondrio, Húmero, Ligamento redondo, Masa en fosa ilíaca, Masa pélvica, Masa umbilical, Tejidos blandos, Tórax, Útero, Vesícula biliar y

Vulva). El 53,4%, 82,4%, 40,5% y 46,6% de los casos correspondían al sexo femenino, adenocarcinoma clásico, metástasis al hígado y mutaciones en KRAS respectivamente (Tabla 3). Encontramos que la frecuencia de la mutación en KRAS eran estadísticamente significativa entre los casos que metastatizan al hígado de aquellos que no (valor $p < 0,05$).

Tabla 3. Distribución del estado mutacional en pacientes con CCR metastásico según características sociodemográficas, clínico-histopatológicas (n=148)

Características	n (%)	KRAS n (%) 69 (46,6)	NRAS n (%) 6 (4,1)	BRAF n (%) 7 (4,7)	No mutado n (%) 55 (37,2)	No Concluyente n (%) 11 (7,4)
Sexo						
Hombre	69 (46,6)	31 (44,9)	5 (83,3)	4 (57,1)	25 (45,5)	4 (36,4)
Mujer	79 (53,4)	38 (55,1)	1 (16,7)	3 (42,9)	30 (54,5)	7 (63,6)
Edad						
≤60	67 (45,3)	29 (42,0)	2 (33,3)	3 (42,9)	27 (49,1)	6 (54,5)
>60	81 (54,7)	40 (58,0)	4 (66,7)	4 (57,1)	28 (50,9)	5 (45,5)
Tipo histológico						
Adenocarcinoma clásico	122 (82,4)	62 (89,9)	5 (83,3)	4 (57,1)	45 (81,8)	6 (54,5)
Adenocarcinoma mucinoso	15 (10,1)	4 (5,8)	1 (16,7)	1 (14,3)	5 (9,1)	4 (36,4)
Carcinoma de células en anillo de sello	4 (2,7)	2 (2,9)	0 (0,0)	1 (14,3)	0 (0,0)	1 (9,1)
Otros	7 (4,7)	1 (1,4)	0 (0,0)	1 (14,3)	5 (9,1)	0 (0,0)
Grado histológico						
Bien diferenciado	16 (10,8)	9 (13,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	7 (12,7)	0 (0,0)
Moderadamente diferenciado	26 (17,6)	11 (15,9)	2 (33,3)	0 (0,0)	12 (21,8)	1 (9,1)
Pobrememente diferenciado	7 (4,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (42,9)	4 (7,3)	0 (0,0)
Sin Dato	99 (66,9)	49 (71,0)	4 (66,7)	4 (57,1)	32 (58,2)	10 (90,9)

Características	n (%)	KRAS n (%) 69 (46,6)	NRAS n (%) 6 (4,1)	BRAF n (%) 7 (4,7)	No mutado n (%) 55 (37,2)	No Concluyente n (%) 11 (7,4)
Estadio patológico (T)						
T1-T2	2 (1,4)	0 (0,0)	1 (16,7)	0 (0,0)	1 (1,8)	0 (0,0)
T3-T4	29 (19,5)	13 (18,8)	1 (16,7)	2 (28,6)	11 (20,0)	2 (18,2)
Sin dato	117 (79,1)	56 (81,2)	4 (66,6)	5 (71,4)	43 (78,2)	9 (81,8)
Estadio patológico (N)						
No evaluable	7 (4,7)	2 (2,9)	2 (33,3)	1 (14,3)	2 (3,6)	0 (0,0)
Ausente	6 (4,1)	4 (5,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (3,6)	0 (0,0)
Presente	18 (12,1)	7 (10,1)	0 (0,0)	1 (14,3)	8 (14,5)	2 (18,2)
Sin dato	117 (79,1)	56 (81,2)	4 (66,7)	5 (71,4)	43 (78,2)	9 (81,8)
Tumor metastásico						
Piel Borde de Colostomía	2 (1,4)	1 (1,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (9,1)
Cerebro	3 (2,0)	2 (2,9)	0 (0,0)	1 (14,3)	0 (0,0)	0 (0,0)
Epiplón	6 (4,1)	4 (5,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,8)	1 (9,1)
Hígado	60 (40,5)	22 (31,9)	3 (50,0)	2 (28,5)	30 (54,5)	3 (27,3)
Mesenterio	2 (1,4)	2 (2,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Ovario	6 (4,1)	1 (1,4)	0 (0,0)	1 (14,3)	3 (5,5)	1 (9,1)
Pared abdominal	3 (2,0)	1 (1,4)	0 (0,0)	1 (14,3)	1 (1,8)	0 (0,0)
Peritoneo	13 (8,8)	5 (7,2)	0 (0,0)	1 (14,3)	5 (9,1)	2 (18,2)
Pulmón	32 (21,6)	19 (27,5)	2 (33,3)	0 (0,0)	10 (18,2)	1 (9,1)
Retroperitoneo	4 (2,7)	2 (2,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (3,6)	0 (0,0)
Vejiga	2 (1,4)	1 (1,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,8)	0 (0,0)
Otros	15 (10,0)	9 (13,0)	1 (16,7)	1 (14,3)	2 (3,6)	2 (18,2)

La distribución de acuerdo con el estado mutacional en las 816 biopsias fue: mutados 463 casos (56,7%), tipo salvaje o no mutados 307 casos (37,6%) y no concluyente en 46 casos (5,7%). De los casos

mutados, 393 (84,9%), 43 (9,3%), 26 (5,6%) y 1 (0,2%) se presentaron en *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, y *NRAS/BRAF* respectivamente. En la tabla 4 se detalla la frecuencia de las mutaciones a nivel nucleotídico y proteico para el CCR primario y metastásico

Gen	Exón	Mutación	Proteína	Cambio Nucleotídico	n (%)
KRAS 12	2	G12D	p.Gly12Asp	c.35G>A	127 (27,4)
		G12V	p.Gly12Val	c.35G>T	79 (17,1)
		G12C	p.Gly12Cys	c.34G>T	32 (6,9)
		G12S	p.Gly12Ser	c.34G>A	27 (5,8)
		G12A	p.Gly12Ala	c.35G>C	8 (1,7)
		G12R	p.Gly12Arg	c.34G>C	6 (1,3)
KRAS 13		G13D	p.Gly13Asp	c.38G>A	73 (15,8)
KRAS 59		A59T/E/G	p.Ala59Thr / p.Ala59Glu / p.Ala59Gly	c.175G>A / c.176C>A / c.176C>G	2 (0,4)
KRAS 61	3	Q61H	p.Gln61His	c.183A>C ; c.183A>T	9 (1,9)
		Q61K	p.Gln61Lys	c.181C>A ; c.180_181delinsAA	3 (0,6)
		Q61R/L	p.Gln61Arg / p.Gln61Leu	c.182A>G / c.182A>T	2 (0,4)
KRAS 117		K117N	p.Lys117Asn	c.351A>C ; c.351A>T	2 (0,4)
KRAS 146	4	A146P/T/V	p.Ala146Pro / p.Ala146Thr / P.Ala146Val	c.436G>C / c.436G>A / c.437C>T	23 (5,0)
NRAS 12	2	G12D	p.Gly12Asp	c.35G>A	8 (1,7)
		G12A/V	p.Gly12Ala/ p.Gly12Val	c.35G>C / c.35G>T	2 (0,4)
NRAS 13	2	G12S	p.Gly12Ser	c.34G>A	1 (0,2)
		G13R/V	p.Gly13Arg / p.Gly13Val	c.37G>C / c.38G>T	2 (0,4)
NRAS 61	3	G13D	p.Gly13Asp	c.38G>A	1 (0,2)
		Q61K	p.Gln61Lys	c.181C>A	11 (2,4)
BRAF V600	15	Q61R	p.Gln61Arg	c.182A>G	1 (0,2)
		V600E/D	p.Val600Glu / p.Val600Asp	c.1799T>A ; c.1799_1800delinsAA / c.1799_1800delinsAC	43 (9,3)
NRAS61/ BRAF V600	3 15	Q61K V600K/R	p.Gln61Lys p.Val600Lys / p.Val600Arg	c.181C>A c.1798_1799delinsAA / c.1798_1799delinsAG	1 (0,2)

Para algunas variables, la información estuvo disponible en menos de la mitad de los casos estudiados, entre ellas: invasión linfovascular (429 casos), invasión perineural (374 casos) e inestabilidad microsatelital (156 casos). El 54,1% y el 66,8% de los casos no presentaron invasión linfovascular ni perineural, mientras que una baja probabilidad de inestabilidad microsatelital estuvo presente en el 93,6% de los casos. Por último se realizó una consulta en la Base de Datos Única de Afiliados del Sistema

General de Seguridad Social en Salud, para observar el estado actual de los pacientes; se encontró que más de la mitad de los pacientes (54,2%) ya habían fallecido, el 40,1% estaban vivos y del 5,8% no registraba ningún tipo de información.

Discusión

En Colombia, el CCR ocupa el tercer lugar entre el total de cánceres; sin embargo, la información

publicada acerca de las características genéticas es escasa. Este estudio refleja un acercamiento al comportamiento mutacional de *KRAS*, *NRAS* y *BRAF* en nuestro medio. En general, se observó un ligero predominio de los casos en las mujeres, resultados similares fueron reportados en estudios locales anteriormente (14-15, 17-18) mientras que en otras regiones de América (2,13,19), Europa (7-8) y Asia (20-22) reportan un mayor número de casos en hombres. La mediana de edad al momento del diagnóstico fue 60 años, incluida dentro del rango de reporte a nivel nacional y mundial (17-18). El 86,4% de los casos de CCR primario presentaba un adenocarcinoma clásico, similar a lo reportado en estudios locales (15,23) y a nivel mundial (8,24-25). Por el contrario, observamos diferencias relacionadas al grado histológico, mientras que en nuestro estudio hubo un predominio del grado moderado con un 48,8%; estudios locales anteriores datan porcentajes entre 50-53% para el grado bien diferenciado (17, 23).

Para los 668 casos que conformaban el CCR primario, observamos un orden descendente para los casos presentados en recto, colon derecho, colon izquierdo y colon nos respectivamente. Bohórquez et al., en un estudio multicéntrico publicado en el 2016 acerca de las manifestaciones clínicas en pacientes con CCR, obtuvieron el mismo orden de distribución de los casos de CCR primario (14). La clasificación del sitio primario del tumor es muy importante, debido a las diferencias sociodemográficas, clínicas, patológicas, pronósticas y de respuesta a la quimioterapia que existe entre los casos de colon derecho, colon izquierdo y recto. Algunos autores manifiestan que los cánceres de recto a menudo metastatizan primero al pulmón, mientras que los cánceres de colon hacen metástasis primero al hígado (26). En nuestro caso, los sitios metastásicos más comunes fueron hígado (40,4%), pulmón (21,6%) y peritoneo (8.8%) (27-28); no se pudo explorar la asociación de la localización de la metastasis vs el sitio primario del tumor debido a la falta de información. También se identificaron tres casos de metástasis en cerebro, dos con mutación en *KRAS* y uno en *BRAF*. He et al. (28), reportan un caso de metástasis a cerebro; estos resultados ponen en manifiesto el alto nivel de expansión que tiene esta entidad, afectando directamente la supervivencia y pronóstico de los pacientes.

La literatura revela que las mutaciones en RAS (*KRAS/NRAS*) y *BRAF* (codón 600) son mutuamente excluyente en el CCR; esto quiere decir que cuando se adquiere la segunda mutación, esto no proporcionará ninguna ventaja selectiva adicional para una célula cuando la primera ya esté presente (27, 29). Nuestros resultados concuerdan parcialmente con la información descrita anteriormente, no se presentaron mutaciones intergénicas entre *KRAS-BRAF*, sin embargo reportamos un caso entre *NRAS-BRAF* (codones 61 y 600 respectivamente); estos datos podrían sugerir que las comutaciones entre *NRAS-BRAF* no serían mutuamente excluyente. Se ha informado que la frecuencia de mutación en *KRAS* (57,3% frente al 40,4%) (30) y *BRAF* (18,4-22,4% frente a 1,3-7,8%) (31) es mayor en el colon derecho que en el colon izquierdo; en nuestro caso esta asociación solo se encontró para el genotipo *BRAF*.

En general, las mutaciones en *KRAS* ocupan el primer lugar en términos de frecuencia y prevalencia; esta evidencia fue concordante con nuestros resultados tanto para los sitios primarios y metastásicos (28, 32); sin embargo, la ubicación en términos de frecuencia para los otros genes dependerá del tipo de población. En nuestro estudio, la mutación en *BRAF* ocupó el segundo lugar, igual a lo reportado en otros países como China (33), Estados Unidos (34) y Alemania (35). Para la distribución de los diferentes tipos de mutaciones en *KRAS*, nuestros resultados se asemejan a lo reportado en la literatura. La mayoría de las mutaciones del gen *KRAS* se produjeron en los codones 12 y 13 (G12D 27,4%, G12V 17,1% y G13D 15,8%) (13, 36-37), siendo las menos frecuentes las presentes en los codones 59 y 117 (2). Las mutaciones en orden de frecuencia de mayor a menor en *NRAS* fue codón 61 (2.6%), 12 (2.3%) y 13 (0.6%) (2, 28); no se presentaron mutaciones en los otros codones estudiados (59,117 y 146). Finalmente, la mutación V600E/D en el gen *BRAF* fue reportada con un 9.3%, un valor alto en comparación con otros estudios (21, 38).

Para algunas variables, la información estuvo disponible en menos del 50% de los casos: En la inestabilidad microsatelital solo 156 pacientes tenían este reporte, de los cuales 10 reportaron una alta probabilidad de inestabilidad microsatelital (8 en *MLH1* y *PMS2* y 2 en *MSH2* y *MSH6*). La inestabilidad microsatelital o vía mutadora corresponde a una vía molecular patogénica presente en alrededor del 15%

de los casos de cáncer colorrectal y representa la disfuncionalidad del sistema reparación de desajustes o MMR (del inglés: Mismatch Repair). Constituye un tamizaje molecular de pacientes con sospecha de Síndrome de Lynch (cáncer colorrectal hereditario no polipósico), además de poseer un valor predictivo de resistencia a tratamiento con 5-fluorouracilo (5, 39). Al analizar la profundidad de la invasión de los tumores en la población en general, se observó que esta variaba de T1 a T4, siendo la más frecuente T3 con el 59,8% de los casos (177/296). Respecto al compromiso linfonodal, estaba presente en el 68.6% de los casos (203/296). A pesar del número reducido de datos para estas variables, nuestros resultados se encuentran dentro del rango de reporte de estudios anteriores (19, 24, 26).

Un resultado no concluyente fue revelado en 46 casos (5.7%). Este resultado no permite concluir si el paciente puede o no ser candidato a la terapia anti-EGFR. Para estos casos, es necesario analizar posibles interferencias de la fase preanalítica, como: presencia de inhibidores en la muestra, inclusión del tejido en parafina y aquellas relacionadas con el tipo de fijador o el tiempo de fijación (las muestras deben ser fijadas tan pronto como sea posible luego de la extirpación quirúrgica con máximo 24 horas, para reducir el riesgo de desaminación y fragmentación extrema del ADN). El número de casos para el genotipo no mutado fueron 307 (37,6%), este resultado significa que los pacientes podrían beneficiarse de la terapia anti-EGFR. Sin embargo, se ha reportado falla en la terapia en estos pacientes; investigaciones futuras podrían encaminarse al estudio de la frecuencia de genes no relacionados a la vía RAS/RAF, quienes participan en la progresión tardía del tumor, la supervivencia y metástasis de las células tumorales, como *PIK3CA*, *TP53*, *PTEN*, presente en el 20%, 75% y 60% de los casos de CCR respectivamente (9, 11).

Conclusión

El cáncer colorrectal es una enfermedad heterogénea debido a diversos factores asociados a su desarrollo, especialmente los cambios y/o alteraciones genéticos. Explorar el estado mutacional en *KRAS*, *NRAS* y *BRAF* de los pacientes con CCR primario y metastásico demuestra ser importante debido a la influencia que ejercen sobre el pronóstico y la supervivencia

general. El presente estudio aporta información acerca de la distribución de las mutaciones en nuestro medio y con esto la posibilidad de desarrollar nuevos estudios donde se puedan establecer asociaciones clínicas y pronósticas a futuro. También consideramos importante establecer guías de diagnóstico de CCR precisas, donde se tenga en cuenta de manera prioritaria la fase preanalítica del estudio de esta entidad, para minimizar las posibilidades de obtener resultados no concluyentes o no válidos que afecta la elección terapéutica más adecuada para el paciente.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales.

Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales. Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado.

Los autores han obtenido el consentimiento informado de las pacientes referidas en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

Fuente de financiación

Ninguna.

Conflicto de intereses

Ninguno que declarar.

Bibliografía

1. Ye ZL, Qiu MZ, Tang T, Wang F, Zhou YX, Lei MJ, et al. Gene mutation profiling in Chinese colorectal cancer patients and its association with clinicopathological characteristics and prognosis. *Cancer Med.* 2020;9(2):745-56. <https://doi.org/10.1002/cam4.2727>.
2. Sanchez-Ibarra HE, Jiang X, Gallegos-Gonzalez EY, Cavazos-González AC, Chen Y, Morcos F, et al. KRAS, NRAS, and BRAF mutation prevalence, clinicopathological association, and their application in a predictive model in Mexican patients with metastatic colorectal cancer: A retrospective cohort study. *PLoS One.* 2020;15(7):1-16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235490>.

3. Sagaert X, Vanstapel A, Verbeek S. Tumor Heterogeneity in Colorectal Cancer: What Do We Know So Far? *Pathobiology*. 2018;85(1-2):72-84. [https://doi.org/ 10.1159/000486721](https://doi.org/10.1159/000486721).
4. Prieto RG, Carvajal FO, David MG, Rocha JN, Aponte DM. Características endoscópicas e histopatológicas de los pólipos colorrectales resecaados endoscópicamente en una institución universitaria de Bogotá D. C. *Rev Colomb Gastroenterol*. 2019;(170):31-7. <https://doi.org/10.22516/25007440.267>
5. Juárez-Vázquez CI, Rosales-Reynoso MA. Cáncer colorrectal (CCR): Alteraciones genéticas y moleculares. *Gac Med Mex*. 2014;150(2):154-64.
6. The Global Cancer Observatory. GLOBOCAN 2020: International Agency Research on Cancer. 2020;509:1-2.
7. Palomba G, Doneddu V, Cossu A, Paliogiannis P, Manca A, Casula M, et al. Prognostic impact of KRAS, NRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal carcinomas: A population-based study. *J Transl Med*. 2016;14(1):1-11. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1053-z>.
8. Rimbort J, Tachon G, Junca A, Villalva C, Karayan-Tapon L, Tougeron D. Association between clinicopathological characteristics and RAS mutation in colorectal cancer. *Mod Pathol* [Internet]. 2018;31(3):517-26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2017.119>.
9. Vergara É, Alvis N, Suárez A. ¿Existen ventajas clínicas al evaluar el estado de los genes KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA, PTEN y HER2 en pacientes con cáncer colorrectal? *Rev Colomb Cirugía*. 2017;32(1):45-55. <https://doi.org/10.30944/20117582.7>
10. Piamo Morales AJ. Implicaciones diagnósticas, terapéuticas y pronósticas de la mutación BRAF V600E en melanomas cutáneos. *Rev Inf Científica*. 2019;98(3):413-24.
11. Bhullar DS, Barriuso J, Mullaitha S, Saunders MP, O'Dwyer ST, Aziz O. Biomarker concordance between primary colorectal cancer and its metastases. *EBioMedicine* [Internet]. 2019;40:363-74. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.01.050>
12. Levin-Sparenberg E, Bylsma LC, Lowe K, Sangare L, Fryzek JP, Alexander DD. A Systematic Literature Review and Meta-Analysis Describing the Prevalence of KRAS, NRAS, and BRAF Gene Mutations in Metastatic Colorectal Cancer. *Orig Artic Gastroenterol Res* [Internet]. 2020;13(5):184-98. Available from: <https://doi.org/10.14740/gr1167>
13. Hurtado C, Encina G, Wielandt AM, Zárate AJ, Castro M, Carrillo K, et al. KRAS gene somatic mutations in Chilean patients with colorectal cancer. *Rev Med Chil*. 2014;142(11):1407-14. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872014001100007>.
14. Bohorquez M, Sahasrabudhe R, Criollo A, Sanabria-Salas MC, Vélez A, Castro JM, et al. Clinical manifestations of colorectal cancer patients from a large multicenter study in Colombia. *Med (United States)*. 2016;95(40). <https://doi.org/>
15. Uribe-Pérez CJ, Blanco-Quintero JJ, Bello-Zapata LM. Incidencia de cáncer de colon y recto en Bucaramanga, Colombia 2008 - 2012. *MedUNAB*. 2019;22(1):16-23. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000004883>.
16. Torres Carvajal M, Barrera LE, Lopez R del P, Ospina N, Andrade RE, Vasquez L. Impacto del estudio mutacional ampliado del gen RAS en pacientes colombianos con cáncer colorrectal: Análisis de 1302 casos. *Patol Rev Latinoam*. 2015;53(4):152-4.
17. Campo-Sánchez SM, Camargo-Trillos J, Calle-Ramírez JA, Gómez-Wolff LR, Sánchez-Patiño LA, García-García HI. Colorectal cancer survival at an oncologic center in Colombia. A historic cohort study. *Rev Gastroenterol México (English Ed)*. 2019;84(2):174-84. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2018.04.002>.
18. Ferreira EJ, Meléndez HJ. Características clínicas, demográficas e histopatológicas de los pacientes con cáncer colorrectal del Hospital Universitario de Santander. *Rev Colomb Cirugía*. 2012;27(3):213-20.
19. Gonsalves WI, Mahoney MR, Sargent DJ, Nelson GD, Alberts SR, Sinicrope FA, et al. Patient and tumor characteristics and BRAF and KRAS mutations in colon cancer, NCCTG/Alliance N0147. *J Natl Cancer Inst*. 2014;106(7):1-8. <https://doi.org/10.1093/jnci/dju106>.
20. Guo TA, Wu YC, Tan C, Jin YT, Sheng WQ, Cai SJ, et al. Clinicopathologic features and prognostic value of KRAS, NRAS and BRAF mutations and DNA mismatch repair status: A single-center retrospective study of 1,834 Chinese patients with Stage I-IV colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2019;145(6):1625-34. <https://doi.org/10.1002/ijc.32489>.
21. Kawazoe A, Shitara K, Fukuoka S, Kuboki Y, Bando H, Okamoto W, et al. A retrospective observational study of clinicopathological features of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in Japanese patients with metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2015;15(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1276-z>.
22. Watanabe T, Yoshino T, Uetake H, Yamazaki K, Ishiguro M, Kurokawa T, et al. KRAS mutational status in Japanese patients with colorectal cancer: Results from a nationwide, multicenter, cross-sectional study. *Jpn J Clin Oncol*. 2013;43(7):706-12. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyt062>.
23. Barrero DC, Cortés E, Rodríguez C, Didí-Cruz M. Características epidemiológicas y clínicas del cáncer colorrectal en pacientes de la ciudad de Ibagué durante el período 2000-2006. *Rev Colomb Gastroenterol*. 2008;23(4):315-26. <https://doi.org/>
24. Koochak A, Rakhshani N, Karbalaie Niya MH, Tameshkel FS, Sohrabi MR, Babaee MR, et al. Mutation analysis of KRAS and BRAF genes in metastatic colorectal cancer: A first large scale

- study from Iran. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2016;17(2):603-8. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2016.17.2.603>.
25. Al-Shamsi HO, Jones J, Fahmawi Y, Dahbour I, Tabash A, Abdel-Wahab R, et al. Molecular spectrum of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA, TP53, and APC somatic gene mutations in Arab patients with colorectal cancer: Determination of frequency and distribution pattern. *J Gastrointest Oncol.* 2016;7(6):882-902. <https://doi.org/10.21037/jgo.2016.11.02>.
 26. Kornmann M, Staib L, Wiegel T, Kron M, Henne-Bruns D, Link KH, et al. Long-term results of 2 adjuvant trials reveal differences in chemosensitivity and the pattern of metastases between colon cancer and rectal cancer. *Clin Colorectal Cancer [Internet].* 2013;12(1):54-61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clcc.2012.07.005>
 27. Li ZZ, Wang F, Zhang ZC, Wang F, Zhao Q, Zhang DS, et al. Mutation profiling in Chinese patients with metastatic colorectal cancer and its correlation with clinicopathological features and anti-EGFR treatment response. *Oncotarget.* 2016;7(19):28356-68. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8541>.
 28. He K, Wang Y, Zhong Y, Pan X, Si L, Lu J. Kras codon 12 mutation is associated with more aggressive invasiveness in synchronous metastatic colorectal cancer (Mcr): Retrospective research. *Onco Targets Ther.* 2020;13:12601-13. <https://doi.org/10.2147/OTT.S279312>.
 29. Morkel M, Riemer P, Bläker H, Sers C. Similar but different: Distinct roles for KRAS and BRAF oncogenes in colorectal cancer development and therapy resistance. *Oncotarget.* 2015;6(25):20785-800. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4750>.
 30. Tong JHM, Lung RWM, Sin FMC, Law PPY, Kang W, Chan AWH, et al. Characterization of rare transforming KRAS mutations in sporadic colorectal cancer. *Cancer Biol Ther.* 2014;15(6):768-76. <https://doi.org/10.4161/cbt.28550>.
 31. Jiang Y, Yan X, Liu K, Shi Y, Wang C, Hu J, et al. Discovering the molecular differences between right- and left-sided colon cancer using machine learning methods. *BMC Cancer.* 2020;20(1):1-11. <https://doi.org/10.1186/s12885-020-07507-8>.
 32. Summers MG, Smith CG, Maughan TS, Kaplan R, Escott-Price V, Cheadle JP. BRAF and NRAS locus-specific variants have different outcomes on survival to colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2017;23(11):2742-9. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1541>.
 33. Guo F, Gong H, Zhao H, Chen J, Zhang Y, Zhang L, et al. Mutation status and prognostic values of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA in 353 Chinese colorectal cancer patients. *Sci Rep.* 2018;8(1):1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24306-1>.
 34. Modest DP, Ricard I, Heinemann V, Hegewisch-Becker S, Schmiegel W, Porschen R, et al. Outcome according to KRAS-, NRAS- and BRAF-mutation as well as KRAS mutation variants: Pooled analysis of five randomized trials in metastatic colorectal cancer by the AIO colorectal cancer study group. *Ann Oncol.* 2016;27(9):1746-53. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw261>.
 35. Russo AL, Borger DR, Szymonifka J, Ryan DP, Wo JY, Blaszkowsky LS, et al. Mutational analysis and clinical correlation of metastatic colorectal cancer. *Cancer.* 2014;120(10):1482-90. <https://doi.org/10.1002/cncr.28599>.
 36. Li W, Liu Y, Cai S, Yang C, Lin Z, Zhou L, et al. Not all mutations of KRAS predict poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol [Internet].* 2019;12(3):957-67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31933906%OA> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC6945179>
 37. Roa I, Sánchez T, Majlis A, Schalper K. Mutación del gen KRAS en el cáncer de colon y recto. *Rev Med Chile.* 2013;141:1166-72. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872013000900009>.
 38. Zhang J, Zheng J, Yang Y, Lu J, Gao J, Lu T, et al. Molecular spectrum of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in Chinese colorectal cancer patients: Analysis of 1,110 cases. *Sci Rep [Internet].* 2015;5(August):1-8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep1867839>.
 39. Ortiz C, Dongo-Pflucker K, Martín-Cruz L, Barletta Carrillo C, Mora-Alferez P, Arias A. Microsatellite instability in patients with diagnostic of colorectal cancer. *Rev Gastroenterol Peru.* 2016;36(1):15-22.