



Trabajo Fin de Grado

"Perfil Molecular en Cáncer Colorrectal Esporádico: Análisis de Mutaciones en *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* y su Asociación con Inestabilidad de Microsatélites Mediante Secuenciación de Nueva Generación"

"Molecular Characterization of Sporadic Colorectal Cancer: Association Between *KRAS*, *NRAS*, and *BRAF* Mutations and Microsatellite Instability via Next-Generation Sequencing"

Autor/es

Marta Rada Rodríguez

Director/es

Javier Azúa Romeo

ÍNDICE

<i>Abstract</i>	2
<i>Palabras clave</i>	4
<i>Introducción</i>	4
<i>Material y métodos</i>	6
1. <i>Diseño del estudio</i>	
2. <i>Población y selección de casos</i>	
3. <i>Procedimientos de análisis molecular</i>	
4. <i>Análisis estadístico</i>	
5. <i>Inteligencia Artificial</i>	
<i>Resultados</i>	10
1. <i>Estudio descriptivo</i>	
2. <i>Análisis comparativo</i>	
<i>Asociación entre KRAS y MSI</i>	
<i>Asociación entre NRAS y MSI</i>	
<i>Asociación entre BRAF y MSI</i>	
<i>Discusión</i>	17
<i>Conclusiones</i>	18
<i>Publicación del estudio en el XXXII Congreso de la SEAP-IAP</i>	19
<i>Publicación del artículo en una revista científica</i>	21
<i>Agradecimientos</i>	23
<i>Bibliografía</i>	24

Resumen

La evaluación por secuenciación de nueva generación (NGS) en adenocarcinoma de cáncer colorrectal esporádico (CCRe) es una técnica diagnóstica ambiciosa y que puede plantear desafíos considerables. Las limitaciones en su solicitud afectan los resultados clínicos. **Objetivo.**- Identificar y analizar la frecuencia con la que aparecen mutaciones en genes frecuentes en esta patología, la correlación entre ellos, subrayando la necesidad de un enfoque terapéutico personalizado basado en el perfil molecular del tumor. **Materiales.**- Revisamos retrospectivamente y de manera transversal 648 casos con diagnóstico histológico de adenocarcinoma de colon, de los cuales 166 contaban con estudios moleculares parcialmente, de los que se seleccionaron 42 casos que cumplían con los todos marcadores objeto de esta investigación. Analizamos la frecuencia con la que aparecen mutados los genes *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* y la correlación entre estas mutaciones e inestabilidad de microsatélites (MSI). **Resultados.**- Existe una diferencia estadísticamente significativa entre mutaciones en *KRAS* y estabilidad de microsatélites y ausencia de asociación significativa entre mutaciones de *NRAS* y MSI. Por otro lado, las mutaciones en *BRAF* sí mostraron asociación estadísticamente significativa con MSI ($p<0,05$) siendo la mutación *c.1799T>A, p.(Val600Glu)* la más común. **Conclusiones.**- La mayor eficiencia se alcanza estudiando el panel genético completo de inicio por medio de NGS, ya que ahorra tiempo, consume menos material tisular y el coste económico es menor que el estudio individualizado de cada gen; al mismo tiempo que podemos optimizar la caracterización molecular y guiar estrategias terapéuticas, especialmente en la selección de pacientes candidatos a terapias dirigidas e inmunoterapia. De este modo se obtiene una clasificación eficiente de los tumores en base a *KRAS* y *BRAF* como marcadores prioritarios, y la expresión de los microsatélites.

Abstract

Next-generation sequencing (NGS) in sporadic colorectal adenocarcinoma (CRC) represents an ambitious diagnostic approach that may present significant challenges. Limitations in its clinical implementation can impact patient outcomes. **Objective:** To identify and analyze the frequency of mutations in commonly altered genes in this pathology, as well as their correlation, highlighting the need for a personalized therapeutic approach based on the molecular profile of the tumor. **Materials and Methods:** We conducted a retrospective, cross-sectional review of 648 cases with histological diagnosis of colon adenocarcinoma. Of these, 166 had partial molecular studies, and 42 cases were selected based on the availability of all the molecular markers evaluated in this study. We analyzed the frequency of mutations in *KRAS*, *NRAS*, and *BRAF*, and assessed their association with microsatellite instability (MSI). **Results:** A statistically significant association was observed between *KRAS* mutations and microsatellite stability. No significant association was found between *NRAS* mutations and MSI. Conversely, *BRAF* mutations showed a statistically significant association with MSI ($p < 0.05$), with the *c.1799T>A, p.(Val600Glu)* variant being the most frequent. **Conclusions:** Optimal efficiency is achieved by using NGS to evaluate the complete genetic panel from the outset, as it saves time, requires less tissue, and is more cost-effective than sequential single-gene testing. Additionally, this approach enhances molecular characterization and supports therapeutic decision-

making, particularly in identifying candidates for targeted therapies and immunotherapy. This strategy allows for effective tumor classification based on *KRAS* and *BRAF* as key markers, together with microsatellite expression patterns.

Palabras clave

Cáncer colorrectal esporádico, Adenocarcinoma de colon, Secuenciación de nueva generación (NGS), Inestabilidad de microsatélites (MSI), *KRAS*, *NRAS*, *BRAF V600E*, Perfil molecular tumoral, Terapias dirigidas, Diagnóstico molecular, Biomarcadores tumorales, Indicadores pronóstico.

Introducción

El cáncer colorrectal (CCR) es una de las neoplasias más comunes y la principal causa de muerte por cáncer del aparato digestivo. La mayoría de los CCR se originan por la inactivación del gen *APC*, que es característica de la vía de inestabilidad cromosómica, se define por la pérdida de genes supresores de tumores y la activación de oncogenes, con alteraciones en el material genético. Una vía menos común (10-15%), llamada mutadora o de inestabilidad de microsatélites (MSI), se debe a mutaciones en los genes que codifican las proteínas del mecanismo de reparación del ADN, conocido como mismatch repair (MMR). De esta manera, se generan una gran cantidad de errores genéticos. La mayoría de los CCR hereditarios no polipósicos (CCRHP) y una proporción de los CCR esporádicos (10-15%) presentan el fenómeno molecular de MSI, útil para su detección.^{1,2}

Los casos de CCR con mutaciones en el gen *BRAF* y/o alta inestabilidad de microsatélites (MSI-H) representan subgrupos importantes con características clinicopatológicas y pronósticos distintos.^{3, 4, 5} Aproximadamente el 2%-15% de los CCR presentan mutaciones en el gen *BRAF*, siendo la mutación V600E c.1799T>A, p.(Val600Glu) la más común.^{6, 7} La MSI-H se observa en aproximadamente el 12-15% de todos los CCR y alrededor del 4% de los CCR metastásicos.

Por una parte, la MSI-H por sí sola, se ha vinculado generalmente con un mejor pronóstico, por ser diagnosticado en estadios menos avanzados, así como con una mayor probabilidad de respuesta a tratamiento de inmunoterapia basado en el uso de inhibidores del complejo PD1-PDL1.⁸

Además, la presencia de la mutación *BRAF V600E* se ha relacionado con una mayor frecuencia en tumores localizados en el colon derecho, con peor diferenciación y con el sexo femenino.⁷ La mutación del gen en dicho codón, se ha correlacionado específicamente con la metilación del promotor de gen *MLH1*, un mecanismo común para el desarrollo de MSI-H esporádico.^{9, 10}

El estado de *BRAF* y *MSI* se ha asociado significativamente con el patrón de diseminación metastásica y el pronóstico en pacientes con CCR. Las mutaciones en *BRAF*,

particularmente en tumores con microsatélites estables (MSS), se han asociado con peor pronóstico, incluyendo una menor supervivencia global, supervivencia específica de la enfermedad y supervivencia libre de progresión.¹¹

La evaluación precisa del estado de *BRAF* y MSI es crucial no solo para la estratificación pronóstica, sino también para la toma de decisiones terapéuticas en pacientes con CCR.⁷ Mientras que la presencia de mutaciones *BRAF* puede indicar una menor probabilidad de beneficio de ciertas terapias dirigidas como el cetuximab y el panitumumab, siendo éstas más efectivas si se combinan con anticuerpos monoclonales anti-EFGR (Una combinación de encorafenib, cetuximab y binimetinib resultó en una supervivencia general significativamente más larga y una tasa de respuesta más alta que la terapia estándar en pacientes con cáncer colorrectal metastásico con la mutación *BRAF V600*).¹² De la misma manera, la MSI-H se ha convertido en un nivel a partir del cual la quimioterapia deja de jugar un papel importante. Sobre todo, en la respuesta a los tumores en estadío II y III inestables, que presentan un beneficio reducido de quimioterapia adyuvante con 5-FU.¹³

El estado de MSI se puede determinar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o inmunohistoquímica (IHQ) para las proteínas de reparación del ADN. La detección de mutaciones en el gen *BRAF*, más frecuentemente la mutación *V600E*, se puede realizar mediante secuenciación de genes mediante kits basados en PCR en tiempo real y en menor medida mediante Sanger o IHQ utilizando anticuerpos específicos. La secuenciación de próxima generación (NGS) se ha propuesto como una herramienta integral para el perfil genómico, permitiendo la detección simultánea de mutaciones en múltiples genes, incluyendo *BRAF*, así como la evaluación del estado de MSI y la carga mutacional tumoral (TMB).¹⁴

A pesar de la creciente comprensión del papel de *BRAF* y MSI en el CCR, todavía existen desafíos en la interpretación de sus resultados y en la aplicación clínica óptima de esta información, especialmente en relación con los patrones específicos de metástasis y la respuesta a las diversas modalidades de tratamiento disponibles.

La realización de la técnica de secuenciación de nueva generación (NGS) es de gran importancia para el diagnóstico molecular y tratamiento del CCR, especialmente en casos con MSI o deficiencia en las proteínas de reparación de errores de emparejamiento (dMMR). Los beneficios que brinda realizar la técnica NGS consisten en obtener un análisis completo de todo lo que se necesita para el manejo del CCR. Permite identificar pacientes que tendrán una baja tasa de respuesta a quimioterapia, seleccionar de manera oportuna a los que responderán a inmunoterapia, acceder de forma temprana a terapias dirigidas (aprobadas en estadios avanzados o metastásicos) y mejorar potencialmente el pronóstico general. Al permitir un tratamiento más personalizado y efectivo desde etapas tempranas, la NGS llevada a cabo de inicio tiene el potencial de mejorar el pronóstico general de los pacientes con CCR.^{15, 16}

Material y métodos

1. Diseño del estudio

Se realizó un estudio observacional, retrospectivo y transversal en pacientes diagnosticados de cáncer colorrectal esporádico (CCRe). Se analizaron las mutaciones en los genes *KRAS*, *NRAS* y *BRAF*, así como MSI, mediante secuenciación de nueva generación (NGS). Además, se compararon los resultados de NGS con técnicas convencionales, como la PCR en tiempo real e inmunohistoquímica, de pacientes diagnosticados en España pseudoanónimizados, proporcionados por el laboratorio de anatomía patológica Analiza.

2. Población y selección de casos

Se revisaron retrospectivamente y de manera transversal 648 casos con diagnóstico histológico de adenocarcinoma de colon. De estos, 166 casos contaban con un estudio molecular parcialmente, y 42 casos fueron finalmente incluidos en el análisis ya que incluían los marcadores objeto de la investigación.

Los casos fueron seleccionados en dos fases: inicialmente, se analizaron pacientes diagnosticados entre el 1 de enero de 2024 y el 31 de mayo de 2024, aplicando criterios de inclusión más amplios. Posteriormente, se amplió la búsqueda retrospectiva y hasta la actualidad, considerando pacientes diagnosticados entre el 1 de enero de 2022 y el 5 de febrero de 2025, con criterios de inclusión más estrictos para obtener un grupo más homogéneo con los estudios moleculares completos requeridos.

Criterios de inclusión:

- Pacientes con diagnóstico histopatológico confirmado de CCRe.
- Disponibilidad de datos de secuenciación completa para *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* e MSI.
- Muestra tumoral suficiente para análisis molecular.

Criterios de exclusión:

- Casos con carcinoma colorrectal hereditario no polipósico o síndrome de Lynch en el momento del diagnóstico.
- Pacientes sin información completa sobre los genes estudiados o el estado de MSI.
- Muestras insuficientes o degradadas para análisis molecular.

3. Procedimientos de análisis molecular

3.1 Extracción de ADN

El ADN tumoral fue extraído de muestras de tejido fijadas en formalina e incluidas en parafina (FFPE) utilizando kits comerciales estandarizados (Kit de extracción QIAamp

DSP FFPE Tissue Qiagen). La concentración y pureza del ADN fueron evaluadas mediante fluorometría.

3.2 Secuenciación de Nueva Generación (NGS) con el panel Action OncokitDx ®

El panel Action OncoKitDx (Grupo Health in Code, España) está diseñado para el análisis de alteraciones genéticas en 59 genes relevantes para el desarrollo de tumores sólidos. Las alteraciones cubiertas incluyen mutaciones puntuales (sustituciones, delecciones o inserciones), alteraciones en el número de copias y reordenamientos, y tienen relevancia diagnóstica y pronóstica, además de ser accionables desde un punto de vista terapéutico por representar dianas terapéuticas y/o marcadores predictivos de fármacos dirigidos aprobados o en desarrollo clínico. Además, integra el análisis de inestabilidad de microsatélites, con potencial valor predictivo en el contexto de la inmunoterapia, y estudios farmacogenéticos mediante el análisis de variantes relacionadas con la toxicidad o eficacia de los principales tratamientos de quimioterapia.

- El panel Action OncoKitDx permite la secuenciación de las regiones exónicas completas de los genes *KRAS*, *NRAS* y *BRAF*. El análisis de MSI se realiza mediante un panel de 110 regiones microsatélites. Se requiere que al menos 99 de los 110 marcadores analizados sean valorables y la clasificación se realiza en función del porcentaje de marcadores que muestran inestabilidad según se especifica a continuación: alta inestabilidad de microsatélites (31-100%, MSI-H), baja inestabilidad de microsatélites (21-30%, MSI-L), microsatélites estables (0-17%, MSS) y resultados no concluyentes (18-20%).
- La preparación del panel Action OncoKitDx se realiza de forma automatizada con el robot Magnis Dx NGS Prep System (Agilent). Tras la extracción de ADN a partir de la muestra remitida, se procede a su fragmentación enzimática y posterior enriquecimiento de las regiones de interés mediante hibridación con sondas de captura y el empleo de la tecnología SureSelectXT HS según las recomendaciones del fabricante. La secuenciación masiva de alto rendimiento se realiza en la plataforma NextSeq 550 (Illumina, San Diego, CA, US) mediante síntesis por terminación reversible cíclica (paired-end, 2x75pb), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este análisis permite la detección de mutaciones puntuales (sustituciones, delecciones o inserciones) así como de grandes alteraciones de secuencia en los genes seleccionados.
- El análisis bioinformático de los resultados se lleva a cabo mediante una pipeline de análisis específicamente diseñada a través de la plataforma Data Genomics (www.datagenomics.es). El análisis bioinformático incluye el alineamiento de las secuencias obtenidas con la secuencia de referencia (GRCh37/hg19) para el gen y regiones diana tras filtrado según criterios de calidad, y la identificación de variantes. La nomenclatura de las mutaciones y variantes identificadas se ajusta a las recomendaciones de Human Genome Variation Society (HGVS; www.hgvs.org).
- La validación analítica y la utilidad clínica del panel Action OncoKitDx han sido establecidas (Martínez-Fernández et al. J Pers Med 2021; 11: 360. doi: 10.3390/jpm11050360). Tanto en panel como el programa de análisis Data Genomics cuentan con marcado de diagnóstico in vitro (CE-IVD).

- Según especificaciones del fabricante, el panel Action OncoKitDx puede detectar alteraciones genéticas (por ej. mutaciones y/o variantes estructurales) presentes en el tumor con una frecuencia alélica del 5%. La detección de alteraciones puede verse comprometida cuando la profundidad de lectura de la secuenciación es menor de 200 lecturas (200x). El porcentaje de celularidad tumoral requerido para alcanzar ese límite de detección es de al menos 30%. Para alcanzar ese límite de detección se recomienda que el porcentaje de celularidad tumoral sea mayor del 30%, una cantidad de ADN de partida recomendada de entre 50-200ng y una calidad del DNA estimada en un valor DIN (DNA Integrity Number) >3. Para la interpretación de la inestabilidad de microsatélites mediante el panel Action OncoKitDx se recomienda un porcentaje de celularidad tumoral mínimo del 30%. Según especificaciones del fabricante, el análisis de muestras con menor porcentaje de celularidad tumoral y/o ADN de una concentración o calidad menores de las indicadas es posible, aunque la especificidad y sensibilidad del análisis se ven reducidas.

3.3 Determinación de Inestabilidad de Microsatélites

El estado de MSI se evaluó mediante dos técnicas:

- **NGS**, utilizando paneles específicos que incluyen loci de microsatélites ya nombrado en el apartado anterior.
- **Inmunohistoquímica (IHQ)**, analizando la expresión de las proteínas del sistema de reparación de ADN o MMR compuesto por 4 proteínas (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2).

3.4 Criterios de interpretación de la expresión por inmunohistoquímica de proteínas del sistema MMR

En la Figura 1 se muestra un ejemplo representativo de la expresión inmunohistoquímica de las proteínas MMR en uno de los tumores analizados. Se observa pérdida de expresión nuclear de PMS2 y MLH1 (imágenes A y B), con conservación de la expresión de MSH2 y MSH6 (imágenes C y D), lo que indica un fenotipo deficiente de reparación de MMR (dMMR). Este patrón sugiere una probable inactivación de MLH1, secundaria a hipermetilación de su región promotora o a mutaciones en el gen.

La pérdida simultánea de MLH1 y PMS2 suele deberse a la inactivación de MLH1, ya que PMS2 depende funcionalmente de él para su estabilidad y expresión, fenómeno común en tumores esporádicos con MSI sin mutación en *BRAF*. En cambio, la pérdida aislada de PMS2 podría ser indicativa de síndrome de Lynch.

Las imágenes A y B evidencian la ausencia de tinción nuclear para PMS2 y MLH1 en las células tumorales, mientras que las imágenes C y D muestran una tinción nuclear intensa de MSH2 y MSH6, compatible con una expresión mantenida.

La evaluación inmunohistoquímica de las proteínas del sistema de reparación de errores de apareamiento (MMR) en muestras tumorales de cáncer colorrectal esporádico constituye una herramienta diagnóstica fundamental.

Estos resultados ilustran la utilidad de la inmunohistoquímica como herramienta diagnóstica para detectar defectos en el sistema MMR, con implicaciones clínicas tanto en el pronóstico como en la indicación de terapias dirigidas.

La presencia de tinción nuclear en las células tumorales se interpretó como expresión positiva del marcador correspondiente. Se consideró que los casos con expresión preservada de las cuatro proteínas analizadas presentaban un sistema de reparación de errores de apareamiento competente (pMMR), mientras que la pérdida de expresión de al menos una de ellas se clasificó como deficiencia del sistema MMR (dMMR).

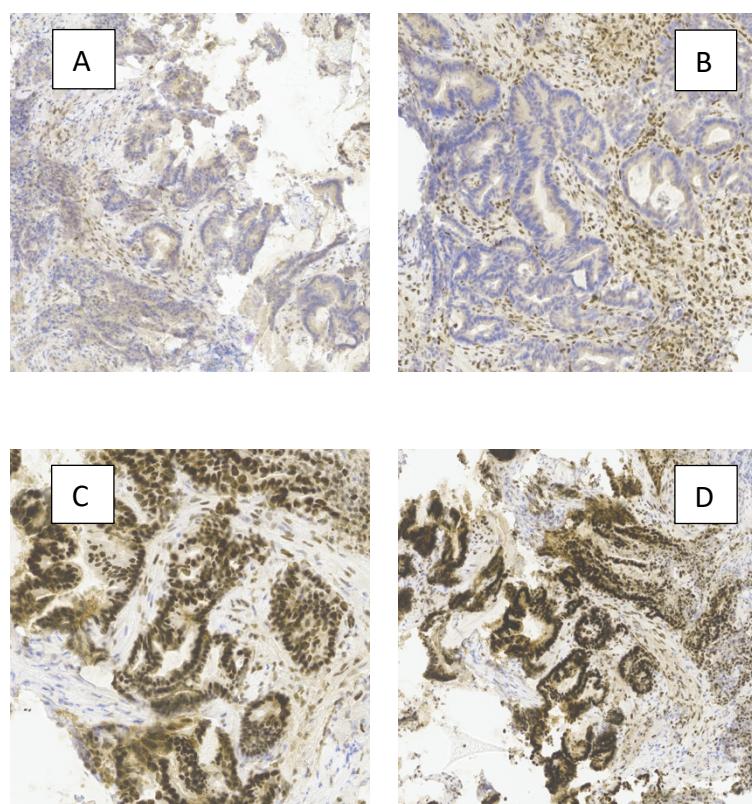


Figura 1. Expresión inmunohistoquímica de proteínas del sistema de reparación de errores de apareamiento (MMR) en tejido tumoral de pacientes con cáncer colorrectal esporádico. A: Pérdida de expresión nuclear de PMS2 con conservación de tinción en células normales adyacentes. B: Pérdida de expresión nuclear de MLH1 con tinción positiva en células no tumorales (control interno); C: Expresión nuclear positiva de MSH2; D: Expresión nuclear positiva de MSH6.

La tinción marrón-amarilla indica positividad inmunohistoquímica. Observación realizada mediante microscopía óptica (aumento 10x).

3.5 PCR en tiempo real: Idylla *KRAS* mutation test e Idylla *NRAS-BRAF* mutation test

El análisis de mutaciones en el gen *KRAS* se realizó con el Kit Idylla *KRAS* mutation test y la plataforma Idylla de Biocartis. Se trata de una prueba de diagnóstico in vitro que permite la detección cualitativa de 21 mutaciones en los codones 12, 13, 59, 61, 117 y

146 del gen *KRAS* mediante un proceso automatizado que integra la amplificación de las regiones diana y su detección mediante PCR en tiempo real.

El análisis de mutaciones en los genes *NRAS* y *BRAF* se realizó con el Kit Idylla *NRAS-BRAF* se mutation test y la plataforma Idylla de Biocartis. Se trata de una prueba de diagnóstico in vitro que permite la detección cualitativa de 18 mutaciones en los codones 12, 13, 59, 61, 117 y 146 del gen *NRAS*, y de 5 mutaciones en el codón 600 del gen *BRAF* mediante un proceso automatizado que integra la amplificación de las regiones diana y su detección mediante PCR en tiempo real.

4. Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de la frecuencia de mutaciones en *KRAS*, *NRAS* y *BRAF*, así como de la presencia de MSI. Para evaluar asociaciones entre mutaciones e MSI, se utilizaron:

- Prueba de chi cuadrado (χ^2) y test exacto de Fisher, según la distribución de los datos.
- Cálculo de odds ratio (OR) e intervalos de confianza del 95% (IC 95%).
- Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$.

El análisis de datos se llevó a cabo con el software Jamovi.

5. Inteligencia Artificial

Con el objetivo de optimizar la presentación de los resultados, se emplearon herramientas de inteligencia artificial (ChatGPT, OpenAI) para estructurar una tabla que representara de manera clara y precisa los hallazgos del análisis descriptivo previamente realizado por la autora. Asimismo, dichas herramientas fueron utilizadas como apoyo en la interpretación y síntesis de los resultados obtenidos en el análisis comparativo, una vez completado el tratamiento estadístico de los datos.

Resultados

1. Análisis descriptivo

El análisis descriptivo $n=166$ (Figura 2) de la frecuencia mutacional en el cáncer colorrectal esporádico explora las distintas implicaciones pronósticas en las mutaciones de *KRAS* y la mutación *BRAF V600E*. Se excluyeron los pacientes con cáncer de colon hereditario no polipósico, Síndrome de Lynch, o aquellos con cáncer rectal inferior o medio. Se analizó la frecuencia de mutaciones en los casos que contaban con el estudio molecular parcialmente. Fueron más pacientes los que contaban con el análisis individual de MSI que del resto de marcadores, seguido por *KRAS*.

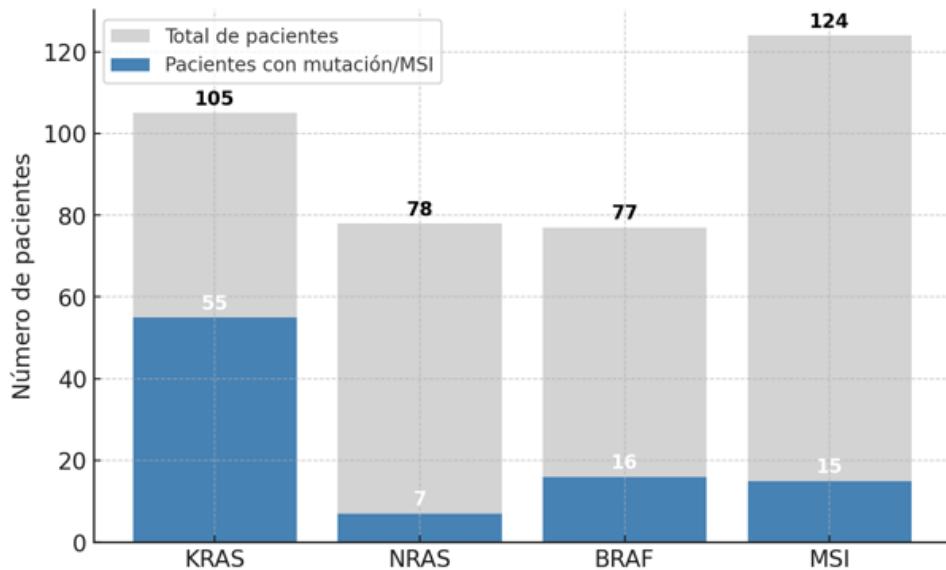


Figura 2. Prevalencia de mutaciones en *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* e Inestabilidad de microsatélites

Se llevó a cabo el estudio estadístico descriptivo en los 166 tumores de CCR, donde se observó una alta prevalencia de la mutación en *KRAS* (52.4%), lo que refuerza su relevancia en la tumorogénesis del cáncer colorrectal y su implicación en la resistencia a tratamientos anti-EGFR (Tabla 1). El gen *NRAS* obtuvo una baja tasa de mutación (8.9%), en comparación con *KRAS* (Tabla 2). El 22.1% de los casos eran mutantes *BRAF* (Tabla 3). En relación con MSI, el 12.1% de los casos eran tumores inestables (Tabla 4). Los pacientes con MSI pueden beneficiarse de inmunoterapia, por lo que su identificación es clave.

Tabla 1. Observación del estado del gen *KRAS*

<i>KRAS</i>	Frecuencias	% del Total
No mutado	50	47.6%
Mutado	55	52.4%

Tabla 2. Observación del estado del gen *NRAS*

<i>NRAS</i>	Frecuencias	% del Total
No mutado	71	91.0%
Mutado	7	9.0%

Tabla 3. Observación del estado del gen *BRAF*

<i>BRAF</i>	Frecuencias	% del Total
No mutado	60	77.9%
Mutado	17	22.1%

Tabla 4. Observación del estado de estabilidad de microsatélites.

MICROSATÉLITES	Frecuencias	% del Total
Estable	109	87.9%
Inestable	15	12.1%

2. Análisis comparativo

Sin embargo, el estudio comparativo se llevó a cabo en aquellos pacientes que cumplían con todos los criterios de inclusión y, se estudió la asociación entre cada uno de los genes con la alteración o no del sistema de reparación de microsatélites.

2.1 Asociación entre *KRAS* y MSI

En primer lugar, se estudió la asociación entre la mutación en *KRAS* y la MSI, encontrando las siguientes características (Figura 3).

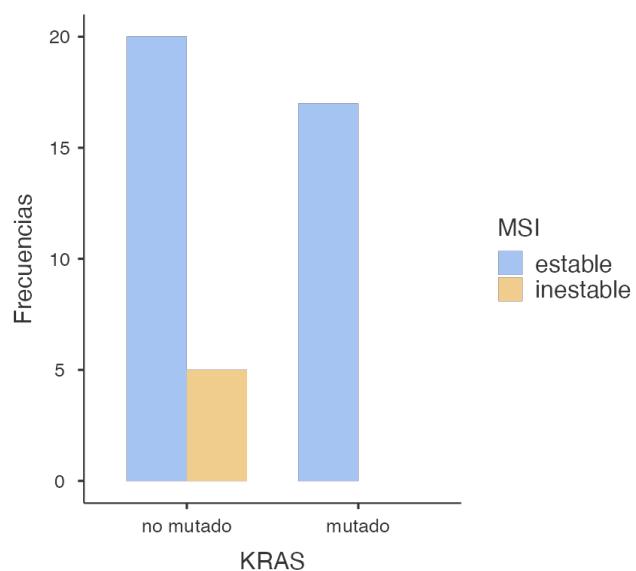


Figura 3. Frecuencia de mutación en el gen *KRAS* asociado o no a inestabilidad de microsatélites. En ningún caso *KRAS* mutado existe MSI.

El análisis estadístico llevado a cabo (Tabla 5) reveló una asociación significativa entre la mutación en el gen *KRAS* y la estabilidad de microsatélites, con un valor de $p = 0.049$ en

la prueba de chi cuadrado, lo que indica que los tumores con mutación en *KRAS* tienen menos probabilidades de presentar MSI. No obstante, al aplicar el test exacto de Fisher, más apropiado en tablas con frecuencias pequeñas, se obtuvo un valor de $p = 0.070$, que, aunque cercano al umbral de significación, no permite afirmar una asociación estadísticamente significativa, por lo que no puede descartarse que la relación observada sea fruto del azar (Tabla 6). En cuanto al análisis del Odds Ratio, se obtuvo un OR de 0.106 (IC 95%: 0.00549 – 2.06), lo que sugiere que la mutación en *KRAS* se asocia a una menor probabilidad de MSI; sin embargo, el amplio intervalo de confianza que incluye el valor 1 indica que esta asociación no es concluyente y podría tratarse de un hallazgo casual (Tabla 7).

Tabla 5. Tabla de Contingencia

<i>KRAS</i>	MSI		Total
	estable	inestable	
No mutado	20	5	25
Mutado	17	0	17
Total	37	5	42

Tabla 6. Pruebas de χ^2

	Valor	gl	p
χ^2	3.86	1	0.049
Test exacto de Fisher			0.070
N	42		

Tabla 7. Medidas Comparativas

	Intervalos de Confianza al 95%		
	Valor	Inferior	Superior
Odds ratio	0.106 ^a	0.00549	2.06
Riesgo relativo	0.800 ^b	0.658	0.973

^a Se aplicó la corrección Haldane-Anscombe

^b Se comparan filas

2.2 Asociación entre *NRAS* y MSI

Para estudiar la asociación entre el gen *NRAS* y el sistema de reparación de microsatélites se empleó el mismo estudio estadístico, obteniendo los siguientes resultados (Figura 4).

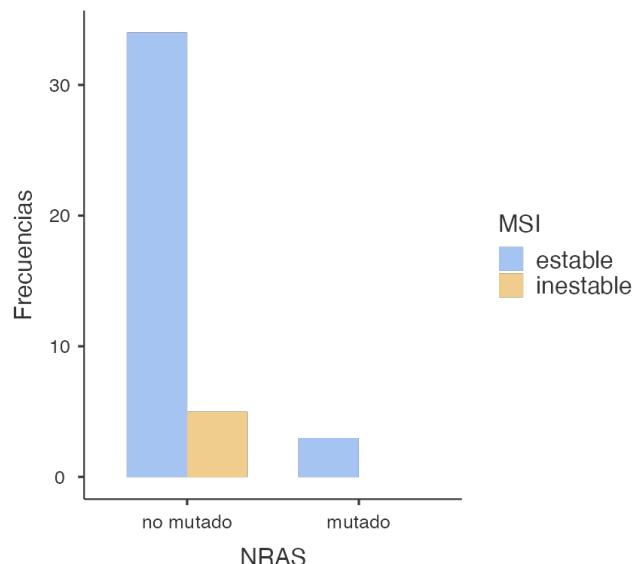


Figura 4. Frecuencia de mutación en el gen *NRAS* asociado o no a inestabilidad de microsatélites. En ningún caso *NRAS* mutado existe MSI.

Los resultados obtenidos en el análisis de la asociación entre la mutación en *NRAS* y la estabilidad de microsatélites (Tabla 8) no revelan significación estadística, ya que el valor de *p* en la prueba de chi cuadrado fue de 0.509, muy por encima del umbral convencional de 0.05, lo que impide rechazar la hipótesis nula. Esta hipótesis plantea que no existe asociación entre la presencia o ausencia de mutaciones en el gen *NRAS* y el estado de los microsatélites, frente a la hipótesis alternativa que sí plantea dicha asociación. En consonancia con este resultado, el test exacto de Fisher arrojó un valor de *p* = 1.000, lo cual refuerza la conclusión de que no hay una relación estadísticamente significativa entre la mutación en *NRAS* y la inestabilidad de microsatélites (Tabla 9). Además, el análisis del Odds Ratio mostró un valor de OR = 0.896 (IC 95%: 0.0405 – 19.8), es decir, un valor muy próximo a 1, lo que sugiere que la mutación en *NRAS* no tiene un impacto relevante en la probabilidad de MSI, aunque el intervalo de confianza tan amplio y que incluye el 1 limita la interpretación de una posible asociación (Tabla 10).

Tabla 8. Tablas de Contingencia

NRAS	MSI		Total
	estable	inestable	
No mutado	34	5	39
Mutado	3	0	3
Total	37	5	42

Tabla 9. Pruebas de χ^2

	Valor	gl	p
χ^2	0.437	1	0.509
Test exacto de Fisher			1.000
N			42

Tabla 10. Medidas Comparativas

	Intervalos de Confianza al 95%		
	Valor	Inferior	Superior
Odds ratio	0.896 ^a	0.0405	19.8
Riesgo relativo	0.872 ^b	0.773	0.983

^a Se aplicó la corrección Haldane-Anscombe

^b Se comparan filas

2.3 Asociación entre *BRAF* y MSI

Finalmente, se estudió la asociación entre la presencia de la mutación en el gen *BRAF* e inestabilidad de microsatélites. La prueba estadística reveló los siguientes datos (Tabla 11 y Figura 5).

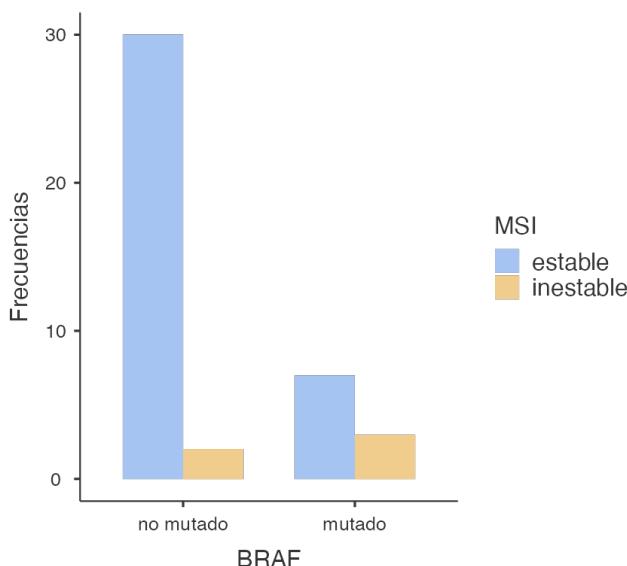


Figura 5. Frecuencia de mutación en el gen *BRAF* asociado o no a inestabilidad de microsatélites. Sí se encontraron casos de *BRAF* mutado con inestabilidad de microsatélites.

El análisis de la asociación entre la mutación en el gen *BRAF* y la MSI (Tabla 11), mostró un resultado estadísticamente significativo en la prueba de chi cuadrado ($p = 0.043$), lo

que indica que la presencia de mutación en *BRAF* se asocia de forma significativa con un mayor riesgo de presentar MSI. Este hallazgo sugiere que los pacientes portadores de la mutación tienen más probabilidades de mostrar inestabilidad en los microsatélites que aquellos sin la mutación. No obstante, al aplicar el test exacto de Fisher, se obtuvo un valor de $p = 0.078$, que, si bien se encuentra por debajo del umbral de 0.1, no alcanza el nivel de significación estadística convencional ($p < 0.05$) (Tabla 12). En cuanto al análisis del Odds Ratio, se observó un OR de 6.43 (IC 95%: 0.897 – 46.1), lo que sugiere una fuerte asociación entre la mutación en *BRAF* y la presencia de MSI. Sin embargo, el intervalo de confianza es amplio y cruza el valor 1, lo que indica una alta incertidumbre en la estimación y limita la solidez de la conclusión. A pesar de ello, el valor elevado del OR apunta a una tendencia relevante que podría confirmarse en estudios con un mayor tamaño muestral (Tabla 13).

Tabla 11. Tablas de Contingencia

<i>BRAF</i>	MSI		
	estable	inestable	Total
No mutado	30	2	32
Mutado	7	3	10
Total	37	5	42

Tabla 12. Pruebas de χ^2

	Valor	gl	p
χ^2	4.10	1	0.043
Test exacto de Fisher			0.078
N	42		

Tabla 13. Medidas Comparativas

	Intervalos de Confianza al 95%		
	Valor	Inferior	Superior
Odds ratio	6.43	0.897	46.1
Riesgo relativo	1.34 ^a	0.884	2.03

^a Se comparan filas

Discusión

Nuestros hallazgos respaldan el papel de *KRAS* como la mutación más prevalente en CCRe, asociada a tumores estables; mientras que los tumores *BRAF* mutado muestran una mayor frecuencia de MSI, alineándose con su relevancia clínica. La baja frecuencia mutaciones en *NRAS* coincide con estudios previos y no muestra una relación con MSI.

Las principales observaciones incluyen una elevada frecuencia de mutación en *KRAS* (52.4%) y una proporción considerable de mutaciones *BRAF V600E* (20.8%), mientras que *NRAS* mostró una baja tasa de mutación (8.9%), en línea con lo previamente descrito en la literatura. Además, se identificó MSI en el 12.1% de los casos, porcentaje acorde con lo esperado en el contexto del cáncer colorrectal esporádico.

Desde el punto de vista estadístico, se observó una asociación significativa entre la mutación en *KRAS* y la estabilidad de microsatélites ($p = 0.049$), lo que sugiere que los tumores *KRAS* mutados tienden a presentar un sistema MMR funcional. Este resultado es coherente con estudios previos que han asociado mutaciones en *KRAS* con tumores MSS y un perfil molecular distinto al del fenotipo MSI. En contraposición, se identificó una asociación significativa entre la mutación *BRAF V600E* y la inestabilidad de microsatélites ($p = 0.043$), reforzando su valor como marcador molecular característico de este subtipo tumoral. No obstante, el tamaño muestral limitado y los intervalos de confianza amplios —como el OR de 6.43 (IC 95%: 0.897–46.1)— sugieren que estos resultados deben interpretarse con cautela y corroborarse en estudios con mayor poder estadístico. Por otro lado, no se evidenció una asociación significativa entre la mutación en *NRAS* y el estado de los microsatélites ($p = 0.509$). El OR cercano a 1 (0.896) y el intervalo de confianza amplio que cruza el valor nulo indican que la mutación en *NRAS* probablemente no desempeña un papel relevante en la inestabilidad genómica de estos tumores.

Estos hallazgos son consistentes con los resultados reportados por Ye et al. (2015), quienes describieron una mayor prevalencia de mutaciones en *KRAS* en tumores MSS, apoyando la hipótesis de que *KRAS* se asocia a un sistema MMR funcional. Además, la baja frecuencia de mutaciones en *NRAS* en nuestra cohorte concuerda con lo observado en dicho estudio, reforzando la idea de un papel más limitado de este gen en la carcinogénesis del cáncer colorrectal esporádico. La asociación entre la mutación *BRAF V600E* y el fenotipo MSI ha sido ampliamente descrita en la literatura. En particular, los estudios de Birgisson et al. (2015) y Fan et al. (2021) reportaron una fuerte asociación entre esta mutación y tumores con MSI, lo cual se refleja en nuestros resultados. De forma complementaria, Rasuck et al. (2012) resaltaron el papel del *BRAF V600E* en contextos de inestabilidad genómica y alteraciones epigenéticas del sistema MMR, subrayando su relevancia como biomarcador molecular y pronóstico.

Pese a la relevancia clínica y biológica de estos resultados, el estudio presenta algunas limitaciones que deben ser tenidas en cuenta. En primer lugar, el tamaño muestral reducido, especialmente en el subgrupo con información completa de mutaciones y estado MSI ($n = 42$), limita la potencia estadística de las pruebas empleadas y puede condicionar la robustez de las asociaciones detectadas. Esto se refleja en los resultados

del test exacto de Fisher y en los intervalos de confianza amplios obtenidos, que reflejan una alta variabilidad en las estimaciones.

Asimismo, el diseño retrospectivo y unicéntrico del estudio podría introducir sesgos de selección. La falta de información clínica detallada en algunos casos —como estadio tumoral, localización anatómica específica o tratamiento recibido— impide una caracterización más completa de los pacientes y dificulta el análisis de posibles correlaciones entre el perfil molecular y el comportamiento clínico.

Según nuestro modelo de decisión para el estudio molecular de genes, la técnica de NGS se impuso frente a técnicas de análisis individual (PCR en tiempo real e inmunohistoquímica). La inclusión de otros biomarcadores relevantes como *PIK3CA*, *NTRK* o alteraciones epigenéticas del sistema MMR podría contribuir a definir con mayor precisión los perfiles moleculares asociados a la estabilidad genómica y su impacto clínico en 42 casos (Figura 6).

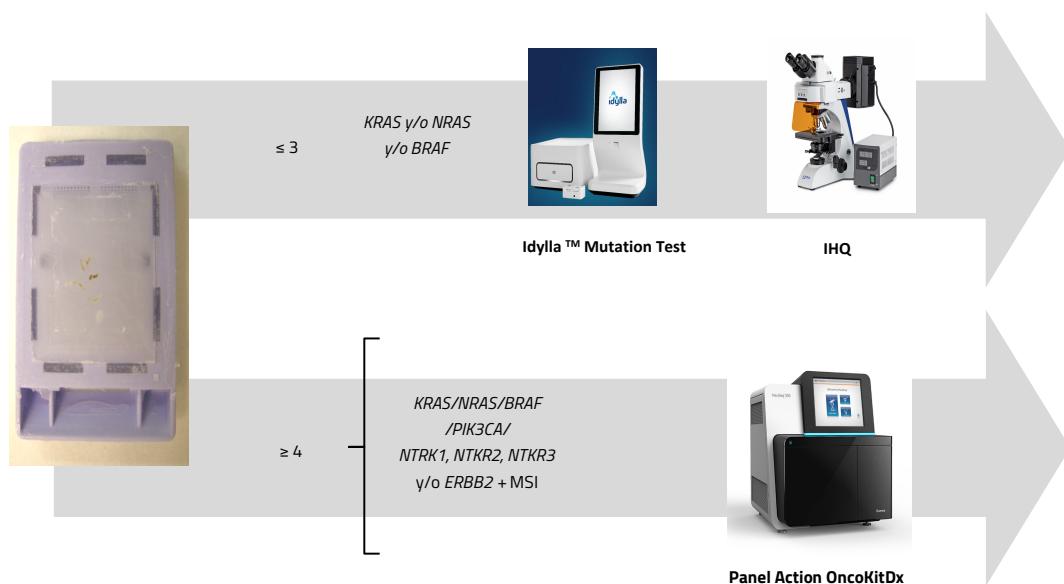


Figura 6. Estudio de alteraciones genéticas y búsqueda hallazgos moleculares comparando las dos vías diagnósticas más utilizadas. Fila superior: El estudio de 3 genes o menos, llevado a cabo mediante Idylla™ Mutation Test y posterior estudio del sistema MMR mediante inmunohistoquímica (IHQ). Fila inferior: El estudio de al menos 4 genes con el estudio del sistema MMR mediante NGS.

Conclusiones

Es fundamental que futuras investigaciones amplíen la cohorte de pacientes con un diseño prospectivo y multicéntrico que integre variables clínicas, moleculares y evolutivas. De esta manera, la validación de estos hallazgos en diferentes poblaciones permitiría mejorar la generalización y aplicabilidad de los resultados, sentando las bases para una medicina más personalizada en el abordaje del cáncer colorrectal esporádico.

De nuestros resultados podemos extraer que la mayor eficiencia se alcanza estudiando el panel genético completo de inicio por medio de NGS, ya que ahorra tiempo, consume menos material tisular y el coste económico es menor que el estudio individualizado de cada gen; al mismo tiempo que podemos optimizar la caracterización molecular y guiar estrategias terapéuticas, especialmente en la selección de pacientes candidatos a terapias dirigidas e inmunoterapia. De este modo se obtiene una clasificación eficiente de los tumores en base a *KRAS* y *BRAF* como marcadores prioritarios, y la expresión de los microsatélites, optimizando recursos y tiempos en el diagnóstico molecular del CCR. Únicamente en aquellas situaciones en las que no se pueda realizar NGS de inicio, recomendamos, en base a nuestro estudio, iniciar el análisis individual de *KRAS*, y en caso de no expresión, continuar el estudio con *BRAF* e MSI.

Publicación del estudio en el XXXII Congreso de la SEAP-IAP

Como parte de la difusión científica de este trabajo, se presentó un póster representativo en el XXXII Congreso Nacional de Anatomía Patológica SEAP-IAP, celebrado en San Sebastián, los días 21, 22 y 23 de mayo de 2025. Esta participación permitió exponer de forma presencial nuestros resultados y conclusiones ante la comunidad científica, contribuyendo así al conocimiento actual sobre el cáncer colorrectal esporádico y fomentando el intercambio de experiencias e información en el ámbito de la anatomía patológica.

Publicación del artículo en una revista científica

Con el objetivo de cumplir con la finalidad de este trabajo, se procedió al envío del artículo a una revista científica especializada, *Cancers*. Para ello, se adaptó el manuscrito a las normas editoriales y requisitos específicos establecidos por la revista, utilizando la plantilla oficial proporcionada para la presentación del trabajo. Esta acción forma parte del proceso de difusión científica y busca contribuir al conocimiento en el ámbito del cáncer colorrectal esporádico.

Actualmente, el artículo se encuentra en fase de prepublicación en la plataforma Preprints.org, lo que implica que ha sido correctamente enviado y aceptado para su difusión inicial, aunque aún está pendiente de revisión por parte del comité editorial de la revista para su posible publicación definitiva. Tal como se indica en el correo de confirmación recibido (ver Anexo), el manuscrito ha superado la fase de envío y será sometido a una revisión interna rápida antes de estar disponible públicamente en un plazo aproximado de 24 horas laborables. Esta fase permite visibilizar el trabajo ante la comunidad científica mientras se completa el proceso formal de evaluación por pares.

Dear authors,

You successfully submitted a paper to *Cancers*, and selected the option to make the preprint of your manuscript available online immediately at Preprints.org (<http://www.preprints.org>), ahead of peer review and formal publication in the journal:

Preprints ID: preprints-160266
Type: Article
Title: Molecular Characterization of Sporadic Colorectal Cancer: Association Between KRAS, NRAS, and BRAF Mutations and Microsatellite Instability via Next-Generation Sequencing
Authors: Marta Rada-Rodríguez, Bárbara Angulo-Biedma, Irene Rodríguez Pérez, Javier Azua-Romeo
Emails: radarodriguezmarta@gmail.com, bangulo@analizalab.com, irodriguez@analizalab.com, jazua@analizalab.com
Submission received: 2025-05-20

Your preprint will undergo a swift internal check and should be available online within the next 24 hours during the working day. Papers posted on Preprints.org can be updated or re-submitted as a follow-up version at any time prior to acceptance by a journal. Detailed instructions on how to submit a revised version of your preprint can be found at <https://www.preprints.org/faq#HowcanIsubmitarevisedversionofmypreprint>

Once the peer-reviewed version of your manuscript is published, it will automatically be linked with your preprint on Preprints.org. This ensures that there is a valuable record of your research and provides readers with easy access to the final published version.

For more information on the policies and process of Preprints.org, please visit: <https://www.preprints.org/about#HowItWorks>

Thank you for choosing Preprints.org as a platform for sharing your research. If you have any questions or concerns, please contact us at info@preprints.org.

Kind Regards,

Anexo. Correo electrónico recibido tras enviar el manuscrito a la revista *Cancers*.

article

Molecular Characterization of Sporadic Colorectal Cancer: Association Between *KRAS*, *NRAS*, and *BRAF* Mutations and Microsatellite Instability via Next-Generation Sequencing

Marta Rada Rodríguez¹, Bárbara Angulo Biedma, Irene Rodríguez Pérez and Javier Azúa Romeo^{2*}

¹ Affiliation 1; radarodriguezmarta@gmail.com

² Affiliation 2; jazua@analizalab.com

* Correspondence: jazua@analizalab.com

Simple Summary: Next-generation sequencing (NGS) in sporadic colorectal adenocarcinoma (CRC) represents an ambitious diagnostic approach that may pose considerable challenges. There are limitations regarding the indication and availability of this technique, which may indirectly influence the outcome of the underlying disease. The objective of the study is to identify and analyze the frequency of mutations in commonly altered genes in this pathology, assess their correlation, and highlight the need for a personalized therapeutic approach based on the molecular profile of the tumor. Additionally, we evaluated the importance of early genomic analysis using NGS in comparison to other techniques (real-time PCR and immunohistochemistry), aiming to optimize diagnosis in terms of turnaround time, tissue preservation, and cost-effectiveness. Our findings reinforce the role of *KRAS* as the most prevalent mutation, typically associated with microsatellite-stable tumors, whereas mutated *BRAF* is more frequently associated with MSI.

Abstract: We retrospectively and cross-sectionally reviewed 648 cases with histological diagnosis of colon adenocarcinoma. Of these, 166 had partial molecular studies, and 42 cases were selected based on the availability of the genetic markers targeted in this study. We analyzed the frequency of mutations in these genes, as well as their correlation with microsatellite instability (MSI). A high mutation rate was found in *KRAS* (52.4%). *NRAS* mutations were less frequent (8.9%), whereas *BRAF* mutations were observed in 20.8% of cases. This finding identifies a patient subgroup with MSI, present in 12.1% of cases. Among the 42 patients analyzed for *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, and MSI, a significant association was observed between *KRAS* mutations and microsatellite stability, while no association was found between *NRAS* mutations and MSI. As expected, *BRAF* mutations showed a statistically significant association with MSI ($p < 0.05$), with the most common mutation being *c.1799T>A, p(Val600Glu)*. Comprehensive NGS profiling from the start improves diagnostic efficiency by saving time, tissue, and costs compared to gene-by-gene analysis. At the same time, it enables better molecular characterization and facilitates tailored therapeutic strategies, particularly in identifying candidates for targeted therapy and immunotherapy. This approach supports an efficient classification of tumors based on *KRAS* and *BRAF* as key markers, along with MSI status. If initial NGS is not feasible, start with *KRAS* analysis, then test *BRAF* and MSI if no mutation is found.

Academic Editor: Marta Rada Rodríguez

Received: date

Revised: date

Accepted: date

Published: date

Citation: To be added by editorial staff during production.

Copyright: © 2025 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Keywords: Sporadic colorectal cancer; *KRAS*; *NRAS*; *BRAF*; microsatellite instability; mismatch repair system; next-generation sequencing; molecular profiling; genetic mutations; biomarker; precision oncology

1. Introduction

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common malignancies and the leading cause of cancer-related death in the digestive system. Most CRCs arise through the

12. Kopetz S, Grothey A, Yaeger R, Van Cutsem E, Desai J, Yoshino T, et al. Encorafenib, Binimetinib, and Cetuximab in BRAF V600E-Mutated Colorectal Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2019 Oct 24;381(17):1632–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31566309>
13. Ye JX, Liu Y, Qin Y, Zhong HH, Yi WN, Shi XY. KRAS and BRAF gene mutations and DNA mismatch repair status in Chinese colorectal carcinoma patients. *World J Gastroenterol*. 2015;21(5):1595–605.
14. Rencuzogullari A, Bisgin A, Erdogan KE, Gumus S, Yalav O, Boga I, et al. Site specific genetic differences in colorectal cancer via Next-Generation-Sequencing using a multigene panel. *Ann Ital Chir* [Internet]. 2023;94:605–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/38131395>
15. Ashish S, Raj M. Importance of Early Next-Generation Sequencing in Microsatellite Unstable Colon Cancer With a High Tumor Mutation Burden. *Cureus*. 2022;2022(3):4–8.
16. Hernando-Calvo A, Nguyen P, Bedard PL, Chan KKW, Saleh RR, Weymann D, et al. Impact on costs and outcomes of multi-gene panel testing for advanced solid malignancies: a cost-consequence analysis using linked administrative data. *eClinicalMedicine*. 2024;69:1–12.

Agradecimientos

Agradezco profundamente la guía y el acompañamiento de mi tutor, el Dr. Javier Azúa Romeo, cuya experiencia y dedicación han sido fundamentales para el desarrollo de este trabajo. También deseo expresar mi gratitud al equipo del laboratorio Analiza, por su colaboración y apoyo en los procedimientos de análisis molecular y la interpretación de los datos. Finalmente, agradezco a mi madre, a mi hermano y a mis amigas por su apoyo emocional y motivación a lo largo de todo el proceso.

Bibliografía

1. Keshinro A, Ganesh K, Vanderbilt C, Firat C, Kim JK, Chen CT, et al. Characteristics of Mismatch Repair-Deficient Colon Cancer in Relation to Mismatch Repair Protein Loss, Hypermethylation Silencing, and Constitutional and Biallelic Somatic Mismatch Repair Gene Pathogenic Variants. *Dis Colon Rectum.* 2023;66(4):549–58.
2. Orlandi E, Giuffrida M, Trubini S, Luzietti E, Ambroggi M, Anselmi E, et al. Unraveling the Interplay of KRAS, NRAS, BRAF, and Micro-Satellite Instability in Non-Metastatic Colon Cancer: A Systematic Review. *Diagnostics.* 2024;14(10).
3. Lochhead P, Kuchiba A, Imamura Y, Liao X, Yamauchi M, Nishihara R, et al. Microsatellite instability and braf mutation testing in colorectal cancer prognostication. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(15):1151–6.
4. Birgisson H, Edlund K, Wallin U, Pahlman L, Kultima HG, Mayrhofer M, et al. Microsatellite instability and mutations in BRAF and KRAS are significant predictors of disseminated disease in colon cancer. *BMC Cancer.* 2015;15(1):1–11.
5. Sánchez M, Monteagudo F, Rodríguez M, García G. Marcadores inmunohistoquímicos de inestabilidad microsatelital para latipificación del cáncer colorrectal. Aspectos claves para la interpretación por el patólogo. *2022;23(4).* Available from: <https://orcid.org/0000-0002-5149-2450>
6. Fan JZ, Wang GF, Cheng X Bin, Dong ZH, Chen X, Deng YJ, et al. Relationship between mismatch repair protein, RAS, BRAF, PIK3CA gene expression and clinicopathological characteristics in elderly colorectal cancer patients. *World J Clin Cases.* 2021;9(11):2458–68.
7. Remonatto G, Ferreira Salles Pilar E, De-Paris F, Schaefer PG, Kliemann LM. Integrated molecular profiling of RAS, BRAF mutations, and mismatch repair status in advanced colorectal carcinoma: insights from gender and tumor laterality. *J Gastrointest Oncol [Internet].* 2024 Aug 31;15(4):1580–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/39279928>
8. Sinicrope FA. Evaluating the Combination of Microsatellite Instability and Mutation in BRAF as Prognostic Factors for Patients With Colorectal Cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2019;17(3):391–4.

9. Salem ME, Bodor JN, Puccini A, Xiu J, Goldberg RM, Grothey A, et al. Relationship between MLH1, PMS2, MSH2 and MSH6 gene-specific alterations and tumor mutational burden in 1057 microsatellite instability-high solid tumors. *Int J Cancer*. 2020;147(10):2948–56.
10. Parsons MT, Buchanan DD, Thompson B, Young JP, Spurdle AB. Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. *J Med Genet* [Internet]. 2012 Mar;49(3):151–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22368298>
11. Bläker H, Alwers E, Arnold A, Herpel E, Tagscherer KE, Roth W, et al. The Association Between Mutations in BRAF and Colorectal Cancer-Specific Survival Depends on Microsatellite Status and Tumor Stage. *Clin Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2019 Feb;17(3):455-462.e6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29660527>
12. Kopetz S, Grothey A, Yaeger R, Van Cutsem E, Desai J, Yoshino T, et al. Encorafenib, Binimatinib, and Cetuximab in BRAF V600E-Mutated Colorectal Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2019 Oct 24;381(17):1632–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31566309>
13. Ye JX, Liu Y, Qin Y, Zhong HH, Yi WN, Shi XY. KRAS and BRAF gene mutations and DNA mismatch repair status in Chinese colorectal carcinoma patients. *World J Gastroenterol*. 2015;21(5):1595–605.
14. Rencuzogullari A, Bisgin A, Erdogan KE, Gumus S, Yalav O, Boga I, et al. Site specific genetic differences in colorectal cancer via Next-Generation-Sequencing using a multigene panel. *Ann Ital Chir* [Internet]. 2023;94:605–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/38131395>
15. Ashish S, Raj M. Importance of Early Next-Generation Sequencing in Microsatellite Unstable Colon Cancer With a High Tumor Mutation Burden. *Cureus*. 2022;2022(3):4–8.
16. Hernando-Calvo A, Nguyen P, Bedard PL, Chan KKW, Saleh RR, Weymann D, et al. Impact on costs and outcomes of multi-gene panel testing for advanced solid malignancies: a cost-consequence analysis using linked administrative data. *eClinicalMedicine*. 2024;69:1–12.

