

Cáncer de colon en Colombia, fenotipo molecular: tamizaje para síndromes con agregación familiar.

Colorectal cancer in Colombia molecular phenotype:
screening for syndromes with familial aggregation.

Mabel Elena Bohórquez L.¹, Ángel Alejandro Criollo R.¹, Luis Carvajal Carmona^{1,2}, María Magdalena Echeverry de Polanco¹.

- ¹. Grupo de Investigación Citogenética, filogenia y evolución de poblaciones, Facultades de Ciencias y Ciencias de la Salud, Universidad del Tolima, Colombia.
- ². Genome Center, Department of Biochemistry and Molecular Medicine, School of Medicine- University of California, Davis.

Recibido: Mayo 28 del 2019

Aceptado: Septiembre 25 del 2019

*Correspondencia del autor: Mabel Elena Bohórquez L

E-mail: mebohorquez@ut.edud.co

Resumen

Objetivo: Caracterizar las características clínico-patológicas y algunos fenotipos moleculares del cáncer colorrectal (CCR), en 1278 pacientes de la región andina colombiana.

Métodos: Se analizó una muestra de 1278 pacientes con CCR. Análisis de expresión de los genes *MMR*-Mismatch Repair-*hMLH1*, utilizando métodos inmunohistoquímicos (IHC). Para inestabilidad microsatelital-MSI se utilizó ADN de tejido tumoral-normal mediante PCR.

Resultados: Promedio de edad 57,4 años, la enfermedad es más frecuente en el género femenino 53,2%. La frecuencia de pacientes menores de 50 años (26,5%) es mayor a la esperada, el CCR en estos casos se asoció a tipos histológicos agresivos -carcinoma mucinoso y carcinoma en anillo de sello- $p < 0,000$, los cuales, a su vez, resultaron asociados a inestabilidad microsatelital (MSI-H). La localización más frecuente: recto (31,1%), $p = 0,002$, el diagnóstico se produjo en estados avanzados de la enfermedad T3-T4 (75,1%) $p = 0,022$. Tipo histológico más frecuente: adenocarcinoma. La sensibilidad del análisis inmunohistoquímico de MLH1 para la detección de MSI+, fue de 71% (CI: 49 - 87). El análisis por IHC-MLH1 en 575 casos mostró pérdida de la expresión en el 7% de los pacientes. Las pruebas de MSI se realizaron en 451 casos de CCR; el 23% presentaron alta inestabilidad microsatelital (MSI-H).

Conclusión: La determinación de inestabilidad microsatelital y la inmunohistoquímica para MMR permiten identificar pacientes en riesgo de ser portadores de mutaciones relacionadas con síndrome de Lynch en pacientes colombianos.

Palabras clave: Carcinoma, inestabilidad microsatelital, inmunohistoquímica para MMR, agregación familiar.

Abstract

Objective: To characterize the main clinicopathological features and the molecular phenotypes of Colorectal Carcinoma (CRC), in 1,278 patients from the Colombian Andean region.

Methods: 1278 patients with CRC. Analyses of the MMR (Mismatch Repair) genes hMLH1, immunohistochemical methods (IHC) were used. To evaluate microsatellite instability (MSI), DNA from tumoral-normal tissue by PCR.

Results: The average age of Colombian CRC patients is 57.4 years. The disease is more common in females (53.2%). The frequency of patients younger than 50 years (26.5%) is higher than expected; the CRC in these cases was associated with histological types: aggressive, mucinous carcinoma and singlet ring carcinoma ($P < 0.000$), which in turn were associated with microsatellite instability (MSI-H). The most frequent location was in the rectum (31.3%), $p=0.002$ and the diagnosis occurred in advanced stages of the disease T3-T4 (75.1%) $p=0.022$. The most common histological type was adenocarcinoma.

The sensitivity of the immunohistochemical analysis of MLH1 for the detection of MSI+ was 71% (CI: 49-87). In 575 cases, the IHC-MLH1 analysis showed loss of expression in 7% of patients. MSI analysis was performed in 451 cases of CRC, with 25% show in high microsatellite instability (MSI-H).

Conclusions: The determination of microsatellite instability and immunohistochemistry for MMRs allow to identify patients at risk of being carriers of mutations related to Lynch syndrome in Colombian patients.

Keywords: carcinoma, Microsatellite Instability, immunohistochemistry for MMRs.

Introducción:

Según la Agencia Internacional del Cáncer (1), en su publicación electrónica GLOBOCAN 2018 - <http://gco.iarc.fr/today>, varios tipos de cáncer gastrointestinal se cuentan entre las primeras 10 causas de morbilidad en el mundo. El cáncer colorrectal (CCR) de tipo histológico adenocarcinoma es el tercero en incidencia en los hombres (1.026.215 casos, el 10.9% del total) y el segundo en mujeres (823.303 casos, el 9,5% del total). En el ámbito mundial, casi el 60% de los casos ocurren en países desarrollados (2).

El CCR familiar: es la forma menos común de CCR. Agrupa entre un 3 y un 5% de todos los casos, y se caracteriza por una herencia mendeliana (3). Los síndromes de CCR, asociados a mutaciones hereditarias de genes de alto impacto, más conocidos, son la Poliposis Adenomatosa Familiar (FAP <1%), la Poliposis asociada a *MUTYH* (MAP, <1%) y el Cáncer Colorrectal Hereditario no Polipósico-Síndrome de Lynch (3-5%) (4). Cabe anotar que un porcentaje cercano al 20% de pacientes con historia familiar de CCR y/o presentación del mismo a edades tempranas (<50 años) no tienen evidencia de mutaciones en línea germinal de los genes de alta penetrancia antes mencionados; para estos casos se

han acuñado los términos CCR familiar (sin otra especificación), o CCR no sindrómico (5, 6).

La vía mutadora del CCR, también conocida como de inestabilidad microsatelital (MSI), por su nombre en inglés ("*microsatellite instability*") se caracteriza por el aumento o disminución de secuencias repetidas de nucleótidos, lo cual es una consecuencia de la disfunción de los genes del sistema de reparación de apareamientos erróneos ("*mismatch repair*" - MMR). Por esta vía se explica la aparición del síndrome de Lynch, y hasta un 15% de los casos de CCR esporádicos (7). En la década de los 90 se estableció un panel de microsatélites, conocido como panel Bethesda - recomendado por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos y reportado en diferentes estudios de investigación-, con el fin de realizar un tamizaje que permitiera identificar a los posibles portadores de mutaciones en MMR (8). Esta condición también se conoce como fenotipo hipermutador (9), que produce la inactivación de diferentes tipos de genes, como por ejemplo los que regulan la apoptosis (genes *BAX* o Caspasa-5), y otros implicados en el control y regulación del crecimiento celular (*TGF R2*, *WISP-3* o *IGFIIR*) (10, 11). Se ha intentado asociar los tumores con alta inestabilidad microsatelital a una mayor sobrevida, independientemente del estatus de *BAX*

o *TGF R2*, a través de diferentes estudios (12, 13).

Los casos de CCR que presentan una alta inestabilidad microsatelital (MSI-H) tienen deficiencia del sistema *MMR* y, por lo tanto, errores de replicación dependientes de la polimerasa, que se pueden presentar aproximadamente en un 12% de los tumores esporádicos y asociados con el síndrome de Lynch; generalmente se localizan en el colon derecho, presentan infiltración por células inflamatorias tipo linfocitos, patrón de crecimiento expansivo y una diferenciación celular mucinosa, medular o en anillo de sello, y relativamente un mejor pronóstico, comparado con los tumores estables para microsatélites (MSS) (14).

El proto-oncogen tipo B de raf (*BRAF*) codifica para una de las tres quinasas de raf. Está localizado en 7p34, quinasa serina/treonina; juega un rol en la señalización intracelular y en el crecimiento celular, y es un efector, aguas abajo de KRAS, en la vía de señalización protein quinasa (*MAPK*), mitógeno activada. Pertenece a la familia de las serin-treonin-quinasas-RAF (15), que incluye además los genes *ARAF* y *CRAF* (16). La mutación *BRAF* V600E consiste en una transversión de una timina por una adenina en el nucleótido 1.799 de la secuencia de *BRAF* (p. Val600Glu); frecuentemente está asociada con MSI. Se presenta en pacientes con CCR aserrado en un amplio rango que oscila entre un 5 y un 22%, y aproximadamente en un 15% de casos de CCR esporádico. Se ha logrado asociar las mutaciones en *BRAF* con una resistencia clínica al tratamiento con anticuerpos monoclonales dirigidos contra el factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*). La mutación *BRAF* V600E en CCR está asociada con características clínico-patológicas de alto riesgo, que le confieren un curso clínico agresivo; por lo tanto, es considerada como un biomarcador de mal pronóstico (17-21).

El objetivo de este trabajo fue describir las características clínico-patológicas del CCR, establecer el estatus de inestabilidad microsatelital en el ADN del tejido tumoral-normal de los pacientes con CCR, indagar su correlación con la pérdida de expresión de MLH1 y las mutaciones en *BRAF*, con el fin de determinar su utilidad en el tamizaje del carcinoma colorrectal con agregación familiar.

Materiales y métodos:

Muestra:

Durante seis años, previa aprobación bioética, se se-

leccionaron en los consultorios de oncología y en los laboratorios de patología de ciudades en la región andina como Bogotá, Medellín, Ibagué, Cali, pacientes menores de 75 años, con CCR de tipo adenocarcinoma histológico. Para la obtención de las muestras de tumor y tejido normal, incluidas en parafina, de los pacientes con CCR, se siguieron los siguientes pasos: 1. Consentimiento informado y carta de permiso para retiro de bloques tumorales y normales. 2. Análisis del reporte de patología, procedente de los laboratorios de patología de las instituciones participantes. 3. Selección por comparación con las láminas teñidas, de las correspondientes no teñidas y mapeo de las mismas. 4. Selección de los bloques incluidos en parafina (FFPE), en lo posible tanto de tumor como de tejido normal, para extracción de ADN. Como método alternativo para la obtención de tejido tumoral y normal, se acordó con los médicos cirujanos recibir inmediatamente luego de la resección (colectomía derecha, izquierda, proctocolectomía, etc), la muestra de la mucosa normal más alejada del tumor, idealmente a una distancia mayor de 10 cm; las muestras fueron almacenadas a -20°C, hasta su extracción y luego a -80°C. Luego de realizados los respectivos controles de calidad de los tejidos obtenidos, se realizaron las pruebas moleculares a un total de 575 casos.

Extracción y Cuantificación de ADN:

La extracción del ADN se realizó por el Kit de Qiagen “QIAGEN KIT, DNeasy – Blood & Tissue Kit, Cat, N° 69504” (22) Para tener un acercamiento a la concentración y calidad del ADN obtenido, al 80% de las muestras se le realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2%, con tinción con bromuro de etidio; con 5 µl del ADN extraído en cada caso. La cuantificación del ADN se realizó con el NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, siguiendo las recomendaciones de los fabricantes y descritas anteriormente (23).

Amplificación de microsatélites:

El análisis de MSI se realizó mediante PCR con sondas fluorescentes, de manera individual para cada microsatélite, basados en el panel de Bethesda, se verificaron las secuencias de los cebadores en el sitio web “UCSC Genome Browser”; el análisis se realizó comparando el número de picos del tejido normal y tumoral: MSI-H: alta inestabilidad (3 de 5 marcadores), MSI-L: baja inestabilidad (hasta 2 marcadores), MSS: estabilidad (ningún marcador). Tabla 1.

Tabla 1: Cebadores para la amplificación microsatelites - MSI

	Cebador hacia adelante	Cebador reverso
BAT-26	6TGACTACTTTTGACTTCAGCCAGT	TTCTTCAGTATATGTCAATGAAAACA
BAT-25	6TCGCCTCCAAGAATGTAAGT	TCTGGATTTTAACTATGGCTC
D2S123	6AAACAGGATGCCTGCCTTTA	GGACTTTCCACCTATGGGAC
D5S346	8ACTCACTCTAGTGATAAATCGGG	AGCAGATAAGACAGTATTACTAGTT
D17S250	8GGAAGAATCAAATAGACAAT	GCTGGCCATATATATATTTAAACC

6: FAM (6-carboxyfluorescein)

8: HEX (hexachloro-6-carboxyfluorescein)

Fuente: los autores

Las condiciones de amplificación de los microsatelites incluyeron un protocolo con la enzima MyTaq 2X 3 µl, cada cebador a 10 µM cada uno con 1µl, ADN 5 µl y dH2O 3 µl; se realizaron 39 ciclos de termociclado y finalmente la extensión se realizó a 71°C por 10 minutos.

Inmunohistoquímica para MLH1

Se realizaron pruebas de inmunohistoquímica (IHC) para verificar la expresión de la proteína MLH1, con el Equipo Ventana BenchMark GX (Roche Diagnostics International Ltd.). El proceso de lectura e interpretación fue realizado por dos patólogos de manera independiente-doble ciego, clasificando como positiva la tinción nuclear fuerte y como negativa la ausencia de la misma; adicionalmente, se valoró el porcentaje de células positivas entre 0% y 100%; se compararon los resultados y se realizó una revisión, en junta de mínimo tres patólogos al 10% de los casos positivos, es decir, aquellos que conservaban la expresión proteica y todos los casos con pérdida de la expresión de la proteína, también se revisaron en junta de patólogos, aquellos casos en los que no hubo concordancia en la observación inicial.

Amplificación y secuenciación de BRAF-V600E por PCR convencional

Se probó la mutación BRAF-V600E, los cebadores se diseñaron en el programa PRIMER3 <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>, a partir de la secuencia de los exones que contenían mayor número de mutaciones (hotspot), los cebadores usados fueron: F: 5'-AGAAATTAGATCTCTTACC-TAAACT-3', R: 5'-TTACCATCCACAAAATGGA-3', tamaño total del producto: 213pb, de acuerdo con la base de datos COSMIC <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>. Los protocolos de amplificación se estandarizaron en termocicladores de 96 pozos BIORAD C1000®; con Mytaq 2X, siguiendo los protocolos de termociclado estandarizados, que incluyó cebadores a 10 µM, un vo-

lumen final de reacción de 20 µl y 39 ciclos de amplificación.

Resultados:

1.278 casos las ciudades con mayor número de pacientes son Medellín (29%), Ibagué (21%) y Bogotá (18%) y otros municipios de la región andina en menor porcentaje, por lo que se distribuyeron por regiones, así centro 338 (29,7%), noroccidente 308 (24,1%), norte 132 (10,6%), sur 117 (9,2%).

El CCR se presentó en 680 pacientes del género femenino (53,2%) y en 598 hombres (46,8%). La distribución por grupo etario, evidenció que el 30,8% (n=394) de los pacientes tenía entre 60 y 69 años y el 27,2% (n=347) entre 50 y 59 años. Sin embargo, llama la atención que 339 pacientes (26,5%) presentaron CCR con 50 años o menos de edad.

La localización del tumor, se presentó con mayor frecuencia en el recto con 397 pacientes (42,6%), seguida por la región distal (30%) y proximal (27,3%) (porcentaje teniendo en cuenta únicamente los casos con el dato de localización).

Inmunohistoquímica para MLH1 - IHC

Un total de 575 casos tenían representación suficiente en el bloque de parafina de tumor y normal en sitios cercanos, se les realizó Inmunohistoquímica para MLH1, de los cuales 154 (27%) casos no fueron evaluables, las causas más recurrentes fueron: se agotó el tumor en el tejido, se presentaban defectos de fijación, la tinción fue débil en el tumor, no hubo tinción del control interno, el tumor era diferente a un adenocarcinoma; 379 (66%) casos presentaron positividad para la expresión de la proteína y 41 (7%) presentaron negatividad en la expresión de la proteína.

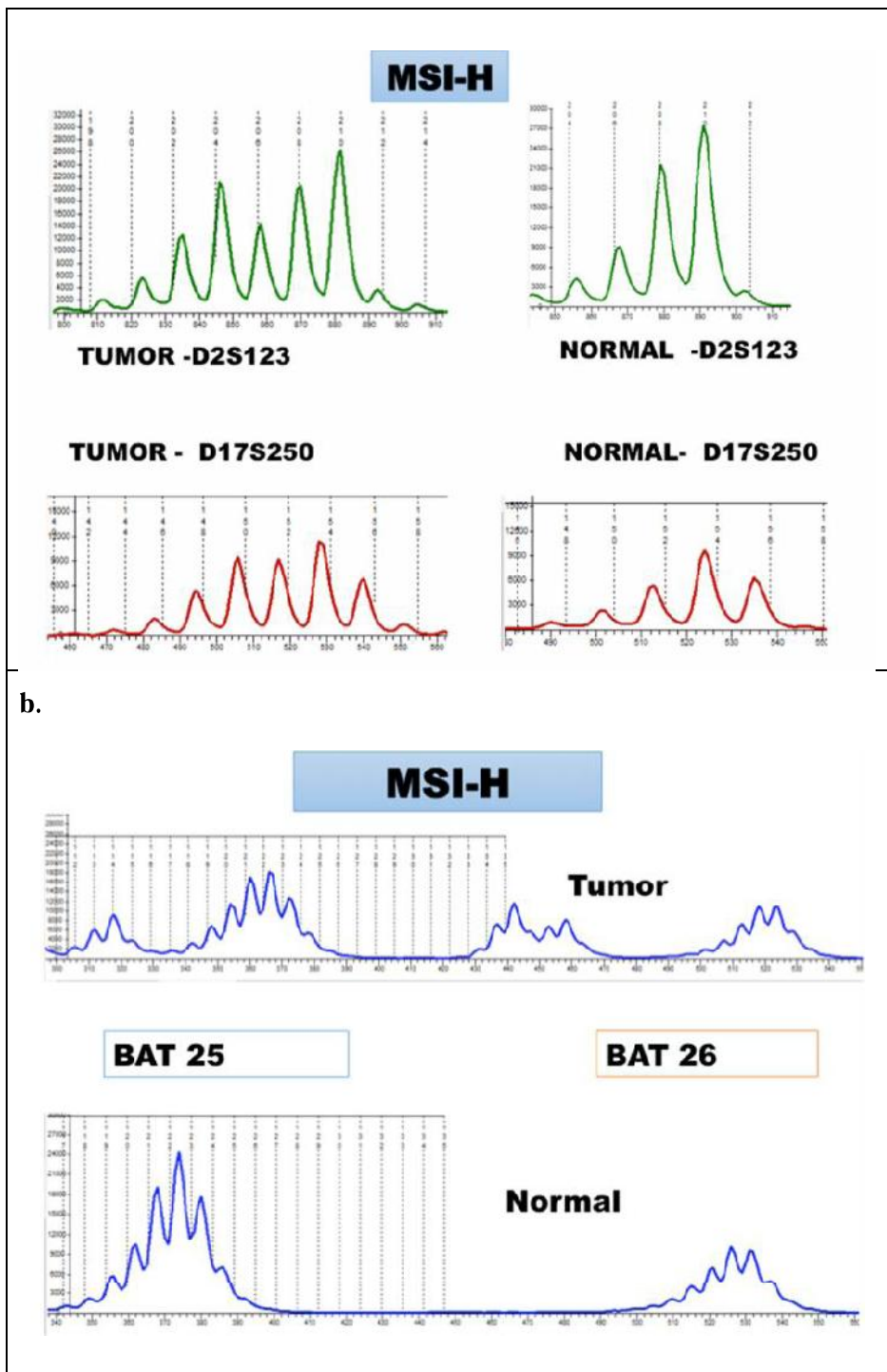


Figura 1: Inestabilidad microsatelital, electroferogramas (MSI-H: alta inestabilidad en los microsatelites): a: MSI-H para los marcadores D2S123 y D17S250, el tejido tumoral está a la derecha y el normal a la izquierda, observe la diferencia en el número de picos de cada tejido en el electroferograma; b: MSI-H para los marcadores BAT 25 y BAT26, el tejido tumoral esta en la parte superior y el tejido normal la parte inferior, observe la diferencia en el número de picos de cada tejido en el electroferograma.

El análisis de comparaciones de los resultados en IHC con las variables clínicopatológicas, mostró diferencias significativas con la localización del tumor ($p=0,000$) y la IHC negativa para MLH1, con pérdida de la expresión de MLH1 en el colon derecho con 22 casos (81,5%) contra 5 (18,5%) del colon izquierdo y ningún caso en el recto.

Se realizó la comparación entre los resultados de IHC en biopsia, contra los especímenes de resección colónica, encontrándose diferencias estadísticas ($p=0,025$); la mayoría de casos presentaron pérdida de la expresión de MLH1 en las colectomías (21 casos 78%), en contra de las biopsias (6 casos 22%), no se presentaron diferencias entre los grupos con las demás variables.

Inestabilidad microsatelital – MSI

En un total de 451 casos, fue posible obtener ADN en cantidad y calidad suficientes para realizar estas pruebas, se analizaron para cada paciente (tumor - normal) los 5 marcadores, el análisis se realizó solo en aquellos casos en los que todos los 5 marcadores amplificaron, tanto en tumor como en normal, en la figura 1 se pueden apreciar dos ejemplos de electroferogramas analizados de un caso MSI-H y un caso MSS.

En el 25% de los casos, uno o más de los marcadores MSI no amplificaron, por lo tanto, no fueron analizados, en el 10% de los casos no se logró amplificar los marcadores en el tejido normal y por lo tanto no se pudo comparar con el tumor; el 23% (102 pacientes), presentaron alta inestabilidad microsatelital (MSI-H), 11% (49 pacientes), baja inestabilidad microsatelital (MSI-L), y el restante 32% tenían los microsatélites estables (MSS), figura 2. Los pacientes con MSI+(L, H) presentaron un promedio de edad de 58,5 años (19- 93 años).

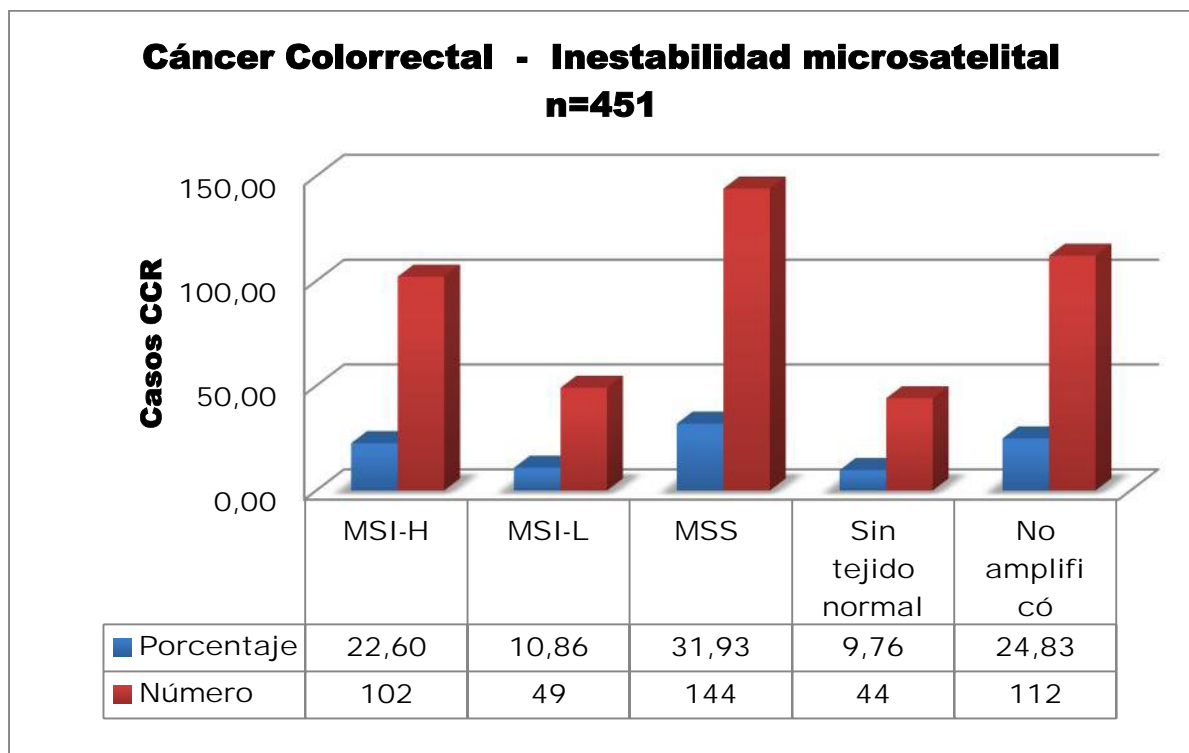


Figura 2: Inestabilidad Microsatelital, porcentaje en pacientes con CCR. (MSI-H: alta inestabilidad, MSI-L: baja inestabilidad, MSS: estabilidad en los microsatélites).

Para determinar el mejor tipo de tejido (tejido ideal) para las pruebas moleculares, se compararon los casos incluidos en parafina (360 pacientes), con los casos de tejido fresco (85 pacientes), se encontró que el 100% de los casos de tejido fresco presentaron amplificación con bandas nítidas en los geles de agarosa; es decir, que todos los casos que no amplificaron (112 casos), correspondían a casos de tejido incluido en parafina.

La sensibilidad del análisis inmunohistoquímico de MLH1 para la detección de MSI+ fue de 71% (CI: 49 - 87), la especificidad de 62% (CI: 55 - 69), el valor predictivo positivo de 19% (CI: 12 - 29) y el valor predictivo negativo

de 94% (CI: 89 – 98).

El análisis comparativo MSI-IHC, evidencia diferencias significativas cuando se relacionaron el tamaño del tumor (0,004) el grado histológico ($p=0,04$), los pólipos adenomatosos (0,01) y la expresión de la proteína MLH1 ($p=0,000$), pero no con otras variables clínico-patológicas (género, edad, localización, estado, IMC). Se observó que 276 pacientes tienen resultados para las dos pruebas MSI – IHC; se dividieron en dos grupos: 4,7% de los casos, con alta inestabilidad y pérdida de la expresión de la proteína MLH1, el 42% fueron estables (MSS) para los microsatélites y la proteína MLH1 presentó expresión normal. Los casos con MSI-H y MSI-L, fueron seleccionados para probar las mutaciones en *BRAF* (*V600E – K601I*).

Discusión:

La media de edad encontrada fue de 57,43 años; menor a la reportada en diferentes estudios a nivel mundial, especialmente en países desarrollados con medias desde 64 a 72 años (24-33); Los resultados de este trabajo aportan datos para afinar las estrategias en salud pública, en cuanto a prevención del CCR en Colombia, ya que los menores de 50 años de este estudio y las mujeres, presentan una mayor asociación con el riesgo respectivo (1,8 y 1,5), de padecer CCR, si tienen antecedentes familiares, por lo cual, el tamizaje para la enfermedad debe tener en cuenta estos criterios de género, edad y antecedentes (34).

Correlación entre características clínicas, *MSI – IHC – BRAF*:

Obtener amplificaciones y resultados analizables, en este tipo de técnica representa un avance en la eficiencia de las pruebas moleculares, dado que el tejido incluido en parafina está fragmentado y el diseño de cebadores es complejo, sin embargo, el rendimiento de estas pruebas en el tejido fresco es cercano al 100%.

El porcentaje de pacientes estables para los microsatélites - MSS en el presente estudio (32%), no es tan alto como el reportado en series de pacientes que oscilan entre el 59% y el 91% (35-38).

Las asociaciones de los pacientes con MSS, con tumores grandes avanzados (T3 y T4) (55% versus 39%), compromiso ganglionar positivo (60,8% versus 37,3%) y pobre diferenciación (31% versus 21%), está acorde con las publicaciones que relacionan a los tumores

MSS, con un mal pronóstico y la presencia de MSI-H con un mejor pronóstico (39, 40).

Los resultados de nuestra cohorte de pacientes con CCR, evidencian un 23% con MSI-H, más alto que el reportado en otras series (12, 41-46), probablemente asociado al porcentaje de pacientes jóvenes en la muestra, los antecedentes familiares y/o factores ambientales. De los casos analizados el 100% del tipo histológico anillo de sello, presentó alta inestabilidad microsatelital, comparado con el 36% de los tipos mucinosos, similar a lo reportado en otros estudios (47). Los resultados son diferentes con respecto a la localización -colon derecho con mayor frecuencia de MSS (42%)- y el grado histológico, alto (31% en MSS versus 21% en MSI-H) (48, 49); diferentes series han reportado que el estatus MSI-H, es indicador de un pronóstico favorable, independientemente que este asociado con tipos histológicos agresivos como son el mucinoso y anillo de sello (49, 50), hecho que también resalta la importancia de implementar estas técnicas en el diagnóstico de los pacientes con CCR (51, 52).

Los pacientes de CCR, con MSI-H, se asociaron más a pérdida de la expresión de la proteína MLH1 (24%), que los de CCR estables (12%), $p=0,000$, hecho que se compara con estudios previos que indican que estas pruebas son útiles como tamizaje para CCR con agregación familiar (53-57), así mismo, estos resultados deben tenerse en cuenta en la era de la medicina personalizada, en la cual, los pacientes MSI-H pueden beneficiarse o no, de algunos tratamientos como 5-Fluorouracilo y terapias inmunomoduladoras, entre otros (58-60).

La conjunción de las técnicas de inestabilidad microsatelital e inmunohistoquímica permitió realizar un tamizaje de los casos con agregación familiar en 4,7% de los casos, lo cual está de acuerdo con lo reportado; en este porcentaje hay predominio de localización en el colon derecho y asociación a los tipos histológicos mucinoso y anillo de sello; también se estableció una sensibilidad de la prueba de inmunohistoquímica de MLH1 para la detección de MSI+ en un 71% del total de casos, con especificidad del 62%, no tan alta como la reportada en otros estudios (61-63) y muy probablemente relacionada con los siguientes hechos: 1. Se probó sólo una de las proteínas MLH1 y no todas, (MSH2, MSH6, PMS2). 2. Se realizó la prueba en biopsias pequeñas. 3. La tinción de las placas es débil debido a defectos de fijación (64). La mayoría de estudios con IHC usan más de una proteína en la prueba (65), sin embargo, la sen-

sibilidad en este trabajo está dentro del rango reportado por otros estudios (62% - 89%) (66, 67).

Los análisis de variables como la edad, el género o el estado, no mostraron diferencias en la expresión del MLH1; en otras series de casos se han encontrado diferencias con la edad (68). En el presente estudio, se encontró asociación con la localización del tumor en el lado derecho, al igual que en otros estudios (69, 70). Los estudios internacionales recomiendan que, en regiones con recursos económicos limitados para realizar tamizaje para síndromes con agregación familiar, la primera prueba a realizar debe ser la IHC (71, 72).

El fenotipo MSI-H, *BRAF* V600E, se presenta entre el 10% y el 20% de los casos de CCR (54), de los cuales sólo del 3% al 5% corresponden a síndrome de Lynch y el resto a CCR esporádico. En nuestro trabajo, este fenotipo corresponde al 12,6% de los casos, de los cuales 11% no reporta antecedentes familiares de cáncer, ni histología sugestiva de Lynch (mucinoso, infiltrado linfocítico), hecho que se ha asociado a déficit en el sistema MMR, por metilación de islas CpG "CpG island methylator phenotype" (CIMP) -fenotipo metilado- u otros mecanismos de metilación en diversos genes (*RASSF2*, *SOX5*, *GALNT14*, etc.) (21, 73-75), factores medioambientales relacionados con metilación, como el hábito de fumar o ingerir alcohol o también los componentes de la dieta (70). Debemos tener en cuenta que de estos pacientes, 7 tienen conservada la expresión de MLH1, 9 no tienen resultado de IHC y sólo 1 tiene pérdida de la expresión de MLH1, este fenotipo debe indagarse en estudios subsiguientes, aumentando el número de pacientes y realizando pruebas de IHC para el resto de proteínas del sistema MMR; otros estudios han encontrado la presencia de este fenotipo en mayor frecuencia 67%, con buena capacidad para diferenciar los casos esporádicos de los germinales en quienes expresan en fenotipo MSI-H, *BRAF* V600E (69). Sólo 2 pacientes (1,4%) presentan el fenotipo MSI-H, *BRAF* V600E y corresponden a síndromes con agregación familiar, este hallazgo es interesante en la medida que diversos autores han reportado que la mutación *BRAF* V600E no se presenta en casos de CCR con agregación familiar (76).

La mutación *BRAF* V600E en CCR se estima en cerca del 10% en casos no seleccionados (77-82), este porcentaje es menor en casos de CCR con MSS, 4%, mientras que en los casos de CCR con MSI-H asciende hasta un 27% a 52% (77, 78, 83). Los tumores mutantes se asocian más con el género femenino, tener 60 años o más,

localización proximal, pobre diferenciación y estados avanzados de la enfermedad (17, 84). En el presente estudio no se encontraron diferencias significativas con las variables clínicas descritas, muy probablemente estos resultados tienen que ver con el hecho de que el número inicial de muestras (1.278), se redujo a 575 debido a que fue imposible obtener muestras de tumor para todos los casos, dado que el material incluido en parafina suele consumirse en los análisis clínicos de los pacientes. Hay marcadas diferencias en la presentación de la mutación, desde porcentajes bajos (3% a 5%) en países orientales (85, 86), hasta un poco más altos (alrededor de 15%) en occidente (87-89). El 11,6% de *BRAF* V600E, encontrado en nuestro trabajo, es similar al reportado en otros estudios (15, 19), sin embargo, este hallazgo es un importante aporte para las decisiones terapéuticas, en la medida en que se asocia como marcador de resistencia de las terapias anti-EGFR (52, 90).

Durante el proceso de carcinogénesis colorrectal, las mutaciones en *BRAF* y *KRAS* ocurren tempranamente durante la transición de un adenoma pequeño a uno de mayor tamaño; en los casos de CCR esporádico con MSI, se sugiere hipermetilación del promotor de los genes *MMR*, que se correlaciona con mutaciones en *BRAF* (15), sin embargo, a diferencia de otros estudios, en los que las mutaciones en *BRAF* se correlacionaron completamente con la pérdida de la expresión de la proteína MLH1 y con los datos clínico patológicos, en nuestro estudio el 12,5% no presentó esta correlación (84), los resultados, muy probablemente, estén asociados al tamaño final de la muestra, otros estudios han mostrado asociación de la mutación *BRAF* con las variables clínico patológicas como la edad menor de 50 años, el género femenino y el colon derecho (91). Es posible que, en los casos de CCR de nuestra serie, la mutación *BRAF* esté asociada a: otra vía de carcinogénesis colorrectal, la ancestría, los determinantes medioambientales o, la sensibilidad de la prueba, por lo que es necesario confirmar estas hipótesis en estudios basados en un número mayor de muestras, como se postuló en el trabajo de Rozek (92). Es importante resaltar que el 11,6% de los pacientes de esta cohorte son portadores de la mutación *BRAF* y que esta se asocia con un mal pronóstico tanto como *KRAS* (93-95).

Conclusión:

Los pacientes con el perfil MSI+, *BRAF* V600E, se asocian con CCR de tipo esporádico.

Se sugiere implementar dentro de los programas estatales de promoción y prevención del CCR, las pruebas IHC y MSI, en relación con la identificación de las familias portadoras de alelos de alto riesgo para cáncer con agregación familiar, con lo cual no sólo se establecerá la verdadera sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo o negativo de la prueba, sino que, además se logrará una notable mejora en estos programas.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los miembros del grupo de investigación citogenética, filogenia y evolución de poblaciones por su apoyo en los procesos técnicos y de análisis de las diferentes pruebas, al departamento de patología de la Universidad Nacional de Colombia por

su apoyo con la realización y análisis inmunohistoquímico; al personal del laboratorio Carvajal-Carmona en la Universidad de California – Davis, por su apoyo en el desarrollo de la inestabilidad microsatelital, a Rodrigo Prieto Sánchez Q.E.P.D, quien colaboro en todas las fases de este proyecto.

Financiación

Este proyecto fue financiado por la Universidad del Tolima, el séptimo marco común europeo y la Universidad de California - Davis.

Conflicto de intereses

Los autores manifiestan no tener conflictos de intereses.

Referencias

1. IARC IAFROC. GLOBOCAN_2018: WHO; 2018 Consultado de: <http://gco.iarc.fr/today/home>.
2. Binefa G, Rodriguez-Moranta F, Teule A, Medina-Hayas M. (2014) Colorectal cancer: from prevention to personalized medicine. *World J Gastroenterol.* 20(22):6786-808.
3. Fearon ER. (2011) Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol.*;6:479-507.
4. Kastrinos F, Syngal S. Inherited colorectal cancer syndromes. (2011) *Cancer J.* 17(6):405-15.
5. Stoffel EM, Kastrinos F. (2014) Familial colorectal cancer, beyond Lynch syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 12(7):1059-68.
6. Armelao F, de Pretis G. (2014) Familial colorectal cancer: a review. *World J Gastroenterol.* 20(28):9292-8.
7. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. (1998). A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 58(22):5248-57.
8. Bedeir A, Krasinskas AM. (2011) Molecular diagnostics of colorectal cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 135(5):578-87.
9. Boland CR, Goel A. (2010) Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology.* 138(6):2073-87 e3.
10. Yashiro M, Hirakawa K, Boland CR. (2010) Mutations in TGFbeta-RII and BAX mediate tumor progression in the later stages of colorectal cancer with microsatellite instability. *BMC cancer.* 10:303.
11. Laurent-Puig P, Agostini J, Maley K. (2010) [Colorectal oncogenesis]. *Bulletin du cancer.* 97(11):1311-21.
12. Shima K, Morikawa T, Yamauchi M, Kuchiba A, Imamura Y, Liao X, et al. (2011) TGFBR2 and BAX mononucleotide tract mutations, microsatellite instability, and prognosis in 1072 colorectal cancers. *PLoS One.* 6(9): e25062.
13. Bolocan A, Ion D, Ciocan DN, Paduraru DN. (2012) Prognostic and predictive factors in colorectal cancer. *Chirurgia (Bucur).* 107(5):555-63.
14. Kloor M, Staffa L, Ahadova A, von Knebel Doeberitz M. (2014) Clinical significance of microsatellite instability in colorectal cancer. *Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft fur Chirurgie.* 399(1):23-31.
15. Levidou G, Saetta AA, Gigelou F, Karlou M, Papanastasiou P, Stamatelli A, et al. (2012) ERK/pERK expression and B-raf mutations in colon adenocarcinomas: correlation with clinicopathological characteristics. *World J Surg Oncol.* 10:47.
16. Qin J, Xie P, Ventocilla C, Zhou G, Vultur A, Chen Q, et al. (2012) Identification of a novel family of

- BRAF(V600E) inhibitors. *J Med Chem.*;55(11):5220-30.
17. Chen D, Huang JF, Liu K, Zhang LQ, Yang Z, Chuai ZR, et al. (2014) BRAFV600E mutation and its association with clinicopathological features of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 9(3): e90607.
 18. Ritterhouse LL, Barletta JA. (2015) BRAF V600E mutation-specific antibody: A review. *Semin Diagn Pathol.* 32(5):400-8.
 19. Kalady MF, DeJulius KL, Sanchez JA, Jarrar A, Liu X, Manilich E, et al. (2012) BRAF mutations in colorectal cancer are associated with distinct clinical characteristics and worse prognosis. *Dis Colon Rectum.* 55(2):128-33.
 20. Pritchard CC, Grady WM. (2011) Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut.* 60(1):116-29.
 21. Murcia O, Juarez M, Hernandez-Illan E, Egoavil C, Giner-Calabuig M, Rodriguez-Soler M, et al. (2016) Serrated colorectal cancer: Molecular classification, prognosis, and response to chemotherapy. *World J Gastroenterol.* 22(13):3516-30.
 22. QIAGEN. QIAGEN KIT, Dneasy – Blood & Tissue Kit. 2013.
 23. Thermo-Fisher S. 2013 Consultado de: <http://www.nanodrop.com/Products.aspx>
 24. Ghazi S, Berg E, Lindblom A, Lindfors U. (2013) Clinicopathological analysis of colorectal cancer: a comparison between emergency and elective surgical cases. *World J Surg Oncol.* 11:133.
 25. Domingo E, Ramamoorthy R, Oukrif D, Rosmarin D, Presz M, Wang H, et al. (2013) Use of multivariate analysis to suggest a new molecular classification of colorectal cancer. *J pathol* 229(3):441-8.
 26. McKay A, Donaleshen J, Helewa RM, Park J, Wirtzfeld D, Hochman D, et al. (2014) Does young age influence the prognosis of colorectal cancer: a population-based analysis. *World J Surg Oncol.* 12:370.
 27. Millan M, Merino S, Caro A, Feliu F, Escuder J, Francesch T. (2015) Treatment of colorectal cancer in the elderly. *World J Gastrointest Oncol.* 7(10):204-20.
 28. Dodou D, de Winter JC. (2012) The relationship between distal and proximal colonic neoplasia: a meta-analysis. *J Gen Intern Med.* 27(3):361-70.
 29. Hansen IO, Jess P. (2012) Possible better long-term survival in left versus right-sided colon cancer - a systematic review. *Dan Med J.* 59(6): A4444.
 30. Purim O, Gordon N, Brenner B. (2013) Cancer of the colon and rectum: potential effects of sex-age interactions on incidence and outcome. *Med Sci Monit.* 19:203-9.
 31. Wu QJ, Vogtmann E, Zhang W, Xie L, Yang WS, Tan YT, et al. (2012) Cancer incidence among adolescents and young adults in urban Shanghai, 1973-2005. *PLoS One.* 7(8): e42607.
 32. Brenner H, Kloor M, Pox CP. (2014) Colorectal cancer. *Lancet.* 383(9927):1490-502.
 33. Karanikas M, Esebidis A. (2016) Increasing incidence of colon cancer in patients <50 years old: a new entity? *Ann Transl Med.* 4(9):164.
 34. Fedewa SA, Ma J, Sauer AG, Siegel RL, Smith RA, Wender RC, et al. (2015) How many individuals will need to be screened to increase colorectal cancer screening prevalence to 80% by 2018? *Cancer.* 121(23):4258-65.
 35. Deschoolmeester V, Boeckx C, Baay M, Weyler J, Wuyts W, Van Marck E, et al. (2010) KRAS mutation detection and prognostic potential in sporadic colorectal cancer using high-resolution melting analysis. *Br J Cancer.* 103(10):1627-36.
 36. Krivokapic Z, Markovic S, Antic J, Dimitrijevic I, Bojic D, Svorcan P, et al. (2012) Clinical and pathological tools for identifying microsatellite instability in colorectal cancer. *Croat Med J.* 53(4):328-35.
 37. Raskin L, Dakubo JC, Palaski N, Greenson JK, Gruber SB. (2013) Distinct molecular features of colorectal cancer in Ghana. *Cancer Epidemiol.* 37(5):556-61.
 38. Sorbye H, Dragomir A, Sundstrom M, Pfeiffer P, Thunberg U, Bergfors M, et al. (2015) High BRAF Mutation Frequency and Marked Survival Differences in Subgroups According to KRAS/BRAF Mutation Status and Tumor Tissue Availability in a Prospective Population-Based Metastatic Colorectal Cancer Cohort. *PLoS One.* 10(6): e0131046.
 39. Ogino S, Goel A. (2008) Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *J mol diagn.* 10(1):13-27.
 40. Nazemalhosseini Mojarad E, Kashfi SM, Mirtalebi H, Taleghani MY, Azimzadeh P, Savabkar S, et

- al. (2016) Low Level of Microsatellite Instability Correlates with Poor Clinical Prognosis in Stage II Colorectal Cancer Patients. *J Oncol.* 2016:2196703.
41. Greenson JK, Huang SC, Herron C, Moreno V, Bonner JD, Tomsho LP, et al. (2009) Pathologic predictors of microsatellite instability in colorectal cancer. *Am J Surg Pathol.* 33(1):126-33.
 42. Ashktorab H, Ahuja S, Kannan L, Llor X, Ellis NA, Xicola RM, et al. (2016) A meta-analysis of MSI frequency and race in colorectal cancer. *Oncotarget.* 7(23):34546-34557.
 43. Gupta S, Ashfaq R, Kapur P, Afonso BB, Nguyen TP, Ansari F, et al. (2010) Microsatellite instability among individuals of Hispanic origin with colorectal cancer. *Cancer.* 116(21):4965-4972.
 44. Batur S, Vuralli Bakkaloglu D, Kepil N, Erdamar S. (2016) Microsatellite instability and BRAF mutation in colorectal cancer: clinicopathological characteristics and effects on survival. *Bosn J Basic Med Sci.* 16(4):254-260.
 45. Kanth VV, Bhalsing S, Sasikala M, Rao GV, Pradeep R, Avanthi US, et al. (2014) Microsatellite instability and promoter hypermethylation in colorectal cancer in India. *Tumour biol.* 35(5):4347-4355.
 46. Kamat N, Khidhir MA, Alashari MM, Rannug U. (2013) Microsatellite instability and loss of heterozygosity detected in middle-aged patients with sporadic colon cancer: A retrospective study. *Oncol Lett.* 6(5):1413-1420.
 47. Shia J, Ellis NA, Paty PB, Nash GM, Qin J, Offit K, et al. (2003) Value of histopathology in predicting microsatellite instability in hereditary nonpolyposis colorectal cancer and sporadic colorectal cancer. *Am J Surg Pathol.* 27(11):1407-1417.
 48. Hall G, Clarkson A, Shi A, Langford E, Leung H, Eckstein RP, et al. (2010) Immunohistochemistry for PMS2 and MSH6 alone can replace a four antibody panel for mismatch repair deficiency screening in colorectal adenocarcinoma. *Pathology.* 42(5):409-13.
 49. Raut CP, Pawlik TM, Rodriguez-Bigas MA. (2004) Clinicopathologic features in colorectal cancer patients with microsatellite instability. *Mutat Res.* 568(2):275-82.
 50. Jung SH, Kim SH, Kim JH. (2016) Prognostic impact of microsatellite instability in colorectal cancer presenting with mucinous, signet-ring, and poorly differentiated cells. *Ann Coloproctol.* 32(2):58-65.
 51. Kaya M, Basak F, Sisik A, Hasbahceci M, Bas G, Alimoglu O, et al. (2017) Validation of microsatellite instability histology scores with Bethesda guidelines in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Cancer Res Ther.* 13(2):356-61.
 52. Vakiani E. (2017) Molecular Testing of Colorectal Cancer in the Modern Era: What Are We Doing and Why? *Surg pathol clin.* 10(4):1009-20.
 53. Alqahtani M, Grieu F, Carrello A, Amanuel B, Mashour M, Alattas R, et al. (2016) Screening for Lynch Syndrome in young colorectal cancer patients from Saudi Arabia using microsatellite instability as the initial test. *Asian Pac J Cancer Prev.* 17(4):1917-23.
 54. Setaffy L, Langner C. (2015) Microsatellite instability in colorectal cancer: clinicopathological significance. *Pol J Pathol.* 66(3):203-18.
 55. Boissiere-Michot F, Frugier H, Ho-Pun-Cheung A, Lopez-Crapez E, Duffour J, Bibeau F. (2016) Immunohistochemical staining for p16 and BRAFV600E is useful to distinguish between sporadic and hereditary (Lynch syndrome-related) microsatellite instable colorectal carcinomas. *Virchows Arch.* 469(2):135-44.
 56. Shamekh R, Cives MM, J, Coppola D. (2016) Higher frequency of isolated PMS2 loss in colorectal tumors in Colombian population: preliminary results. *Pathol Lab Med Intern.* 8:37-41
 57. Ortiz C, Dongo-Pflucker K, Martin-Cruz L, Barletta Carrillo C, Mora-Alferez P, Arias A. (2016) Microsatellite instability in patients with diagnostic of colorectal cancer. *Rev Gastroenterol Peru.* 36(1):15-22.
 58. Gatalica Z, Vranic S, Xiu J, Swensen J, Reddy S. (2016) High microsatellite instability (MSI-H) colorectal carcinoma: a brief review of predictive biomarkers in the era of personalized medicine. *Fam Cancer.* 15(3):405-12.
 59. Kim IY. (2016) Impact of microsatellite instability in signet-ring cell and mucinous components in patients with colorectal carcinoma. *Ann Coloproctol.* 32(2):45-6.
 60. Kudryavtseva AV, Lipatova AV, Zaretsky AR, Moskalev AA, Fedorova MS, Rasskazova AS, et al. (2016) Important molecular genetic markers of colorectal cancer. *Oncotarget.* 16;7(33):53959-83.

61. Siddique S, Tariq K, Rafiq S, Raheem A, Ahmed R, Shabbir-Moosajee M, et al. (2016) Sporadic Early Onset Colorectal Cancer in Pakistan: A Case- Control Analysis of Microsatellite Instability. *Asian Pac J Cancer Prev.*;17(5):2587-92.
62. Shia J, Klimstra DS, Nafa K, Offit K, Guillem JG, Markowitz AJ, et al. (2005) Value of immunohistochemical detection of DNA mismatch repair proteins in predicting germline mutation in hereditary colorectal neoplasms. *Am J Surg Pathol.*;29(1):96-104.
63. Becouarn Y, Rullier A, Gorry P, Smith D, Richard-Molard B, Echinard E, et al. (2005) Value of microsatellite instability typing in detecting hereditary non-polyposis colorectal cancer. A prospective multicentric study by the Association Aquitaine Gastro. *Gastroenterol Clin Biol.* 29(6-7):667-75.
64. Shia J. (2008) Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part I. The utility of immunohistochemistry. *J Mol Diagn.* 10(4):293-300.
65. Shia J, Tang LH, Vakiani E, Guillem JG, Stadler ZK, Soslow RA, et al. (2009) Immunohistochemistry as first-line screening for detecting colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: a 2-antibody panel may be as predictive as a 4-antibody panel. *Am J Surg Pathol.* 33(11):1639-45.
66. Niessen RC, Berends MJ, Wu Y, Sijmons RH, Hollema H, Ligtenberg MJ, et al. (2006) Identification of mismatch repair gene mutations in young patients with colorectal cancer and in patients with multiple tumours associated with hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gut.* 55(12):1781-8.
67. Hendriks Y, Franken P, Dierssen JW, De Leeuw W, Wijnen J, Dreef E, et al. (2003) Conventional and tissue microarray immunohistochemical expression analysis of mismatch repair in hereditary colorectal tumors. *Am J Pathol.*;162(2):469-77.
68. Luevano-Gonzalez A, Guzman AQ, Ancer Rodriguez J, Ortiz Lopez R, Rojas Martinez A, Gonzalez Guerrero JF, et al. (2011) Analysis of DNA mismatch repair proteins expression and BRAF V600E mutation in a subset of early- and late-onset colorectal carcinoma patients in Mexico. *Arch Med Res.* 42(6):457-62.
69. Waldmann E, Ferlitsch M, Binder N, Sellner F, Karner J, Heinisch B, et al. (2015) Tumor and Patient Characteristics of Individuals with Mismatch Repair Deficient Colorectal Cancer. *Digestion.* 91(4):286-93.
70. Sekal M, Ameurtesse H, Chbani L, Ouldin K, Bennis S, Abkari M, et al. (2015) Epigenetics could explain some Moroccan population colorectal cancers peculiarities: microsatellite instability pathway exploration. *Diagn Pathol.*;10:77.
71. Colling R, Church DN, Carmichael J, Murphy L, East J, Risby P, et al. (2015) Screening for Lynch syndrome and referral to clinical genetics by selective mismatch repair protein immunohistochemistry testing: an audit and cost analysis. *J Clin Pathol.* 68(12):1036-9.
72. South CD, Yearsley M, Martin E, Arnold M, Frankel W, Hampel H. (2009) Immunohistochemistry staining for the mismatch repair proteins in the clinical care of patients with colorectal cancer. *Genet med.* 11(11):812-7.
73. Sawada T, Yamamoto E, Yamano HO, Nojima M, Harada T, Maruyama R, et al. (2016) Assessment of epigenetic alterations in early colorectal lesions containing BRAF mutations. *Oncotarget.* 7(23):35106-18.
74. Bae JM, Kim JH, Kang GH. (2016) Molecular Subtypes of Colorectal Cancer and Their Clinicopathologic Features, With an emphasis on the serrated neoplasia pathway. *Arch Pathol Lab Med.* 140(5):406-12.
75. Jia M, Gao X, Zhang Y, Hoffmeister M, Brenner H. (2016) Different definitions of CpG island methylator phenotype and outcomes of colorectal cancer: a systematic review. *Clin Epigenetics.* 8:25.
76. Duraturo F, Liccardo R, Cavallo A, De Rosa M, Rossi GB, Izzo P. (2015) Multivariate analysis as a method for evaluating the pathogenicity of novel genetic MLH1 variants in patients with colorectal cancer and microsatellite instability. *Int J Mol Med.* 36(2):511-7.
77. Samowitz WS, Sweeney C, Herrick J, Albertsen H, Levin TR, Murtaugh MA, et al. (2005) Poor survival associated with the BRAF V600E mutation in microsatellite-stable colon cancers. *Cancer Res.* 65(14):6063-9.

78. Li WQ, Kawakami K, Ruszkiewicz A, Bennett G, Moore J, Iacopetta B. (2006) BRAF mutations are associated with distinctive clinical, pathological and molecular features of colorectal cancer independently of microsatellite instability status. *Mol Cancer*. 5:2.
79. Lubomierski N, Plotz G, Wormek M, Engels K, Kriener S, Trojan J, et al. (2005) BRAF mutations in colorectal carcinoma suggest two entities of microsatellite-unstable tumors. *Cancer*. 104(5):952-61.
80. Marzouk O, Schofield J. (2011) Review of histopathological and molecular prognostic features in colorectal cancer. *Cancers*. 3(2):2767-810.
81. Sayagues JM, Del Carmen S, Del Mar Abad M, Corchete LA, Bengoechea O, Anduaga MF, et al. (2018) Combined assessment of the TNM stage and BRAF mutational status at diagnosis in sporadic colorectal cancer patients. *Oncotarget*. 9(35):24081-96.
82. D'Haene N, Fontanges Q, De Neve N, Blanchard O, Melendez B, Delos M, et al. (2018) Clinical application of targeted next-generation sequencing for colorectal cancer patients: a multicentric Belgian experience. *Oncotarget*. 9(29):20761-8.
83. Koinuma K, Shitoh K, Miyakura Y, Furukawa T, Yamashita Y, Ota J, et al. (2004) Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas. *Int J cancer* 108(2):237-42.
84. Ye JX, Liu Y, Qin Y, Zhong HH, Yi WN, Shi XY. (2015) KRAS and BRAF gene mutations and DNA mismatch repair status in Chinese colorectal carcinoma patients. *World J Gastroenterol*. 21(5):1595-605.
85. Mao C, Zhou J, Yang Z, Huang Y, Wu X, Shen H, et al. (2012) KRAS, BRAF and PIK3CA mutations and the loss of PTEN expression in Chinese patients with colorectal cancer. *PLoS One*. 7(5): e36653.
86. Shen H, Yuan Y, Hu HG, Zhong X, Ye XX, Li MD, et al. (2011) Clinical significance of K-ras and BRAF mutations in Chinese colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol*. 17(6):809-16.
87. Naguib A, Mitrou PN, Gay LJ, Cooke JC, Luben RN, Ball RY, et al. (2010) Dietary, lifestyle and clinicopathological factors associated with BRAF and K-ras mutations arising in distinct subsets of colorectal cancers in the EPIC Norfolk study. *BMC Cancer*. 10:99.
88. Zlobec I, Bihl MP, Schwarb H, Terracciano L, Lugli A. (2010) Clinicopathological and protein characterization of BRAF- and K-RAS-mutated colorectal cancer and implications for prognosis. *Int J Cancer*. 127(2):367-80.
89. Shaukat A, Arain M, Thaygarajan B, Bond JH, Sawhney M. (2010) Is BRAF mutation associated with interval colorectal cancers? *Dig Dis Sci*. 55(8):2352-6.
90. Loupakis F, Ruzzo A, Cremolini C, Vincenzi B, Salvatore L, Santini D, et al. (2009) KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 101(4):715-21.
91. Phipps AI, Buchanan DD, Makar KW, Burnett-Hartman AN, Coghill AE, Passarelli MN, et al. (2012) BRAF mutation status and survival after colorectal cancer diagnosis according to patient and tumor characteristics. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 21(10):1792-8.
92. Rozek LS, Herron CM, Greenson JK, Moreno V, Capella G, Rennert G, et al. (2010) Smoking, gender, and ethnicity predict somatic BRAF mutations in colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 19(3):838-43.
93. Sinicrope FA, Shi Q, Smyrk TC, Thibodeau SN, Dienstmann R, Guinney J, et al. (2015) Molecular markers identify subtypes of stage III colon cancer associated with patient outcomes. *Gastroenterology* 148(1):88-99.
94. Thiel A, Ristimaki A. (2013) Toward a molecular classification of colorectal cancer: The role of BRAF. *Front Oncol* 3:281.
95. Wangefjord S, Sundstrom M, Zendeirokh N, Lindquist KE, Nodin B, Jirstrom K, et al. (2013) Sex differences in the prognostic significance of KRAS codons 12 and 13, and BRAF mutations in colorectal cancer: a cohort study. *Biol Sex Differ*. 4(1):17.