



FACULTAD DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA



UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA
CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

TRABAJO FIN DE GRADO

**ESTUDIO MOLECULAR DE CADHERINA EN PACIENTES
CON TUMORES DEL APARATO DIGESTIVO**

***MOLECULAR STUDY OF CADHERIN IN PATIENTS WITH
DIGESTIVE SYSTEM TUMORS***



GRADO EN BIOLOGÍA, UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

ROSA MARÍA COBO ZUBIA

TFG nº 20TFG309

Julio, 2020

RESUMEN

El cáncer gástrico es uno de los tumores con mayor mortalidad. La mayoría de los tumores gástricos se producen de manera esporádica, pero hay una pequeña proporción de estos que tienen un componente familiar, de los cuales, del 1% al 3% son hereditarios. Estos últimos se asocian a mutaciones germinales en el gen *CDH1*, que codifica la proteína E-cadherina, implicada en la estabilidad de las uniones intercelulares. Además, se ha visto que las mutaciones en este gen también producen un aumento en el riesgo a desarrollar cáncer de mama lobulillar.

El cáncer gástrico puede clasificarse como difuso (DGC) o intestinal (IGC). El cáncer gástrico difuso es menos común que el intestinal, aparece con más frecuencia en pacientes jóvenes y tiene un peor pronóstico.

Una parte de los cánceres gástricos difusos se deben a mutaciones en el gen *CDH1*. En consecuencia, el objetivo de este estudio ha sido secuenciar este gen en pacientes con tumores del aparato digestivo, con el fin de identificar mutaciones patogénicas.

ABSTRACT

Gastric cancer is one of most deadly cancers. The vast majority of these tumors occur sporadically, however, a small number have a familiar component, of which 1% to 3% are inherited. These last are associated with germ mutations in the *CDH1* gene, which encodes the E-cadherine protein, involved in the stability of cell junctions. Moreover, it has been reported that mutations in *CDH1* also confers a higher risk to develop lobular breast carcinoma.

Gastric cancer can be classified as diffuse (DGC) or intestinal (IGC). Diffuse gastric cancer is less common than the intestinal one. It also appears more frequently in young patients and has a worse prognosis.

Since a part of diffuse gastric cancers are produced by mutations on the *CDH1* gene, the goal of this research have been to sequence this gene in patients with digestive system tumors to identify pathogenic mutations.

-INDICE-

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.	CÁNCER GÁSTRICO.....	1
1.1.	EPIDEMIOLOGÍA.....	1
1.2.	ETIOLOGÍA.....	3
-	FACTORES DE RIESGO.....	3
A.	FACTORES NUTRICIONALES.....	3
B.	TABAQUISMO Y CONSUMO DE ALCOHOL.....	4
C.	ACTIVIDAD FÍSICA.....	4
D.	INFECCIÓN POR HELICOBACTER PYLORI.....	4
E.	FACTORES GENÉTICOS.....	5
F.	FACTORES FAMILIARES.....	5
2.	CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER GÁSTRICO.....	5
3.	CÁNCER GÁSTRICO DIFUSO.....	6
3.1.	CÁNCER GÁSTRICO DIFUSO HEREDITARIO.....	6
4.	RELACIÓN ENTRE EL CÁNCER DE MAMA LOBULILLAR Y LA PROTEÍNA E-CADHERINA.....	8
II.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	9
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
1.	PACIENTES.....	9
2.	EXTRACCIÓN MANUAL DEL DNA.....	10
3.	CUANTIFICACIÓN DEL DNA.....	10
4.	AMPLIFICACIÓN DEL DNA.....	11
5.	ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.....	12
6.	SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA.....	13
7.	ANÁLISIS DE GRANDES REORDENAMIENTOS GENÓMICOS MEDIANTE MLPA.....	13
8.	PROGRAMAS BIOINFORMÁTICOS.....	16
A.	PolyPhen (Polymorphism Phenotyping).....	17
B.	PMut.....	17
IV.	RESULTADOS.....	18
1.	ANÁLISIS DE MUTACIONES EN EL GEN <i>CDHI</i>	18
1.1.	POLIMORFISMOS NEUTRALES.....	21

- VARIANTES SILENCIOSAS.....	21
- VARIANTES INTRÓNICAS	22
1.2. VARIANTES DE SIGNIFICADO CLINICO DESCONOCIDO.....	22
2. REVISIÓN DE CASOS DE PACIENTES CON CÁNCER GÁSTRICO.....	22
3. ANÁLISIS DE GRANDES REORDENAMIENTOS GENÓMICOS DEL GEN <i>CDHI</i>	24
V. DISCUSIÓN.....	25
1. ESTUDIO DE MUTACIONES EN EL GEN <i>CDHI</i>	25
- VARIANTES ENCONTRADAS EN EL GEN <i>CDHI</i>	26
A. VARIANTES SILENCIOSAS.....	26
B. VARIANTES INTRÓNICAS	26
C. VARIANTES DE SIGNIFICADO CLÍNICO DESCONOCIDO.....	27
2. ANÁLISIS DE GRANDES REORDENAMIENTOS GENÓMICOS.....	27
VI. CONCLUSIONES.....	28
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	28

I. INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER GÁSTRICO

El cáncer gástrico (GC, de sus siglas en inglés) engloba todos aquellos tumores malignos producidos a partir de las células de alguna de las capas del estómago (figura 1). La mayor parte de estos se producen en la mucosa, de los cuales el 90% son adenocarcinomas. El 10% restante son linfomas, sarcomas, tumores del estroma gastrointestinal, tumores neuroendocrinos y melanomas (Grávalos, 2020).

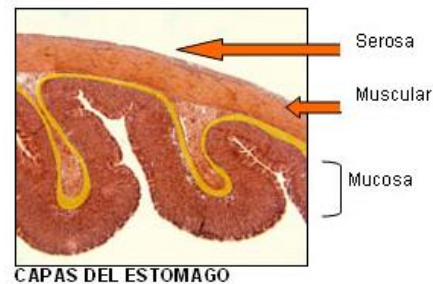


Figura 1. Capas del estómago (Grávalos, 2020).

El GC es una enfermedad multifactorial, morfológicamente heterogénea. Aproximadamente el 90% de los casos de GC son esporádicos, mientras que el 10% se asocian a un componente familiar, y de estos entre el 1% y el 3% presentan un componente hereditario (Ansari et al., 2018).

Algunos pacientes con GC son asintomáticos hasta alcanzar estadios muy avanzados de la enfermedad. Otros pacientes sí muestran síntomas en etapas más tempranas, los cuales suelen ser inespecíficos: indigestión, pérdida de peso, dolor abdominal en la parte superior, cambios en el ritmo digestivo, pérdida de apetito o hemorragia digestiva, lo que confunde y, por lo tanto, dificulta en gran medida el diagnóstico de la enfermedad en las primeras fases. Es por esto que el GC suele detectarse en estadios avanzados, incluso muchos casos se diagnostican en fase metastásica (Grávalos, 2020; Stokłosa et al., 2020).

1.1 EPIDEMIOLOGÍA

El GC es el quinto tipo de tumor más frecuente y la tercera causa de muerte relacionada con cáncer en todo el mundo. Según los últimos datos publicados por GLOBOCAN, en 2018 se diagnosticaron 1.033.701 casos de GC (figura 2). Sin embargo, en las últimas décadas se ha observado una tendencia descendente en la incidencia y mortalidad global de esta enfermedad (Ansari et al., 2018; Eusebi et al., 2020; Globocan, 2018; Stokłosa et al., 2020).

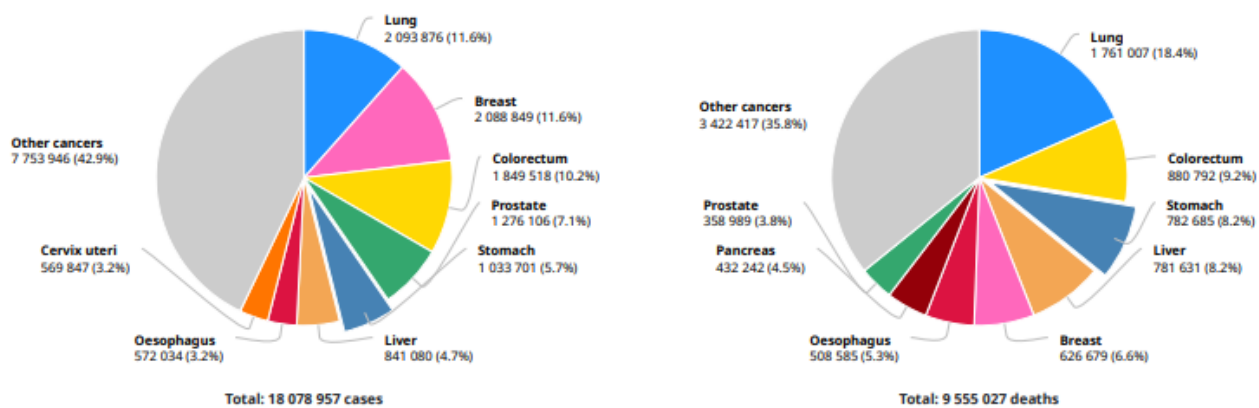


Figura 2. Izquierda: número de muertes asociadas a cada tipo de tumor a nivel mundial durante el año 2018. Derecha: número de muertes asociadas a cada tipo de tumor durante el año 2018 (Globocan, 2018).

Cada año se diagnostican mundialmente alrededor de 1 millón de casos nuevos de CG, lo que hace que la OMS lo haya considerado un problema de salud pública (Strong, 2018). Del total de casos, cerca de 2/3 se producen en países en vías de desarrollo (Eusebi et al., 2020).

La incidencia y mortalidad del GC varían en función de la región geográfica (figura 3). Las regiones más afectadas son Asia Oriental, Europa Central y Oriental y algunos países de Iberoamérica. Por el contrario, las zonas con menor tasa de incidencia son América del Norte, Australia y África septentrional. A pesar de ello, la distribución de GC no sigue una pauta geográfica estricta (Eusebi et al., 2020).

En España, a lo largo de 2019 se diagnosticaron alrededor de 7.865 casos de GC (4.863 en varones, 3.002 en mujeres) (SEOM, 2019). Se han pronosticado unos 7500 casos nuevos para el 2020 (Grávalos, 2020).

El riesgo de desarrollar GC aumenta a partir de los 50 años, siendo mucho más común en hombres que en mujeres, mostrando los primeros una probabilidad 2 o incluso 3 veces mayor que las mujeres a desarrollar la enfermedad. Las edades más propensas a padecer GC son las comprendidas entre los 60 y los 70 años de edad (Eusebi et al., 2020; Grávalos, 2020).

La tasa de supervivencia es de aproximadamente el 30%. El factor más determinante de la supervivencia a 5 años es el estadio del tumor en el momento de su diagnóstico (Eusebi et al., 2020).

La detección en fases tempranas de la enfermedad eleva la tasa de supervivencia a 5 años al 80%. Por desgracia, en Europa este diagnóstico se realiza a tiempo en menos del 20% de los casos. En otros países como Corea y Japón, donde los programas de detección precoz son muy eficaces, la tasa de supervivencia a 5 años supera el 60% de los casos (Eusebi et al., 2020).

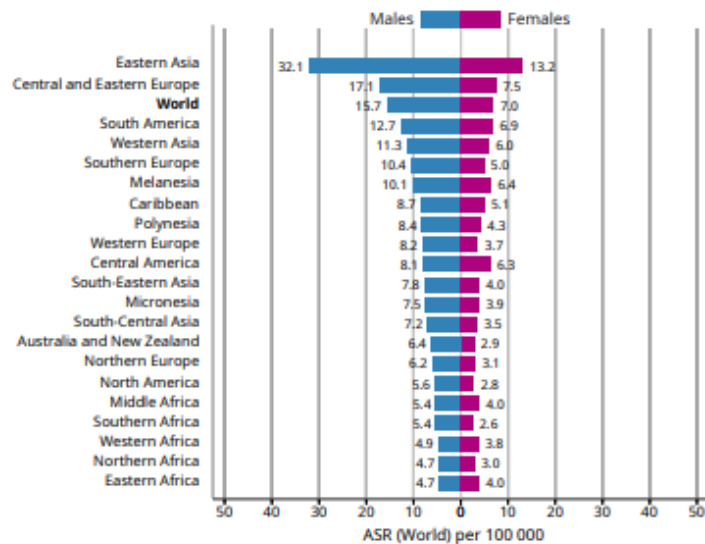


Figura 3. Tasa de incidencia en GC estandarizada por sexo en diferentes países (Globocan, 2018).

1.2 ETIOLOGÍA

Actualmente se observa un descenso en la incidencia de GC. Los factores implicados en este descenso son: cambios en la dieta o en el estilo de vida de la población, disminución de las infecciones causadas por la bacteria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) y mejora en la conservación e higiene de los alimentos (Eusebi et al., 2020).

- FACTORES DE RIESGO

Son factores de riesgo todos aquellos agentes que aumentan la predisposición a padecer GC. Hay un gran número de factores de riesgo, siendo los más importantes:

A. FACTORES NUTRICIONALES

La dieta juega un papel clave en la predisposición al GC. Hay factores que aumentan el riesgo de desarrollar GC, mientras que otros factores nutricionales desempeñan un papel protector (Eusebi et al., 2020; Strong, 2018).

Entre los factores nutricionales que aumentan el riesgo de desarrollar GC encontramos: dietas ricas en sal y nitritos, responsables de la elevada incidencia de GC en algunos países (Grávalos, 2020; Strong, 2018); el consumo de carnes rojas y procesadas (Eusebi et al., 2020), y el consumo de alimentos ahumados también aumentan el riesgo de padecer GC debido a la formación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (Eusebi et al., 2020).

Además, preparar los alimentos de manera incorrecta, no refrigerarlos adecuadamente y la ingesta de agua con muchos nitratos o contaminada con *H. pylori* favorecen el desarrollo del GC (Grávalos, 2020).

Por otro lado, también encontramos algunos alimentos que ejercen un papel protector, disminuyendo el riesgo de padecer GC: dietas ricas en frutas, verduras y vitaminas. Tanto frutas como verduras contienen una gran cantidad de vitaminas con efectos antioxidantes y actividades anticancerígenas, como pueden ser, por ejemplo, el ácido ascórbico, las catequinas o los carotenoides. Las carnes blancas también desempeñan una función protectora frente al GC. Hay estudios que demuestran que la dieta mediterránea puede disminuir el riesgo de padecer GC de manera significativa (Eusebi et al., 2020).

A pesar de todo esto, las diferencias en la dieta no son suficientes para explicar las diferencias existentes en la incidencia de GC entre países (Strong, 2018).

B. TABAQUISMO Y CONSUMO DE ALCOHOL

Hay estudios que demuestran que tanto fumar como el consumo frecuente de alcohol aumentan el riesgo de padecer GC (Eusebi et al., 2020; Grávalos, 2020).

C. ACTIVIDAD FÍSICA

Realizar ejercicio físico disminuye el riesgo de padecer GC hasta en un 30%, según revelan algunos estudios (Eusebi et al., 2020).

D. INFECCIÓN POR HELICOBACTER PYLORI

La infección causada por la bacteria *H. pylori* incrementa el riesgo de padecer GC. Esta bacteria ejerce su acción a través de factores de virulencia, expresados principalmente en las cepas cagA (Eusebi et al., 2020).

Este incremento del riesgo se debe a que la infección por esta bacteria provoca un aumento de probabilidad de padecer gastritis (inflamación de la mucosa del estómago). Esta inflamación de la mucosa gástrica induce tanto daño oxidativo como nitrosación del DNA y conduce a la atrofia, metaplasia intestinal, displasia y finalmente, cáncer gástrico. El riesgo de desarrollar GC se relaciona tanto con la gravedad como con la extensión de la atrofia gástrica y la metaplasia intestinal (Eusebi et al., 2020).

Por otro lado, se han realizado estudios que demuestran que la erradicación exitosa de la bacteria disminuye el riesgo de padecer GC (Eusebi et al., 2020).

E. FACTORES GENÉTICOS

La genética juega un papel importante en la incidencia de GC. Sin embargo, hasta la fecha, no se han descrito mutaciones relacionadas con un aumento de riesgo a desarrollar la enfermedad asociadas a los diferentes grupos étnicos (Strong, 2018).

F. FACTORES FAMILIARES

Se ha observado una mayor incidencia de GC (del doble o incluso del triple) en sujetos con varios familiares diagnosticados de GC, a pesar de no mostrar alteraciones genéticas conocidas (Grávalos, 2020).

2. CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER GÁSTRICO

Hay varias maneras de clasificar los diferentes tipos de GC. La clasificación más utilizada hasta la actualidad es la que propuso Lauren en el año 1965 (Ma et al., 2016). En ella se dividen los GC en dos grupos en función de su histología: el GC de tipo intestinal (IGC) y el GC de tipo difuso (DGC). Cada tipo de GC presenta diferencias en cuanto a su patogenicidad, etiología y epidemiología (Ma et al., 2016).

El IGC representa el 60% de los GC (Ansari et al., 2018). En los tumores gástricos de tipo intestinal, las células tumorales presentan adhesión, forman estructuras tubulares o glandulares, y suelen ir asociadas a la metaplasia intestinal (Ma et al., 2016). Estas células tumorales presentan un gran tamaño y su núcleo es polimórfico y anisocromático, con un grueso patrón de cromatina. Los adenocarcinomas gástricos de tipo intestinal suelen estar bien diferenciados (Hartgrink et al., 2009). El IGC suele ir ligado a la invasión linfática o vascular y se observan lesiones en zonas alejadas del tumor. Este tipo de cáncer es más frecuente en varones de edad avanzada, afecta al antro gástrico y presenta un mejor pronóstico y un transcurso más largo (Ma et al., 2016).

Por otro lado, el DGC representa el 40% restante de los tumores gástricos (Ansari et al., 2018). En el DGC las células no muestran adhesión entre ellas. Estas células infiltran el estroma de manera individual o en grupos pequeños, de manera que se observa una población de células tumorales sin cohesión y dispersas. Estas células pueden presentar moco intracelular, lo que hace que el núcleo se encuentre en la periferia de la célula, formando lo que se conoce como carcinoma de células en anillo de sello (Hartgrink et al., 2009). Es más frecuente en pacientes jóvenes y, comparado con el IGC, este tipo de GC es más frecuente en el sexo femenino que en el masculino. Es frecuente observar metástasis peritoneal sin que aparezcan lesiones precursoras reconocibles fácilmente. El DGC suele afectar al cuerpo del estómago, tiene una menor duración y un peor pronóstico que el IGC. Además,

el DGC es más frecuente en las zonas de menor riesgo y su incidencia ha disminuido pero menos que el IGC, el cual ha disminuido notablemente en los últimos años (Ansari et al., 2018; Ma et al., 2016).

En ambos tipos de GC influyen tanto factores nutricionales como ambientales, sin embargo, el IGC se encuentra más asociado a los factores dietéticos y la infección por *H. pylori*, mientras que el DGC está más ligado a factores genéticos (Ma et al., 2016).

Un hecho clave para la comprensión de la compleja epidemiología del GC fue el descubrimiento de una mutación en el gen de la E-cadherina (*CDH1*), que causa GC familiar. Se descubrió que la mutación en el gen supresor tumoral *CDH1*, encargado de codificar la proteína E-cadherina, era el responsable del HDGC en una familia maorí. Las mutaciones de pérdida de función en la línea germinal de E-cadherina aumentan el riesgo de desarrollar DGC y cáncer de mama lobulillar (Strong, 2018).

3. CÁNCER GÁSTRICO DIFUSO

El cáncer gástrico difuso (DGC) se observa más comúnmente en pacientes jóvenes y su patogenicidad aún no está bien caracterizada. Esta está determinada principalmente por factores genéticos, si bien también está influenciada, en menor medida, por factores ambientales y la cascada inflamatoria. Una proporción menor de DGC (1-3%) se ha relacionado y asociado inherentemente con alteraciones germinales en el gen Cadherina, lo que se conoce como DGC hereditario (HDGC) (Ansari et al., 2018).

El DGC, a diferencia del IGC, se desarrolla como resultado de un proceso inflamatorio crónico, donde no se observan los pasos intermedios (gastritis atrófica y metaplasia intestinal). La gastritis activa es un factor de riesgo muy relevante para el desarrollo de DGC. Hay estudios que demuestran que el grado de metilación del DNA de la mucosa gástrica se encuentra relacionado con la gastritis asociada a *H. pylori* y que es posible que exista un mecanismo molecular asociado al desarrollo de DGC (Ma et al., 2016).

3.1 CÁNCER GÁSTRICO DIFUSO HEREDITARIO (HDGC)

En el síndrome de cáncer gástrico difuso hereditario, uno o más miembros de la familia desarrollan el tumor debido a una mutación en el gen de la E-cadherina (*CDH1*), situado en el cromosoma 16q22.1 (Corso et al., 2016; Grávalos, 2020).

La E-cadherina es una proteína transmembrana que contribuye a la adhesión celular, la integración de los tejidos y previene la invasión de los tejidos. Su dominio extracelular interactúa con el de las células vecinas a través de un mecanismo dependiente de calcio,

mientras que el dominio intracelular se une a cateninas, vinculando a la proteína E-cadherina con el citoesqueleto de actina (figura 4) (Thomas et al., 2019).

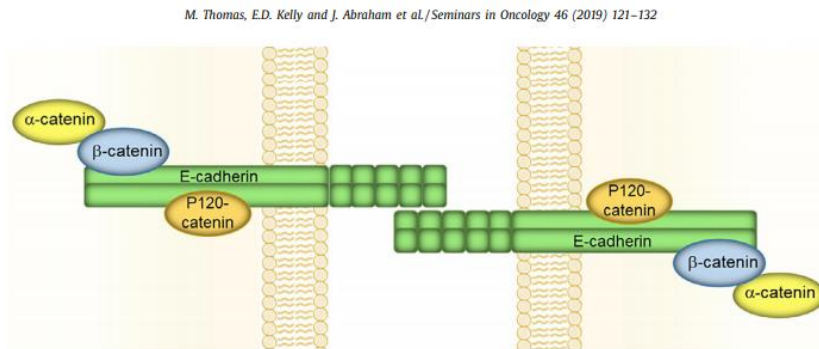


Figura 4. Representación esquemática de la función de la E-cadherina en la adhesión de las células (Thomas et al., 2019).

El 10% de los casos de GC son de tipo familiar y el HDGC representa entre el 1% y el 3% del total de los casos (Ma et al., 2016). Aproximadamente, en el 30% de los casos de GC familiar existe una mutación germinal en uno de los alelos del gen *CDH1*. La inactivación del otro alelo se produce por una segunda mutación somática o por hipermetilación de la región promotora del gen. El riesgo de padecer GC en personas portadoras de una mutación en el gen *CDH1* es de aproximadamente el 67% en el caso de varones y de alrededor de un 83% en el caso de mujeres. Además, existen algunos síndromes hereditarios que se asocian a un aumento de riesgo a desarrollar este tumor, como son el Síndrome de Lynch o el Síndrome de Peutz-Jeghers (Hartgrink et al., 2009).

Hasta la fecha se han identificado más de 100 alteraciones germinales en el gen *CDH1*, tanto mutaciones puntuales como grandes reordenamientos genómicos (Ma et al., 2016). Las mutaciones en este gen implican una disminución de su expresión, de manera que disminuye la adhesión celular y se activan múltiples vías de transducción de señales, lo que conduce a la invasión tumoral y a la metástasis. Además, también se ha descrito que mutaciones en los genes *P53* y *C-MET* pueden estar implicados en un aumento de riesgo de desarrollar GC (Corso et al., 2016; Ma et al., 2016).

Se recomienda que los pacientes sanos portadores de alguna mutación en el gen *CDH1* tengan un seguimiento adecuado para diagnosticar, en caso de que aparezca, la enfermedad en estadios tempranos. El seguimiento consiste en realizar periódicamente endoscopias e incluso, en pacientes con una alta carga familiar de GC, se puede llegar a recomendar la gastrectomía total preventiva debido al alto riesgo que poseen de desarrollar el tumor (Ma et al., 2016).

Los criterios establecidos para realizar el test genético de *CDH1* en personas con sospecha de HDGC son los siguientes (*Cáncer Gástrico Difuso Hereditario*):

- Al menos 2 casos de GC en la familia, siendo uno de ellos gástrico difuso y diagnosticado antes de los 50 años de edad.
- Por lo menos 3 casos de GC en la familia a cualquier edad, siendo uno de ellos gástrico difuso.
- Una persona diagnosticada con cáncer gástrico difuso antes de los 45 años.
- Una persona diagnosticada con DGC y otro miembro de la familia con cáncer de mama lobulillar.
- Una persona diagnosticada con DGC y otro miembro de la familia con adenocarcinoma de colon con células en anillo de sello.

4. RELACIÓN ENTRE EL CÁNCER DE MAMA LOBULILLAR Y LA PROTEÍNA E-CADHERINA

El carcinoma lobulillar invasivo es el segundo tipo más común de cáncer de mama invasivo, después del carcinoma ductal invasivo, representando entre el 5% y el 10% de los tumores de mama (Johnson et al., 2015; Thomas et al., 2019).

El cáncer de mama lobulillar está relacionado con la reducción de la expresividad de la proteína E-cadherina, de manera que las células pierden adhesión entre ellas (Johnson et al., 2015; Thomas et al., 2019).

La pérdida de función de la proteína E-cadherina en los cánceres de mama lobulillares puede deberse a varios factores, como la pérdida de heterocigosidad o la metilación de la región promotora del gen (Dossus & Benusiglio, 2015). Las mujeres que presentan una mutación en este gen presentan un riesgo de desarrollar cáncer de mama del 39-52% (Thomas et al., 2019).

El cáncer de mama lobulillar se caracteriza por la presencia de células con núcleos redondeados, citoplasma delgado y vacuolas ocasionales. Estas células se disponen en capas concéntricas alrededor de conductos (Thomas et al., 2019).

En el cáncer de mama ductal no se suele observar metástasis en el tracto gastrointestinal, a diferencia del cáncer de mama lobulillar, siendo el estómago una de las zonas donde se observa metástasis más frecuentemente (Montagna et al., 2018).

El cáncer de mama lobulillar hereditario se presenta con baja frecuencia en relación al ductal y se desarrolla como un tipo de tumor secundario en pacientes o familias con alta carga de HDGC (Christgen et al., 2016). También se ha observado cáncer de mama lobulillar en familias que no presentan DGC, aunque con menor frecuencia (Benusiglio et al., 2013).

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El HDGC es una enfermedad autosómica dominante provocada por alteraciones en el gen *CDHI*, que codifica la proteína E-cadherina, implicada en la estabilidad de las uniones intercelulares.

Entre el 10% y el 30% de pacientes diagnosticados de HDGC presentan mutaciones en el gen *CDHI*. Identificar a las familias portadoras de mutaciones patogénicas en dicho gen puede favorecer la prevención de la aparición del GC y/o detectarlo en fases tempranas, gracias a los protocolos de vigilancia médica y a las medidas preventivas que se ofrecen a los miembros de las familias con este diagnóstico.

Por todo ello, en este trabajo nos propusimos, en primer lugar, la identificación de mutaciones patogénicas en el gen *CDHI* en pacientes con sospecha de HDGC remitidas a la Unidad de Consejo Genético del Hospital Universitario de Salamanca entre los años 2019 y 2020.

Además, hay estudios que confirman que las mujeres que pertenecen a familias con HDGC y que son portadoras de mutaciones patogénicas en el gen *CDHI* muestran mayor riesgo de padecer cáncer de mama lobulillar. Por ello, en segundo lugar, decidimos analizar este gen en pacientes diagnosticadas de cáncer de mama lobulillar con antecedentes familiares de DGC.

Por último, se decidió completar el estudio mediante el análisis de grandes reordenamientos genómicos del gen *CDHI* en aquellos pacientes o familias con mayor incidencia de HDGC en las que no se detectaran mutaciones puntuales, con el fin de identificar si había pérdidas o amplificaciones en dicho gen.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. PACIENTES

Se realizó el estudio del gen *CDHI* a 8 familias remitidas a la consulta de Consejo Genético del Servicio de Oncología del Hospital Universitario de Salamanca entre los años 2019 y 2020, según los datos de su historia personal y familiar de cáncer. En la primera consulta se entrevistó a los pacientes y se elaboró un árbol genealógico de la familia, recopilando datos de 3 o más generaciones.

Aquellos pacientes que cumplían los criterios de selección, indicados en la introducción de este trabajo, fueron informados de la naturaleza y objetivo de este estudio y todos ellos firmaron el consentimiento informado.

2. EXTRACCIÓN MANUAL DE DNA

A partir de muestras de sangre de los pacientes, recogidas en tubos con EDTA, se obtuvo manualmente el DNA genómico de alto peso molecular.

Las células nucleadas se obtuvieron por centrifugación repetida y lisis eritrocitaria con solución hipotónica (centrifugación de la sangre total durante 30 minutos a 1500rpm en 50mL de ddH₂O a 4°C). Tras recuperar la interfase creada y la lisis de los glóbulos rojos con agua destilada, las células mononucleadas se lavaron en tampón Fornace (0.25M sacarosa, 50mM Tris-HCl pH=7.5, 25mM KCl y 5mM MgCl₂), que aporta la osmolaridad necesaria para no lisar los leucocitos y se precipitaron mediante centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos. Las células nucleadas se resuspendieron en **tampón Fornace** a una concentración estimada de 5x10⁶ células/mL, tras lo cual se añadió **EDTA** 0.5M pH=8 (concentración final 10mM), un quelante de iones divalentes que posibilita la inactivación de las nucleasas; **SDS** (concentración final 1%), que rompe las membranas celulares; y **proteínasa K**, que degrada las proteínas. La mezcla se incubó a 55°C durante 8-16 horas.

Tras la incubación, el DNA se extrajo y se purificó, tratándolo con una mezcla de **fenol tamponado** a pH= 8 (para prevenir que el DNA se quede en la fase intermedia, entre la fase acuosa y la orgánica) y **CIAA** (cloroformo: alcohol isoamílico 24:1). Se llevó a cabo una centrifugación. Con este proceso el DNA permaneció en la fase acuosa y se limpió de otros residuos al mezclarlo con CIAA y centrifugar para separar de nuevo las dos fases: una en la que se encuentra el DNA y otra que contiene los detritos celulares. Tras esto, se agregó etanol absoluto frío a la fase acuosa, precipitando el DNA que se recuperó y se lavó con etanol al 70% y finalmente se resuspendió en agua estéril.

3. CUANTIFICACIÓN DEL DNA

Se utilizó el espectrofotómetro NanoDropTM1000 para determinar tanto la calidad como la concentración de las muestras de DNA de los pacientes. Este espectrofotómetro mide la absorbancia de la muestra a las longitudes de onda del ultravioleta (UV) y del Vis (visible) con una elevada reproductibilidad. El rango de medida de concentración se encuentra entre 2-3700 ng/μl de dsDNA y no es necesario diluir la muestra previamente. Para medir la concentración, se introducen entre 1.5 y 2 μl de la muestra en el espectrofotómetro, midiéndose la absorbancia a 230nm, 260nm y 280nm, siendo la absorbancia máxima del DNA 260nm, de manera que podremos determinar su concentración en la muestra empleando la siguiente ecuación:

$$\text{DNA } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = (\text{Abs}_{260} \times \text{FD} \times 50)/1000$$

Siendo: Abs_{260} la absorbancia de la muestra a 260 nm; FD el factor de dilución de la muestra; 50 el factor que indica una absorbancia de 1.0 si se tienen 50 $\mu\text{g/mL}$ de DNA de doble cadena y 1000 el factor de conversión de mL a μl .

El valor de la lectura a 230nm (longitud mínima de absorbancia del DNA) está influenciado por la cantidad de sales contenidas en la muestra, mientras que la longitud de onda a 280nm es específica de las proteínas. Para conocer el grado de pureza de la muestra hay que tener en cuenta las relaciones de absorbancia a 260/280nm y 260/230nm.

4. AMPLIFICACIÓN DEL DNA

Se amplificaron los exones y las secuencias intrónicas flanqueantes del gen *CDHI* empleando la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction). Esta amplificación se realizó empleando un volumen de 16.5 μl , cuyos componentes son idénticos para los 16 exones que presenta el gen:

- 6 μl de Mastermix 5 Prime Eppendorf ® (contiene Taq Polymerase, KCl, dATP, dGTP, dCTP, dTTP, Mg^{2+} y el detergente Igepal®-CA360).
- 6 μl de agua libre de nucleasas.
- 1 μl de cada oligonucleótido cebador.
- 0.5 μl adicional de Mg^{2+} .
- Como DNA molde se añadieron 2 μl de una dilución 1:10 procedente de la muestra del paciente, obtenido a través del procedimiento anteriormente descrito.

Como control negativo se empleó un tubo de reacción con todos los componentes anteriormente citados, a excepción del DNA molde.

Para amplificar los exones del gen *CDHI* se parte de un programa estándar de PCR adaptado en cada caso al exón que se vaya a amplificar (figura 5). La temperatura de anillamiento (X) se especifica en la tabla 1. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador automático y la manipulación post-PCR se realizó en un laboratorio diferente de donde se extrajo el DNA.

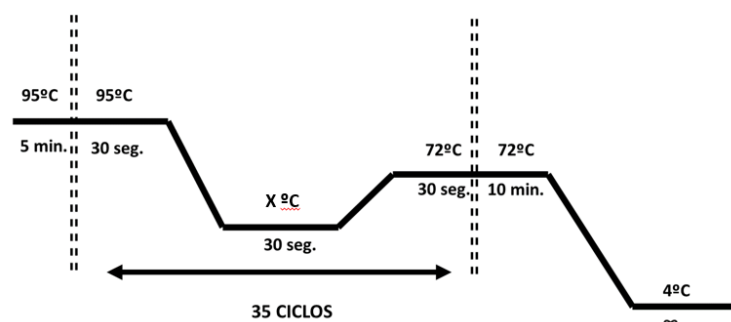


Figura 5. Programa de amplificación del gen *CDHI*.

Los programas de amplificación empleados para las distintas combinaciones de cebadores solo varían en la temperatura de anillamiento (detallado en la tabla 1).

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados en el estudio para amplificar el gen *CDHI*.

Exón	Cebador sentido	Cebador antisentido	Tamaño	T ^a anillamiento
1	GTGAACCCTCAGCCAATCAG	AATGCGTCCCTCGCAAGTCA	271	51°C
2	TCACCCGGTTCCATCTAC	CAACCTCCTCTTCTTTAT	201	52°C
3	GCTCTTGTCTTTAATCTGTC	CTACCAAGGCTGAGAAACCT	339	55°C
4	CTTGTTCCCTCATCTTCTTTC	CCCTTCTCTCCTTGGTACT	260	55°C
5	GTTGGCATCCTTCTTTACTA	AAATCCTGGATGGATGTTAC	398	55°C
6	CTCACTTGGTTCTTTCAGCT	AACCTTCGGCCTTGGACA	313	55°C
7	AGCTTGTCTAAACCTTCATC	GCTTAGACCATCACTGTAT	288	55°C
8	TTGGTTGTGTCGATCTCTCT	GTCTCATGGTACATTTTTTAT	262	55°C
9	GTACTIONGTAATGACACATCTC	TGCCAGTTTCTGCATCTT GC	356	55°C
10	ACTTCATTGTTTCTGCTCTC	AACCAGTTGGTGCAAGTCAG	488	55°C
11	GTTGTTTGCTGGTCCTATTC	GAAC TAGCTAGGAGGTCGAG	248	55°C
12	TG GGATTCATTACTGTTGC	GCATGGCAGTTGGAGCAAAG	312	55°C
13	TTTCCTCCCCTGGTCTCATC	TGAGTCACTTGCCAGCTGGA	386	55°C
14	CTCTCAACACTTGCTCTGTC	AGAGATCACTGAGCTAC	206	55°C
15	CATAGCCCTGTCTGTATGAC	CGGATGCTTTGGCTTTCCAC	270	55°C
16	AGATGACAGGTGTGCCCTTC	ATTTCTGCATTTCCCAGCAC	390	55°C

5. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Tras la realización de la PCR se analizó el producto amplificado y su intensidad mediante electroforesis en gel de agarosa, preparada al 2% con tampón TBE (Tris 0.044M, ácido bórico 0.044M, EDTA 1.0mM pH= 8.3). Las muestras se migraron en paralelo a un marcador de DNA derivado del fago Φ X-174, cortado mediante la endonucleasa Hae III. Los fragmentos generados en el DNA del fago por esta endonucleasa se corresponden a los siguientes tamaños: 1.353, 1.078, 0.872, 0.603, 0.310, 0.281, 0.271, 0.234, 0.194, 0.118, 0.072 Kb. La electroforesis se llevó a cabo aplicando un potencial constante de 120 voltios durante 40 minutos.

Para monitorizar la migración del DNA en el gen se emplearon dos colorantes, contenidos en el tampón de carga: el **xileno de cianol**, que migra con los fragmentos de aproximadamente 5Kb en un gel de agarosa al 0.8% y el **azul de bromofenol**, que migra con los fragmentos de aproximadamente 0.5Kb.

Tras la electroforesis, los fragmentos amplificados se visualizaron en el gel de agarosa usando bromuro de etidio (0.1 µg/ml), que se intercala entre las bases nitrogenadas del DNA y emite fluorescencia al ser expuesto a la luz UV (254 nm). Los resultados obtenidos se conservaron mediante un sistema de fotografía digital (BioRad).

6. SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA

Se purificaron las muestras amplificadas de DNA para eliminar cualquier resto que contuviesen de cebadores, dNTPs o iones procedentes de la reacción y que pudiesen inhibir la reacción de secuenciación. Para ello se empleó el kit comercial “High Pure Product Purification Kit”, Roche.

La secuenciación de los productos purificados se realizó en el secuenciador ABI 3100 (Applied Biosystems) en la Unidad de Genómica y Proteómica del Centro de Investigación del Cáncer (CSIC-Universidad de Salamanca).

Para ello se prepararon 2 muestras: una muestra con el cebador con sentido y otra con el cebador antisentido, a una concentración de 3pmol en un volumen de 2µl. El DNA se preparó a una concentración de 40-60ng para un volumen final de 8µl.

7. ANÁLISIS DE GRANDES REORDENAMIENTOS GENÓMICOS MEDIANTE MLPA

El MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) es una técnica empleada para detectar variaciones en el número de copias, tanto deleciones como duplicaciones, de más de 40 secuencias distintas en una misma reacción. Las distintas sondas utilizadas hibridarán en puntos diferentes de la región de interés, ligándose 2 a 2 y después se amplificarán empleando el mismo par de primers (PCR-multiplex). La técnica fue descrita por Schouten en 2002 y consta de 4 fases: desnaturalización, hibridación, ligación y amplificación (figura 6).

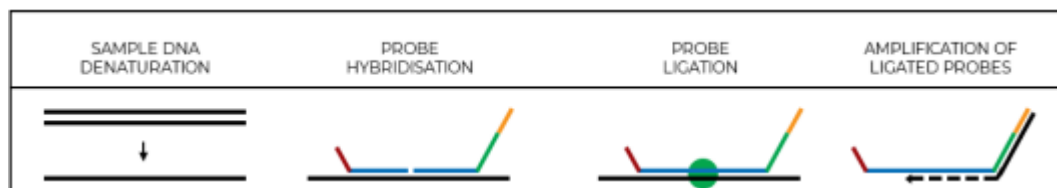


Figura 6. Fases MLPA: desnaturalización del DNA; hibridación; ligación y amplificación.

Cada reacción de amplificación consta de dos tipos distintos de sondas específicas (figura 7), que llevan incorporado uno de los oligonucleótidos universales utilizados para la amplificación final de los fragmentos. Esto reduce la inespecificidad de la técnica, ya que es imprescindible que ambas sondas reconozcan las regiones de unión para que se produzca la amplificación.

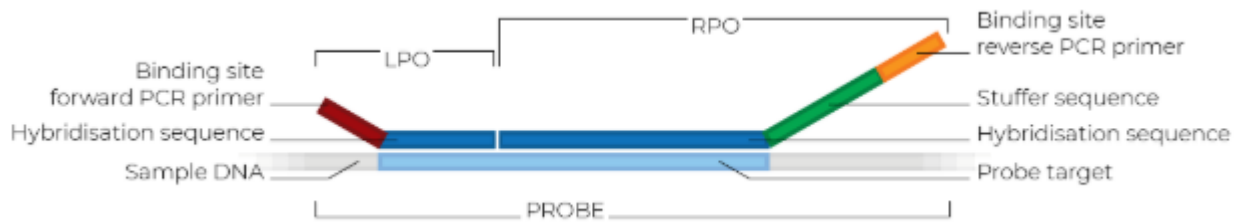


Figura 7. Sondas específicas, en las que se encuentran incorporados los oligonucleótidos universales (forward y reverse) empleados en MLPA.

Primero, la mezcla de las sondas de MLPA se añade al DNA genómico, desnaturalizado con anterioridad. Ambas partes de la sonda hibridan con secuencias diana adyacentes y ligan gracias a una enzima ligasa termoestable (figuras 8 y 9).

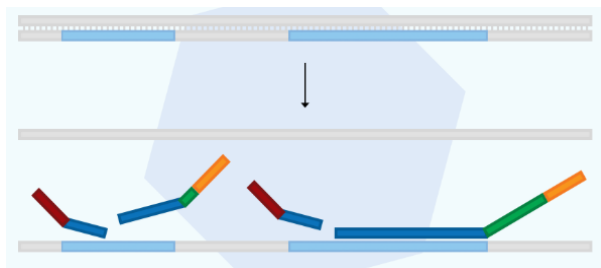


Figura 8. Hibridación de las sondas

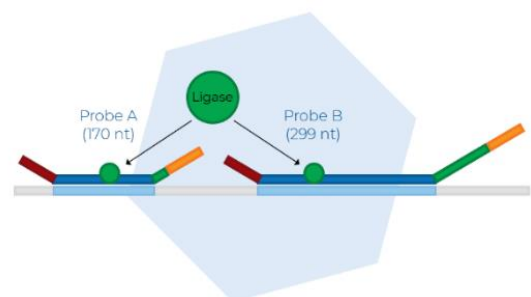


Figura 9. Ligación de las sondas

La secuencia proporcionada por las 2 sondas ligadas actúa como molde para la amplificación, empleando oligonucleótidos universales y específicos de las sondas utilizadas previamente, marcados con un fluorocromo en un extremo. Se realiza una cromatografía de los productos amplificados y el resultado se visualiza en un electroferograma.

Para el análisis de deleciones o reordenamientos del gen *CDH1* se utiliza el kit SALSA MLPA KIT P083-C1 *CDH1* (MCR-Holland, Ámsterdam, Holanda). Este kit contiene 17 sondas diferentes para los 16 exones del gen y 14 sondas para otros genes humanos situados en distintos cromosomas que sirven de control interno del proceso (tabla 2).

Tabla 2. Sondas empleadas en el kit SALSA P083-C1 CDH para detectar grandes reordenamientos en el gen *CDH1*. En la tabla se indica la sonda y el exón donde se localiza y la localización cromosómica de las sondas control.

Tamaño (nt)	Sonda SALSA MLPA	Posición cromosómica	
		Referencia	CDH1
130	Reference probe 00797-L00463	5q31	
137	Reference probe 05659-L19935	2p22	

142	Reference probe 10699-L11281	6p12	
148	<i>CDHI</i> probe 12653-L19725		Exón 8
154	<i>CDHI</i> probe 12651-L19938		Exón 1
160	<i>CDHI</i> probe 02409-L19374		Exón 7
168	Reference probe 05377-L06284	4p16	
174	<i>CDHI</i> probe 16884-L19717		Exón 9
184	Reference probe 09099-L09158	4q25	
193	<i>CDHI</i> probe 12654-L19369		Exón 2
208	Reference probe 11611-L12371	12p13	
220	Reference probe 05939-L05368	1q22	
229	<i>CDHI</i> probe 02410-L01858		Exón 11
238	Reference probe 01670-L01250	11q22	
247	Reference probe 14971-L16707	6q22	
258	<i>CDHI</i> probe 02405-L19937		Exón 3
265	<i>CDHI</i> probe 02413-L19371		Exón 13
273	Reference probe 11541-L10062	3p25	
283	<i>CDHI</i> probe 02414-L01860		Exón 14
291	Reference probe 08722-L08733	9q21	
301	<i>CDHI</i> probe 02407-L01853		Exón 5
310	Reference probe 09065-L09234	19p13	
316	<i>CDHI</i> probe 02415-L19372		Exón 15
329	<i>CDHI</i> probe 02408-L13240		Exón 6
337	<i>CDHI</i> probe 02416-L01862		Exón 16
346	Reference probe 06709-L06296	10p11	
355	Reference probe 10177-L06584	21q21	
364	<i>CDHI</i> probe 12656-L19936		Exón 4
373	Reference probe 04537-L03926	2q24	
382	<i>CDHI</i> probe 16885-L19718		Exón 12
391	<i>CDHI</i> probe 12657-L14803		Exón 2
400	Reference probe 02460-L01904	15q21	
409	Reference probe 09821-L10231	10q26	

El protocolo utilizado fue el recomendado por el fabricante, realizando pequeñas modificaciones:

a. Desnaturalización e hibridación de las sondas:

- Se diluyen 100ng de DNA en ddH₂O en un volumen de 5µl.
- Se desnaturaliza la muestra a 98°C durante 10 minutos. Después, atemperar a 25°C en un termociclador.
- Se añade 1.5 µl de mezcla de las sondas SALSA (SALSA probemix) y 1.5 µl de tampón MLPA.

- Se incubó 1 minuto a 95°C. Tras esto, se dejó incubando a 60°C durante 16-20 horas.

b. Reacción de ligación:

- Tras incubar el DNA con las sondas durante al menos 16 horas a 60°C se reduce la temperatura del termociclador a 54°C y se añade la mezcla de ligación, compuesta por 2 tampones, agua y ligasa 65.
- Se incubó la muestra con la ligasa a 54°C durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, se inactiva la enzima calentando la muestra a 98°C durante 5 minutos.

c. Reacción de PCR:

Para realizar la PCR, se añade a la mezcla Taq polimerasa SALSA, tampón de dilución de la enzima, agua destilada y estéril y cebadores universales marcados con fluorocromo:

- Sentido: 5´-*GGGTTCCCTAAGGGTTGGA-3´
*Marcado con fluorocromo.
- Anti-sentido: 5´-GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA-3´

La amplificación se llevó a cabo empleando el programa de PCR sugerido por el fabricante y tras su realización se comprobó que la muestra había amplificado correctamente. Para ello, se cargaron 6 µl del producto de PCR en un gel de agarosa preparado al 2% teñido con bromuro de etidio y se observó bajo luz UV.

Posteriormente se prepararon las muestras para su análisis añadiendo 1 µl de producto de PCR, 0.3 µl de marcador de tamaño marcado con ROX (GeneScan TM-500, Applied Biosystems) y 9 µl de formamida desionizada. Después se realizó el análisis en un secuenciador ABI prism 3700 (PE Applied Biosystems) empleando el programa informático PeakScanner.

Para realizar el análisis se compara entre un electroferograma procedente de un control y el electroferograma problema. La pérdida de secuencia de un exón implica la reducción en un 35-55% del área relativa del pico de amplificación, mientras que la ganancia de 2 a 3 copias de la secuencia produce un aumento del 30-55% del área relativa del pico de amplificación. La desviación estándar de cada pico ha de ser menor al 10% para todas las sondas. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

8. PROGRAMAS BIOINFORMÁTICOS

Para analizar la secuencia proteica del gen *CDHI* se utilizaron los programas Chromas y Serial Cloner. El programa Chromas permite analizar el cromatograma de las secuencias, mostrando cada ddNTP de un color distinto. Analizando el cromatograma y comparándolo con una secuencia de

referencia podemos detectar si hay alguna mutación en el gen de estudio. Para comparar la secuencia de referencia con las secuencias problema utilizamos el programa Serial Cloner.

El estudio del comportamiento teórico de determinadas variantes sin clasificar se llevó a cabo mediante el empleo de programas informáticos (PolyPhen y PMut).

A. PolyPhen (Polymorphism Phenotyping)

Se trata de un programa que predice el posible impacto de una sustitución aminoacídica en la estructura y función de la proteína humana, utilizando consideraciones físicas y comparativas.

Se introduce la secuencia de la proteína en el programa en formato FASTA y se realiza un alineamiento de esta con las secuencias pertenecientes a las proteínas homólogas en las especies que se encuentran descritas en BLAST. El software PSIC (Position-Specific Independent Counts) utiliza el resultado del alineamiento múltiple para calcular la matriz del perfil. Los elementos de la matriz son ratios (valores de perfil) logarítmicos que muestran la probabilidad de que se encuentre un aminoácido en una determinada posición, frente a que ese aminoácido se localice en cualquier otra posición (frecuencia de fondo). El programa PolyPhen analiza los valores absolutos de la diferencia entre los valores de perfil de las dos variantes alélicas en la posición polimórfica. Un valor muy elevado de esta diferencia podría significar que la sustitución estudiada aparece poco o no aparece en la familia de proteínas. Este programa también muestra el número de secuencias alineadas en la posición de búsqueda. Este número indica la credibilidad de los cálculos del valor del perfil.

Los resultados del estudio pueden determinar que el cambio es: **probablemente patogénico** (hay una probabilidad elevada de que afecte a la estructura o a la función de la proteína), **posiblemente patogénico** (se cree que podría afectar a la función o estructura de la proteína), **benigno** (es muy probable que carezca de efecto fenotípico) o **desconocido** (hay casos en los que la carencia de datos no permite que el programa pueda realizar una predicción).

B. PMut

Este programa predice si una mutación puede ser patogénica o neutral. Se basa en las características de la secuencia y en un software de 1 o 2 redes neutrales NN (Neutral Network), que utilizan bases de datos internas, predicción de estructura secundarias y conservación de las secuencias. Ofrece una respuesta afirmativa o negativa y un índice de credibilidad.

La secuencia proteica a estudiar se introduce en formato FASTA y se incluye la localización y el cambio de aminoácido que se produce. Proporciona resultados que varían en un rango de 0 a 1. Un valor 0 significa que se trata de una mutación neutral y los valores más altos son patogénicos. También

se muestra la mutación en relación a la estructura proteica. La tasa de error por falsos negativos es de un 17% y por falsos positivos es de un 21%. Si se incluye la estructura de la proteína, la tasa de falsos positivos se reduce a un 12% y la de falsos negativos a un 10%.

IV. RESULTADOS

1. ANÁLISIS DE MUTACIONES EN EL GEN *CDHI*

El análisis molecular de la región codificante del gen *CDHI* y las regiones intrónicas adyacentes, llevado a cabo en 8 pacientes remitidos de la Unidad de Consejo Genético del Servicio de Oncología del Hospital Universitario de Salamanca, con sospecha de HDGC, se realizó en la Unidad de Consejo Genético en Cáncer Hereditario del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca (Laboratorio 14). La historia familiar de estos pacientes se detalla en la tabla 3.

Tabla 3. Historia familiar de los probandos analizados.

HISTORIA FAMILIAR	
Familia 1 (figura 10)	Mujer diagnosticada de GC a los 55 años. Hermana con cáncer de mama diagnosticado a los 54 años.
Familia 2 (figura 11)	Varón, diagnosticado de DGC a los 32 años. Madre con cáncer de mama diagnosticado a los 32 años. Numerosos antecedentes de cáncer de mama y ovario por la rama materna.
Familia 3 (figura 12)	Mujer con cáncer de mama diagnosticado a los 75 años. Hermana con cáncer de mama diagnosticado a los 60 años y dos hermanos con GC, diagnosticado a los 58 y 55 años, respectivamente. Madre con GC. Dos primas paternas diagnosticadas de cáncer de mama a los 60 y a los 70 años, respectivamente.
Familia 4 (figura 13)	Mujer diagnosticada de GC con células en anillo de sello a los 65 años. Padre con ADC colorrectal diagnosticado a los 65 años. Primo paterno diagnosticado de cáncer de colon. Tía materna diagnosticada de un posible GC.
Familia 5 (figura 14)	Mujer diagnosticada de GC con células en anillo de sello a los 52 años. Padre con cáncer de colon, diagnosticado 3 veces a los 78 años. Tío paterno diagnosticado de un posible cáncer de intestino a los 70 años. Tía materna diagnosticada de cáncer de tiroides con menos de 50 años y abuela materna diagnosticada cáncer gástrico o intestinal a los 80 años.
Familia 6 (figura 15)	Varón sano de 62 años. Padre con DGC diagnosticado a los 69 años y madre diagnosticada de GC con células en anillo de sello a los 78 años. Tía materna con cáncer de mama a los 65 años y abuela materna con DGC diagnosticado con más de 70 años. Tía paterna con GC a los 76 años. Abuelo paterno diagnosticado de cáncer de vejiga a los 71 años. Hermana de la abuela paterna diagnosticado de GC a los 65 años.

<p>Familia 7 (figura 16)</p>	<p>Mujer diagnosticada de GC con células en anillo de sello a los 55 años. Hermana diagnosticada de cáncer de tiroides a los 52 años, padre diagnosticado de cáncer de colon a los 78 años, tío paterno diagnosticado de cáncer de intestino a los 70 años, tía materna diagnosticada de cáncer de páncreas con menos de 50 años, tío materno con cáncer de colon y tía materna con posible IGC a los 80 años.</p>
<p>Familia 8 (figura 17)</p>	<p>Varón diagnosticado de GC a los 53 años. Dos hermanos con cáncer de páncreas o gástrico, diagnosticado a los 33 y 68 años respectivamente. Madre con GC a los 91 años.</p>

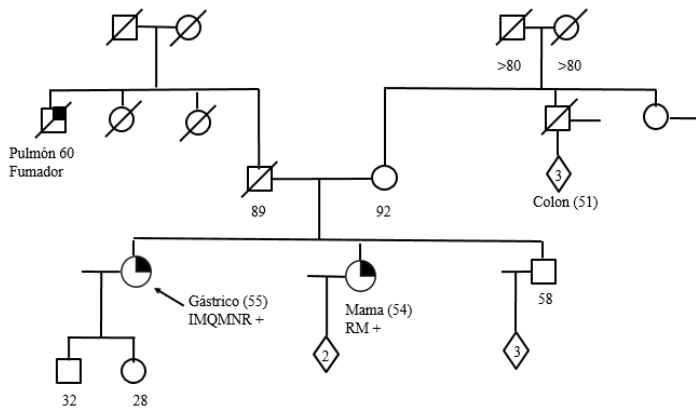


Figura 10. Familia 1.

Numerosos antecedentes de cáncer de mama y ovario por rama materna

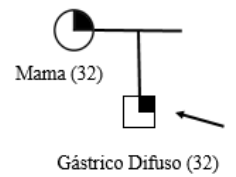


Figura 11. Familia 2.

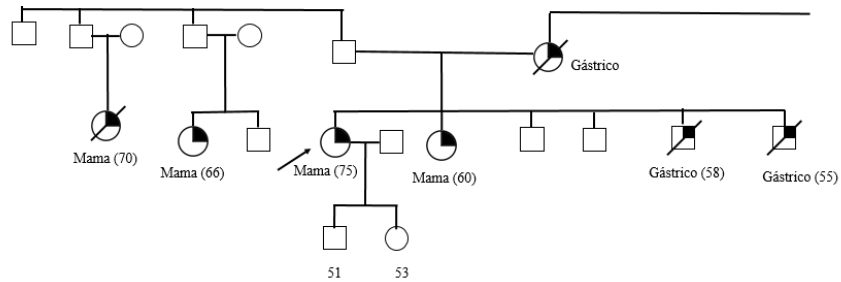


Figura 12. Familia 3.

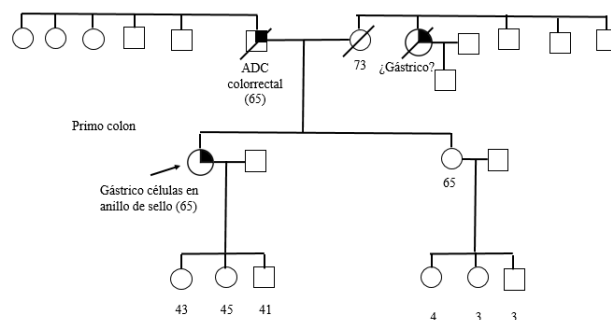


Figura 13. Familia 4.

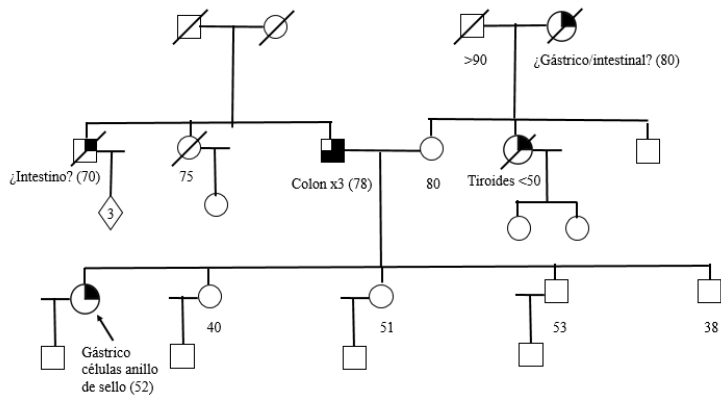


Figura 14. Familia 5.

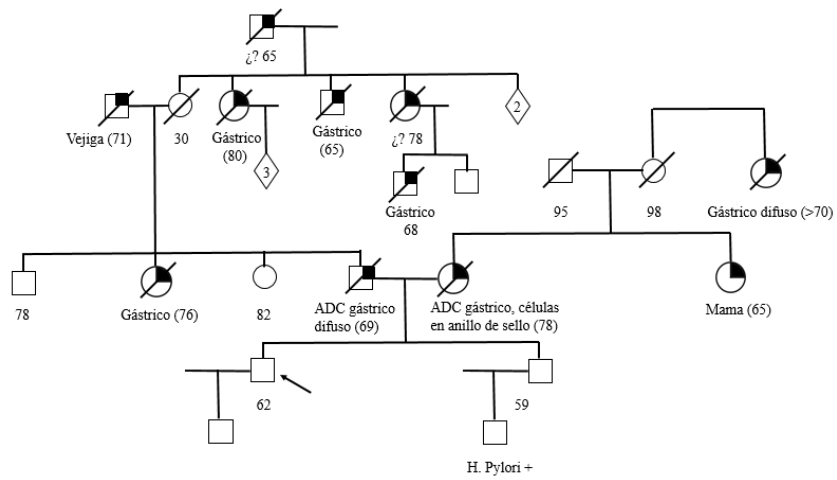


Figura 15. Familia 6.

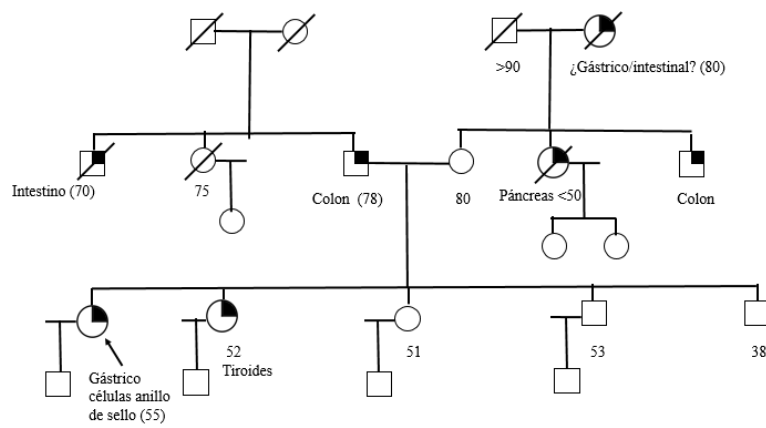


Figura 16. Familia 7.

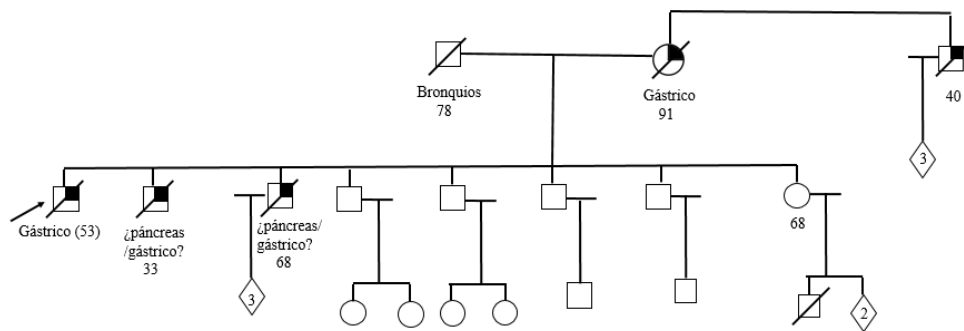


Figura 17. Familia 8.

Para analizar el gen *CDHI* se utilizaron las técnicas de amplificación por PCR, secuenciación directa y MLPA. Estas técnicas han permitido detectar variantes germinales en las 8 familias de estudio (figuras 10-17). Las 5 mutaciones encontradas se han catalogado previamente en la literatura como polimorfismos, a excepción de una de ellas, que se trata de una variante de significado clínico desconocido.

1.1 POLIMORFISMOS NEUTRALES

Los polimorfismos neutrales son variantes que se encuentran en la población general con una frecuencia superior al 1%. En este grupo se incluyen las mutaciones silenciosas, las mutaciones intrónicas relativamente alejadas de las regiones codificantes y las de cambio de aminoácido que no producen cambios ni en la funcionalidad ni en la estructura proteica.

En este trabajo hemos encontrado 4 polimorfismos neutrales en el gen *CDHI*, de las cuales 3 eran mutaciones silenciosas, localizadas en la secuencia codificante del gen y 1 era una variante situada en la región intrónica.

- VARIANTES SILENCIOSAS

Se trata de mutaciones en las que se produce una sustitución de un nucleótido por otro en un determinado codón, sin producirse un cambio de aminoácido. En este estudio hemos encontrado un total de 3 mutaciones silenciosas, descritas en la tabla 4.

Tabla 4. Mutaciones silenciosas encontradas en el gen *CDHI*.

Mutación	Exón	Efecto en la proteína	Pacientes en los que aparece	Referencia bibliográfica
c.88C>A	2	P30T	1	(Schrader et al., 2011)
c.1849G>A	12	A617T	1	(Risinger et al., 1994)
c.2076C>T	13	A692A	6	(F. Graziano et al., 2003)

Estas variantes silenciosas se encontraron en 7 probandos diferentes, pertenecientes a las familias 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7.

- VARIANTES INTRÓNICAS

En las variantes intrónicas se produce un cambio en nucleótidos localizados en regiones no codificantes del gen. Estas mutaciones pueden encontrarse en regiones alejadas de los exones, las cuales no suelen afectar al procesamiento de la proteína, o en las regiones flanqueantes de los exones, lo que puede afectar al procesamiento de la proteína, dando lugar a proteínas truncadas.

En este estudio hemos encontrado una variante intrónica en 7 pacientes distintos, pertenecientes a las familias 1, 3, 4, 5, 6, 7 y 8.

Tabla 5. Mutaciones intrónicas encontradas en el gen *CDHI*.

Mutación	Intrón	Pacientes en los que aparece	Referencia bibliográfica
c.48+6C>T	1	7	(Humar et al., 2002)

1.2. VARIANTES DE SIGNIFICADO CLÍNICO DESCONOCIDO

Se trata de mutaciones que aún no se encuentran descritas en la bibliografía, de manera que se desconoce el efecto que producen en la proteína. En este trabajo hemos encontrado una mutación de significado clínico desconocido en la que se produce un cambio de aminoácido, de serina por alanina (tabla 6).

Tabla 6. Variantes de significado clínico desconocido encontradas en el gen *CDHI*

Mutación	Codón	Exón
c.1521C>A	p.Ser507Ala	10

2. REVISIÓN DE CASOS DE PACIENTES CON CÁNCER GÁSTRICO

Para ampliar el estudio del gen *CDHI*, además de realizar el estudio de este gen en los pacientes derivados a la Unidad de Consejo Genético del Servicio de Oncología del Hospital Universitario de Salamanca desde septiembre de 2019 hasta marzo de 2020, también se realizó una revisión del historial de 85 pacientes a los que previamente se les había realizado el estudio de dicho gen en años anteriores.

De estos 85 pacientes, 33 eran hombres y 52 eran mujeres. En cuanto a la historia familiar, el 2.35% de familias presentaban mutaciones patogénicas, el 5.88% variantes de significado clínico desconocido y en el 91,77% no se encontró ninguna mutación.

De estas 85 familias estudiadas, un 24.7% fueron diagnosticadas de GC (en un 11.76% de estas se especifica que se trata de DGC, mientras que en el 12.94% restante no se especifica de qué tipo de tumor gástrico se trata), un 16.47% de las familias fueron diagnosticadas de GC sumado a cáncer de mama (en un 5.88% de estas se especifica que se trata de DGC, mientras que en el 10.59% restante no se especifica de qué tipo de tumor digestivo se trata), el 9.41% de las familias presenta GC sumado a cáncer de colon y el 49.41% de familias presentan GC sumado a otro tipo de tumores.

En cuanto a los genes estudiados, se estudió el gen *CDHI* en todas las familias. Además, en aquellas familias que presentaban una elevada carga familiar de otro tipo de tumores, también se habían estudiado los genes asociados a estos tumores, sin encontrar mutaciones patogénicas en ninguno de ellos. A un 16.47% de las familias, además del gen *CDHI* se les estudió HNPCC, al 2.35% se les estudiaron los genes *CDHI*, *BRCA1* y *BRCA2*, al 1.18% se les estudiaron los genes *CDHI* y *APC* y al 1.18% restante se les estudiaron los genes *CDHI* y *P53*.

Solamente se encontraron **mutaciones patogénicas** en *CDHI* en 2 de los 85 probandos.

- **c.1137G>A**, localizada en el exón 8, que produce un procesamiento anómalo del mRNA. Esta mutación fue encontrada en una mujer diagnosticada de DGC a los 25 años. Su padre fue diagnosticado de DGC a los 49 años, su abuela paterna fue diagnosticada de GC a los 35 años.
- **c.1835_1836delTA/p.I612kfsX**, localizada en el exón 12, produce un codón de parada en posición 615. Esta mutación se encontró en una mujer diagnosticada de GC a los 42 años. 4 de sus hermanas fueron diagnosticadas de cáncer: una de ellas cáncer de ovario a los 66 años, otra cáncer de mama a los 64 años, otra cáncer de mama a los 58 y a los 63 años y otra GC a los 51 años. Su sobrina fue diagnosticada de cáncer de mama a los 47 años, su hermano fue diagnosticado de cáncer de colon a los 80 años, su madre de cáncer de mama a los 77 y a los 83 años y su tía materna de cáncer de mama a los 45 años.

También se encontraron 5 **variantes de significado clínico desconocido**:

- **c.2028C>G**, localizada en el exón 13 del gen. Se encontró en una paciente diagnosticada de GC a los 45 años. Su hermano fue diagnosticado de GC a los 35 años y su abuela paterna fue diagnosticada de GC a los 70 años.
- **c.221G>A**, localizada en el exón 3 del gen *CDHI*. La muestra pertenecía a un varón diagnosticado de GC a los 56 años. Su madre tuvo cáncer de colon a los 61 años, su tío materno GC con menos de 50 años y su abuela materna fue diagnosticada de GC joven.
- **c.2558C>T**, localizada en el exón 16. Se encontró en una mujer diagnosticada de GC y cáncer renal a los 60 años. Su padre tuvo GC a los 73 años y su tío paterno GC con menos de 70

años. 2 tíos y una tía maternos también fueron diagnosticados de GC y su primo materno fue diagnosticado de un tumor cerebral.

- **c.2590G>A**, localizada en el exón 16 de una mujer diagnosticada de DGC a los 42 años. Su hermano tuvo GC a los 60 años, a su sobrino le diagnosticaron una enfermedad inflamatoria intestinal a los 48 años y su abuela paterna tuvo GC a los 60 años.
- **c.2266G>T** fue encontrada en un hombre diagnosticado de GC con células en anillo de sello a los 39 años, cuyo padre fue diagnosticado de DGC a los 62 años.

En base a esta revisión, se decidió realizar un análisis de grandes reordenamientos genómicos en el gen *CDH1* en 19 pacientes diagnosticados de CG y con una alta carga familiar de tumores gástricos u otros tumores asociados a mutaciones en dicho gen.

3. ANÁLISIS DE GRANDES REORDENAMIENTOS GENÓMICOS DEL GEN *CDH1*

De los 19 pacientes a los que se les realizó el estudio, 12 fueron diagnosticados de DGC; 2 pacientes tenían cáncer de mama lobulillar y antecedentes familiares de DGC; 2 padecían IGC, con antecedentes familiares de DGC; 1 de ellos fue diagnosticado de cáncer de próstata (los familiares con DGC habían fallecido); 1 tenía cáncer de mama triple negativo y familiares diagnosticados de DGC y otro era paciente sano con numerosos antecedentes familiares de GC y DGC.

Este estudio se realizó por duplicado mediante la técnica de MLPA, siendo el electroferograma normal para todos ellos (figura 18).

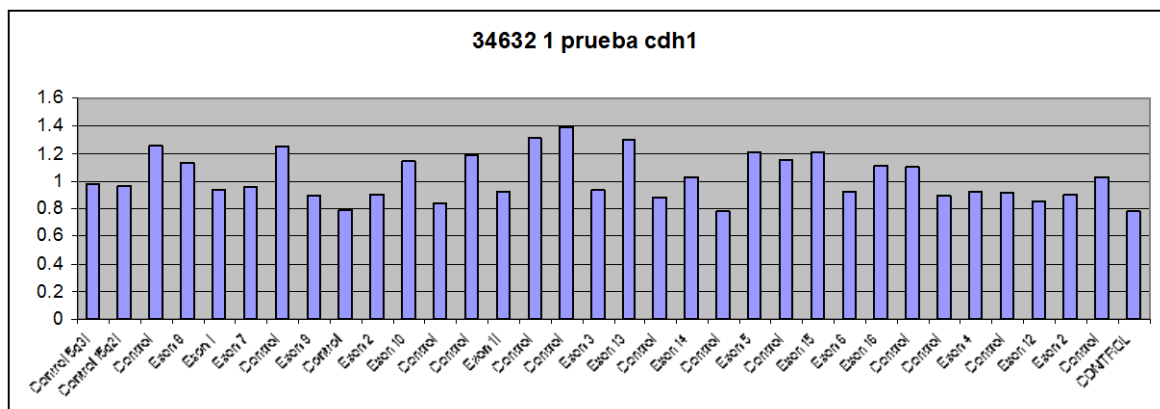


Figura 18. Electroferograma de uno de los probandos. Se consideran normales los valores próximos al 1, mientras que en los valores inferiores a 0,5 se considera que hay una delección de uno de los alelos y en los superiores a 1,5 se considera que hay una amplificación de uno de los alelos.

En el caso de que se hubiese encontrado alguna alteración en el electroferograma de alguno de ellos se habría realizado como prueba complementaria la PCR cuantitativa a tiempo real (q-PCR), ya que

la técnica de MLPA tiene baja reproductibilidad. Con esta técnica se podría amplificar el fragmento del gen en el que se hubiese observado la alteración, lo que nos permitiría confirmar que hubiese realmente una amplificación o una delección en algún fragmento del gen.

V. DISCUSIÓN

Se han realizado numerosos estudios del gen *CDH1*, los cuales han revelado más de 100 mutaciones germinales, que abarcan toda la longitud del gen (figura 19), a diferencia de los cánceres gástricos producidos por mutaciones somáticas esporádicas, en los que se ha visto que estas alteraciones suelen localizarse en los exones 7 y 8 (Molinario et al., 2014; Norero Muñoz, 2019).

En este trabajo hemos estudiado el gen *CDH1* en 8 pacientes diagnosticados de DGC, derivados de la Unidad de Consejo Genético del Servicio de Oncología del Hospital Universitario de Salamanca.

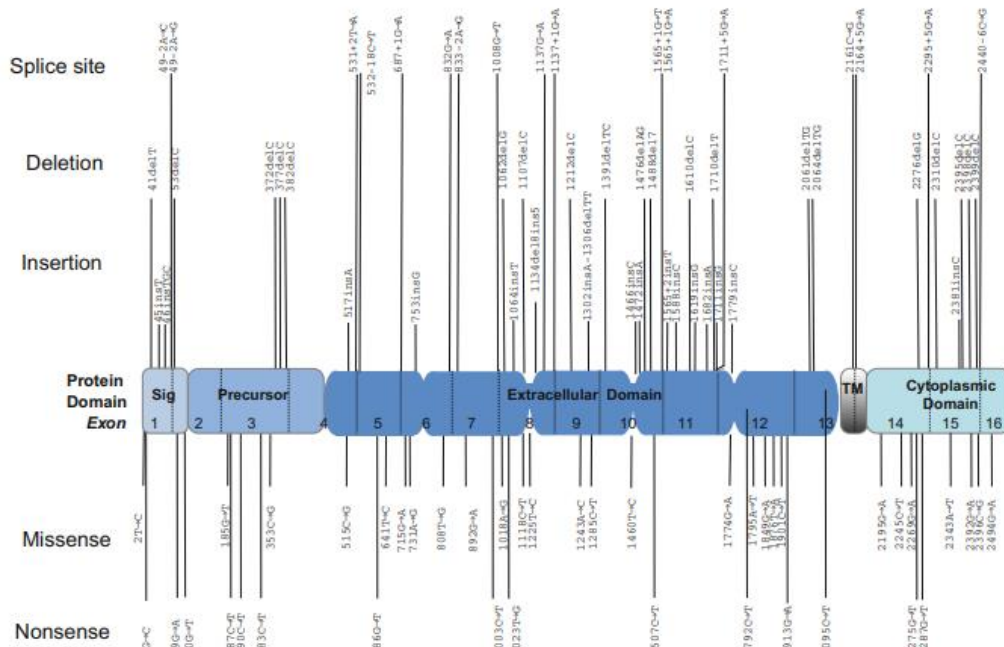


Figura 19. Localización de las mutaciones del gen *CDH1* en HDGC (Guilford et al., 2010).

1. ESTUDIO DE MUTACIONES EN EL GEN *CDH1*

El estudio de estos probandos diagnosticados de DGC nos ha permitido encontrar un total de 5 variantes diferentes. De todas estas, 4 se encuentran descritas en la bibliografía y ninguna de ellas ha sido considerada patogénica, de manera que se trata de polimorfismos que no aumentan el riesgo a desarrollar la enfermedad. La variante restante no se encuentra descrita en la bibliografía, por lo que se trata de una variante de significado clínico desconocido y, por consiguiente, no podemos estar

seguros de si se trata de una mutación patogénica o no. A pesar de esto, tanto los programas de predicción como las bases de datos predicen que esta variante probablemente no sea patogénica.

En base a los resultados obtenidos en otros estudios (Hartgrink et al., 2009), esperábamos encontrar alguna mutación patogénica en el gen *CDHI*, puesto que los probandos a los que se les estudió el gen eran claros candidatos de padecer HDGC. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el número de pacientes incluido en el estudio (8) no es muy elevado, y no se pudo ampliar debido a la crisis sanitaria causada por el COVID-19.

- VARIANTES ENCONTRADAS EN EL GEN *CDHI*

En este estudio hemos identificado 4 polimorfismos neutrales: 3 variantes silenciosas y un cambio intrónico. Además, hemos encontrado también una variante de significado clínico desconocido.

A. VARIANTES SILENCIOSAS

Dentro de las variantes silenciosas, la que aparece con mayor frecuencia es **c.2076C>T**, localizada en el exón 13, que aparece en 6 de los 8 probandos estudiados. Las otras 2 variantes silenciosas identificadas en este trabajo aparecen con la misma frecuencia (tan solo aparece en 1 de los 8 pacientes), y son las variantes **c.88C>A**, en el exón 2 y **c.1849G>A**, situada en el exón 12.

Las mutaciones c.88C>A y c.2076C>T aparecen descritas en numerosos estudios, en los que se concluye que se trata de variantes silenciosas y que por consiguiente, la actividad de la proteína E-cadherina no se verá afectada por este cambio de nucleótido (Ascão et al., 2001; Molinaro et al., 2014).

La mutación c.1849G>A también se encuentra descrita en la bibliografía y en todos los estudios realizados se ha considerado un polimorfismo, puesto que aparece en más de un 1% de la población control (Ascão et al., 2001; Corso et al., 2012; Hansford et al., 2015).

B. VARIANTES INTRÓNICAS

Respecto a las variantes intrónicas, en este trabajo solamente hemos encontrado una: **c.48+6C>T**, que aparece en 7 de los 8 probandos analizados.

Como sucede con las mutaciones silenciosas, las mutaciones intrónicas se consideran polimorfismos por consenso, si bien, esto podría cambiar en un futuro debido a que se han descubierto secuencias reguladoras de la maduración y la vida media del mRNA en secuencias intrónicas alejadas de los sitios de procesamiento. Es por esto que no podemos descartar que estas mutaciones puedan tener algún efecto sobre el procesamiento o la estabilidad del RNA.

La variante intrónica que hemos encontrado en este trabajo ha sido considerada como un polimorfismo, dada la frecuencia con la que aparece en la población estudiada y la lejanía a los sitios de consenso. Aun así, para descartar que esta variante sea patogénica, se deberían realizar estudios de maduración del RNA.

C. VARIANTES DE SIGNIFICADO CLÍNICO DESCONOCIDO

La mutación **c.1521C>A**, localizada en el exón 10, no se encuentra descrita en ninguna publicación anterior por otros grupos. Según los datos ofrecidos por ClinVar (NCBI) se trataría de una mutación no patogénica, de manera que no producirá un aumento del riesgo a desarrollar DGC. Además, los programas de predicción utilizados (P-Mut y PolyPhen) catalogan esta variante como probablemente neutral, es decir, no afecta a la función de la proteína. Sin embargo, para poder catalogar esta variante sería necesario realizar estudios funcionales.

Tabla 7. Estudio bioinformático de la variante c.1521C>A

Variante	PMut	PolyPhen
c.1521C>A	Neutral (0.31) (89%)	Benigna

2. ANÁLISIS DE GRANDES REORDENAMIENTOS GENÓMICOS

En este estudio se han analizado grandes reordenamientos genómicos del gen *CDHI* en 19 pacientes diagnosticados de DGC con alta carga familiar de este tipo de tumor. En ninguno de ellos se observaron amplificaciones o deleciones en los exones del gen *CDHI*, todos mostraban un electroferograma normal.

Todos los pacientes a los que se les realizó el estudio de grandes reordenamientos genómicos eran candidatos claros a portar mutaciones germinales en el gen *CDHI*, de manera que era esperable encontrar mutaciones patogénicas asociadas a este gen

Con respecto a la revisión realizada, de todos los pacientes remitidos a la consulta de Consejo Genético del Hospital Universitario de Salamanca con sospecha de HDGC, solo se identificaron 2 familias portadoras de mutación patogénica en el gen *CDHI*, lo que supone un 2.35%. Comparado con otros estudios publicados en la bibliografía, donde se demuestra que aproximadamente el 30% de los casos de GC familiar existe una mutación germinal en uno de los alelos del gen *CDHI* (Hartgrink et al., 2009), en nuestra cohorte de pacientes el porcentaje de mutaciones patogénicas encontradas en este gen fue mucho menor. Esto puede deberse a que los criterios de inclusión para realizar test genéticos son poco estrictos, por lo que convendría repararlos en base a la experiencia

adquirida. También puede deberse a que en muchos casos se desconoce si el cáncer gástrico es de tipo difuso o intestinal. En las familias diagnosticadas de GC con un elevado número de mujeres con cáncer de mama lobulillar no se identificó ninguna mutación patogénica en este gen. Esto puede deberse a que solamente en un 5.8% de estas familias se especifica que se trata de DGC o a que en nuestro estudio el porcentaje de mujeres con cáncer de mama lobulillar es poco representativo.

A los pacientes que presentaban una elevada carga familiar de otro tipo de tumores se les realizó un estudio de los genes asociados a dichos tumores, sin encontrar ninguna mutación patogénica. Todo esto pone de manifiesto la necesidad de estudiar un panel de genes en estos pacientes con la finalidad de identificar genes de menor penetrancia.

VI. CONCLUSIONES

1. El número de pacientes con sospecha de HDGC derivados a la Unidad de Consejo Genético que presentaron mutaciones en *CDHI* es muy inferior al descrito en la bibliografía. Esto nos lleva a pensar que los criterios de selección de pacientes tendría que ser más estricto con el fin de optimizar el rendimiento de los test genéticos.
2. No se observaron mutaciones patogénicas en ninguno de los probandos del estudio, lo cual puede deberse al reducido número de pacientes, además de que la incidencia de GC varía en función de la región geográfica.
3. Es muy importante realizar test genéticos a pacientes o familias con sospecha de HDGC para poder prevenir la aparición del mismo o detectarlo en un estadio temprano de la enfermedad.
4. Ninguno de los pacientes a los que se les realizó el estudio de grandes reordenamientos genómicos portaba mutaciones patogénicas asociadas al gen *CDHI*. Además, los pacientes cuyas familias mostraban una alta carga de tumores de otro tipo tampoco eran portadores de mutaciones patogénicas asociadas a esos genes. Esto confirma la necesidad de estudiar un panel amplio de genes en estos pacientes para poder identificar mutaciones en genes de menor penetrancia.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Ansari, S., Gantuya, B., Tuan, V. P., & Yamaoka, Y. (2018). Diffuse gastric cancer: A summary of analogous contributing factors for its molecular pathogenicity. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19082424>
2. Ascão, J. J., Frierson, H., Moskaluk, C. A., Harper, J. C., Roviello, F., Jackson, C. E., El-Rifai, W., Vindigni, C., Tosi, P., & Powell, S. M. (2001). Inactivation of the E-cadherin gene in sporadic diffuse-type gastric cancer. *Modern Pathology*, *14*(10), 942–949. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3880416>
3. Benusiglio, P. R., Malka, D., Rouleau, E., Pauw, A. De, Buecher, B., Noguès, C., Fourme, E., Colas, C., Coulet, F., Warcoin, M., Grandjouan, S., Sezeur, A., Laurent-Puig, P., Molière, D., Tlemsani, C., Maria, M. Di, Byrde,

- V., Delaloge, S., Blayau, M., & Caron, O. (2013). CDH1 germline mutations and the hereditary diffuse gastric and lobular breast cancer syndrome: A multicentre study. *Journal of Medical Genetics*, 50(7), 486–489. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-101472>
4. *Cáncer Gástrico Difuso Hereditario*. (n.d.). Retrieved April 3, 2020, from https://rarediseases.info.nih.gov/files/cancer_gastrico_difuso_hereditario.html
 5. Christgen, M., Steinemann, D., Kühnle, E., Länger, F., Gluz, O., Harbeck, N., & Kreipe, H. (2016). Lobular breast cancer: Clinical, molecular and morphological characteristics. In *Pathology Research and Practice* (Vol. 212, Issue 7, pp. 583–597). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2016.05.002>
 6. Corso, G., Intra, M., Trentin, C., Veronesi, P., & Galimberti, V. (2016). CDH1 germline mutations and hereditary lobular breast cancer. In *Familial Cancer* (Vol. 15, Issue 2, pp. 215–219). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s10689-016-9869-5>
 7. Corso, G., Marrelli, D., Pascale, V., Vindigni, C., & Roviello, F. (2012). Frequency of CDH1 germline mutations in gastric carcinoma coming from high- and low-risk areas: Metanalysis and systematic review of the literature. *BMC Cancer*, 12(1), 8. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-8>
 8. Dossus, L., & Benusiglio, P. R. (2015). Lobular breast cancer: Incidence and genetic and non-genetic risk factors. *Breast Cancer Research*, 17(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s13058-015-0546-7>
 9. Eusebi, L. H., Telese, A., Marasco, G., Bazzoli, F., & Zagari, R. M. (2020). Gastric cancer prevention strategies: a global perspective. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, jgh.15037. <https://doi.org/10.1111/jgh.15037>
 10. F. Graziano, B. H. & P. G. (2003). *The role of the E-cadherin gene (CDH1) in diffuse gastric cancer susceptibility: from the laboratory to clinical practice - ScienceDirect*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923753419642419>
 11. Globocan. (2018). *Stomach*. <http://gco.iarc.fr/today>
 12. Grávalos, D. cristina. (2020). *Cáncer gástrico - SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica © 2019*. <https://seom.org/info-sobre-el-cancer/estomago?showall=1>
 13. Guilford, P., Humar, B., & Blair, V. (2010). Hereditary diffuse gastric cancer: translation of CDH1 germline mutations into clinical practice. *Gastric Cancer*, 13, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s10120-009-0531-x>
 14. Hansford, S., Kaurah, P., Li-Chang, H., Woo, M., Senz, J., Pinheiro, H., Schrader, K. A., Schaeffer, D. F., Shumansky, K., Zogopoulos, G., Santos, T. A., Claro, I., Carvalho, J., Nielsen, C., Padilla, S., Lum, A., Talhouk, A., Baker-Lange, K., Richardson, S., ... Huntsman, D. G. (2015). Hereditary diffuse gastric cancer syndrome: CDH1 mutations and beyond. *JAMA Oncology*, 1(1), 23–32. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2014.168>
 15. Hartgrink, H. H., Jansen, E. P., van Grieken, N. C., & van de Velde, C. J. (2009). Gastric cancer. In *The Lancet* (Vol. 374, Issue 9688, pp. 477–490). NIH Public Access. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60617-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60617-6)
 16. Humar, B., Toro, T., Graziano, F., Müller, H., Dobbie, Z., Kwang-Yang, H., Eng, C., Hampel, H., Gilbert, D., Winship, I., Parry, S., Ward, R., Findlay, M., Christian, A., Tucker, M., Tucker, K., Merriman, T., & Guilford, P. (2002). Novel germline CDH1 mutations in hereditary diffuse gastric cancer families. *Human Mutation*, 19(5), 518–525. <https://doi.org/10.1002/humu.10067>
 17. Johnson, K., Sarma, D., & Hwang, E. S. (2015). Lobular breast cancer series: Imaging. In *Breast Cancer Research* (Vol. 17, Issue 1, p. 94). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13058-015-0605-0>
 18. Ma, J., Shen, H., Kapesa, L., & Zeng, S. (2016). Lauren classification and individualized chemotherapy in gastric cancer (Review). In *Oncology Letters* (Vol. 11, Issue 5, pp. 2959–2964). Spandidos Publications.

<https://doi.org/10.3892/ol.2016.4337>

19. Molinaro, V., Pensotti, V., Marabelli, M., Feroce, I., Barile, M., Pozzi, S., Laghi, L., Serrano, D., Bernard, L., Bonanni, B., & Ranzani, G. N. (2014). Complementary molecular approaches reveal heterogeneous CDH1 germline defects in Italian patients with hereditary diffuse gastric cancer (HDGC) syndrome. *Genes Chromosomes and Cancer*, 53(5), 432–445. <https://doi.org/10.1002/gcc.22155>
20. Montagna, E., Pirola, S., Maisonneuve, P., De Roberto, G., Cancellato, G., Palazzo, A., Viale, G., & Colleoni, M. (2018). Lobular Metastatic Breast Cancer Patients With Gastrointestinal Involvement: Features and Outcomes. *Clinical Breast Cancer*, 18(3), e401–e405. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2017.07.003>
21. Norero Muñoz, E. (2019). Hereditary gastric cancer. Indications of genetic study. When and to whom? *Revista de Cirugía*, 71(5), 458–467. <https://doi.org/10.35687/s2452-45492019005535>
22. Risinger, J. I., Berchuck, A., Kohler, M. F., & Boyd, J. (1994). Mutations of the E-cadherin gene in human gynecologic cancers. *Nature Genetics*, 7(1), 98–102. <https://doi.org/10.1038/ng0594-98>
23. Schrader, K. A., Masciari, S., Boyd, N., Salamanca, C., Senz, J., Saunders, D. N., Yorlida, E., Maines-Bandiera, S., Kaurah, P., Tung, N., Robson, M. E., Ryan, P. D., Olopade, O. I., Domchek, S. M., Ford, J., Isaacs, C., Brown, P., Balmana, J., Razzak, A. R., ... Huntsman, D. G. (2011). Germline mutations in CDH1 are infrequent in women with early-onset or familial lobular breast cancers. *Journal of Medical Genetics*, 48(1), 64–68. <https://doi.org/10.1136/jmg.2010.079814>
24. SEOM. (2019). *Las cifras del cáncer en España*. www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-epidemiologia-am-
25. Stokłosa, P., Borgström, A., Kappel, S., & Peinelt, C. (2020). TRP channels in digestive tract cancers. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 5, p. 1877). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21051877>
26. Strong, V. E. (2018). Progress in gastric cancer. In *Updates in Surgery* (Vol. 70, Issue 2, pp. 157–159). Springer-Verlag Italia s.r.l. <https://doi.org/10.1007/s13304-018-0543-3>
27. Thomas, M., Kelly, E. D., Abraham, J., & Kruse, M. (2019). Invasive lobular breast cancer: A review of pathogenesis, diagnosis, management, and future directions of early stage disease. In *Seminars in Oncology* (Vol. 46, Issue 2, pp. 121–132). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2019.03.002>