



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Análisis de variantes genéticas en una familia con diagnóstico clínico de cáncer hereditario de síndrome de Li-Fraumeni like mediante panel de secuencia de nueva generación**

**Solangy Usme Romero**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina, Maestría de Genética Humana  
Bogotá D.C., Colombia

2024

# **Análisis de variantes genéticas en una familia con diagnóstico clínico de cáncer hereditario de síndrome de Li-Fraumeni like mediante panel de secuencia de nueva generación**

**Solangy Usme Romero**

Tesis presentada como requisito para optar al título de:

**Magister en Genética Humana**

Director:

MD., MSc. Juan José Yunis Londoño

Codirectora:

MD., MSc., Ph.D.(c) Luz Karime Yunis Hazbun

Asesora:

MD. Maria Luz Lara Márquez

Grupo de Investigación:

Patología Molecular

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Maestría de Genética Humana

Bogotá D.C., Colombia

2024

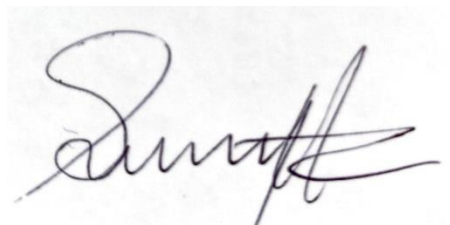
## Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



---

Solangy Usme Romero

C.C 1018408177

Fecha: 20 de enero de 2024

## Resumen

### **Análisis de variantes genéticas en una familia con diagnóstico clínico de cáncer hereditario de síndrome de Li-Fraumeni like mediante panel de secuencia de nueva generación**

El síndrome de Li-Fraumeni es uno de los síndromes de cáncer hereditario que engloban el 5-10% de todos los cánceres y se relacionan con variantes patogénicas que son heredadas en línea familiar y aumentan significativamente el riesgo de cáncer, tiene una prevalencia aproximada de 1:3.555 a 1:5.476 personas en todo el mundo, con una alta variabilidad interregional, en Colombia se desconoce esta información. La enfermedad se presenta en dos formas clínicas a saber el síndrome de Li-Fraumeni clásico (LFS) y el síndrome de Li-Fraumeni like (LFL), cuyos criterios clínicos de clasificación difieren, ya que en este último la prevalencia de variantes germinales en el gen *TP53* es menor y su aparición está probablemente relacionada a otros genes alterados. Las tasas de detección de variantes en *TP53* varían de 55 al 70% cuando se cumplen los criterios de clasificación clásicos, 25% a 30% en los criterios de LFL y del 20% al 35% en los criterios de Chompret. Esto significa que hasta el 45% de los pacientes que cumplen los criterios clásicos de LFS y hasta el 80% de los pacientes que cumplen los criterios de Chompret o LFL quedan sin explicación genética. El objetivo de este estudio fue caracterizar variantes genéticas en línea germinal en una familia con diagnóstico clínico de cáncer hereditario LFL mediante panel de secuencia de nueva generación (NGS) y ampliado con exoma completo en el caso índice. No se identificaron variantes patogénicas, probablemente patogénicas ni de significado clínico incierto (VUS) en el gen *TP53* ni el ninguno de los genes candidatos que se han relacionado con el fenotipo de LF. Entre los posibles mecanismos no evaluados que podrían contribuir al fenotipo se encuentran: metilación de regiones promotoras de *TP53*, variantes profundas intrónicas o en regiones reguladoras de *TP53* y alteraciones en la expresión de isoformas de *TP53*, por lo que habría que realizarse estudios adicionales que permitan dar una explicación a la aparición de este fenotipo familiar.

**Palabras clave:** Li-Fraumeni like, secuencia de nueva generación (NGS), cáncer hereditario.

## Abstract

### **Analysis of genetic variants in a family with clinical diagnosis of hereditary cancer of Li-fraumeni-like syndrome using next-generation sequencing panel**

Li-Fraumeni syndrome is one of the hereditary cancer syndromes that account for 5-10% of all cancers and is related to pathogenic variants inherited within family, increasing the risk of cancer significantly. It has an approximate prevalence of 1:3,555 to 1:5,476 people worldwide, with high interregional variability. In Colombia, this information is unknown. The disease occurs in two clinical forms: classic Li-Fraumeni syndrome (LFS) and Li-Fraumeni-like syndrome (LFL), which have different clinical classification criteria. In LFL, the prevalence of germline variants in the *TP53* gene is lower, and its occurrence is likely related to other altered genes. Detection rates for *TP53* variants range from 55% to 70% when classical classification criteria are met, 25% to 30% for LFL criteria, and 20% to 35% for Chompret criteria. This means that up to 45% of patients meeting classical LFS criteria and up to 80% of patients meeting either Chompret or LFL criteria remain genetically unexplained. The aim of this study was to characterize germline genetic variants in a family with a clinical diagnosis of hereditary LFL cancer using a whole-exome-expanded next-generation sequencing (NGS) panel in the index case. No pathogenic, likely pathogenic or uncertain clinical significance (VUS) variants were identified in the *TP53* gene or any of the candidate genes linked to the FL phenotype. Possible unevaluated mechanisms that could contribute to the phenotype include methylation of *TP53* promoter regions, deep intronic variants or variants in *TP53* regulatory regions, and alterations in the expression of *TP53* isoforms. Therefore, additional studies should be performed to provide an explanation for the occurrence of this familial phenotype.

**Keywords:** Li-Fraumeni like, next-generation sequencing (NGS), hereditary cancer.

## Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
LFL	Síndrome de Li-Fraumeni
LFL	Síndrome de Li-Fraumeni like
LFS	Síndrome de Li-Fraumeni clásico
NGS	Secuencia de nueva generación
VUS	Variante de significado clínico incierto
P/LP	Patogénica/probablemente patogénica
PV	Variante patogénica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
CCR	Cáncer colorrectal
VAF	Frecuencia alélica de la variante
PAF	Poliposis adenomatosa familiar
MAP	Poliposis asociada al gen <i>MUTYH</i>
ER	Receptor de estrógeno
PR	Receptor de progesterona
MMR	Sistema de reparación de los errores de la replicación del DNA
MSI	Inestabilidad de microsatélites
ESE	<i>Enhancers</i> del <i>splicing</i> exónico
ESS	Silenciadores del <i>splicing</i> exónico
SR	Serina/arginina
ARN	Ácido ribonucleico
CAS	Angiosarcoma cardiaco
NCCN	Red Nacional Integral del Cáncer
ACMG/AMP	Colegio Americano de Genética Médica y Genómica y la Asociación de Patología Molecular
MLPA	Amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples
LR-PCR	PCR de largo alcance

## Agradecimientos

Al doctor Juan José Yunis Londoño por acompañarme y apoyarme a lo largo de mi desarrollo profesional, por ser un ejemplo a seguir y por ser más que un maestro, una gran persona a la que le agradezco la pasión por la genética. Gracias por una vez más tomar la dirección de mi trabajo de grado, esta vez en posgrado.

A la Dra. Maria Luz Lara Marquez por facilitar las muestras e historia clínica de la familia estudiada.

A mis padres por brindarme siempre su apoyo incondicional y ser la motivación durante todo mi recorrido académico. Sin su esfuerzo, amor y sabios consejos, la realización de este logro no hubiera sido posible.

A los profesores de la Maestría en Genética Humana de la Universidad Nacional, por transmitirme sus valiosos conocimientos que me llevarán a convertirme en una gran genetista.

A mi amado esposo, por todo su amor, por acompañarme en los mejores y peores momentos. Gracias por siempre confiar en mí, por su paciencia, comprensión y palabras de aliento durante las largas horas de trabajo.

# Tabla de contenido

<b>Resumen</b> .....	<b>IV</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>V</b>
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	<b>VI</b>
<b>1. Justificación</b> .....	<b>IX</b>
<b>2. Problema de Investigación</b> .....	<b>X</b>
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>XII</b>
3.1 Objetivo General .....	XII
3.2 Objetivos Específicos.....	XII
<b>4. Marco Teórico</b> .....	<b>13</b>
4.1 Cáncer hereditario .....	13
4.2 Síndromes de cáncer hereditario .....	13
4.3 Síndrome de Li-Fraumeni .....	15
4.4 Gen <i>TP53</i> .....	16
4.5 Metilación de TP53 .....	18
4.6 Otros genes asociados al síndrome de Li-Fraumeni .....	19
4.7 Criterios clínicos diagnósticos del LFS .....	20
4.8 Análisis por secuencia de nueva generación (NGS) .....	23
4.9 Panorama en Colombia .....	24
<b>5. Metodología</b> .....	<b>26</b>
5.1 Tipo de investigación .....	26
5.2 Descripción de los pacientes.....	26
5.3 Extracción de DNA, cuantificación y verificación de calidad .....	29
5.4 Panel genético de 111 genes relacionados con cáncer.....	29
5.5 Exoma completo individuo índice.....	31
5.6 Exoma dirigido: 157 genes relacionados con cáncer en caso índice.....	31
<b>6. Resultados</b> .....	<b>33</b>
6.1 Verificación de calidad .....	33
6.2 Análisis Panel de 111 Genes .....	36
6.3 Análisis de Exoma Completo en Individuo F9 .....	37
6.4 Panel Dirigido de 157 Genes en Individuo F9 .....	37
<b>7. Discusión</b> .....	<b>39</b>
<b>8. Conclusiones</b> .....	<b>42</b>
<b>9. Recomendaciones</b> .....	<b>43</b>
<b>10. Bibliografía</b> .....	<b>44</b>



## 1. Justificación

En Colombia y en general en los países latinoamericanos son limitadas las investigaciones relacionadas con la genética del cáncer hereditario que afecta hasta el 10% de la población (Garutti M., *et al.*, 2023) por lo que resulta de gran importancia realizar estudios que involucren individuos o familias con diagnóstico clínico de alguno de los síndromes de cáncer hereditario conocidos, uno de ellos es el síndrome de Li-Fraumeni con una prevalencia no clara, sin embargo se habla de 1:3.555 a 1:5.476 personas en todo el mundo (De Andrade, K. C., *et al.*, 2019), con una alta variabilidad interregional. En Colombia la prevalencia no es conocida.

El interés de este estudio es identificar variantes patogénicas, probablemente patogénicas o de significado clínico incierto en genes que se han relacionado y que generan susceptibilidad al cáncer hereditario de síndrome de Li-Fraumeni like y también dar sustento y evidencia científica a otros estudios que plantean nuevos genes candidatos para el porcentaje de casos en los que aún no existe una explicación genética. Estos estudios en poblaciones latinoamericanas permiten a futuro mejorar los sistemas de vigilancia y control en cáncer, así como tener mayor soporte científico para realizar una adecuada asesoría genética.

Otro punto de igual relevancia es el de visibilizar este tipo de estudios en el país, demostrando que técnicas novedosas como la secuencia de nueva generación se está realizando en Colombia con estándares de alta calidad y con resultados en menor tiempo y con costos equiparables a los de otros países.

## 2. Problema de Investigación

En Colombia son pocos los estudios publicados en relación a los cánceres heredofamiliares y resulta aún más evidente con el síndrome de Li-Fraumeni, por lo que se plantea el análisis de una familia de origen latino que cumple con los criterios clínicos para cáncer hereditario de síndrome de Li-Fraumeni like, con el fin de identificar variantes patogénicas o probablemente patogénicas en alguno de los genes relacionados con esta patología.

El riesgo de por vida de cáncer en individuos con LFS es  $\geq 70\%$  para hombres y  $\geq 90\%$  para mujeres. De forma general hay cinco tipos de cáncer que representan la mayoría de los tumores LFS, estos son: carcinoma adrenocortical, cáncer de mama, tumores del sistema nervioso central, osteosarcomas y sarcomas de tejidos blandos, pero también varios tipos de cáncer adicionales como la leucemia, linfoma, melanoma, cáncer gastrointestinal, cáncer de cabeza y cuello, riñón, laringe, pulmón, ovario, páncreas, próstata, testículo y tiroides (Schneider K., *et al.*, 1999).

Hasta el momento en Colombia se han publicado dos artículos reportes de caso en los que se identifican variantes patogénicas en línea germinal en *TP53*, el primero por Ossa *et al.* en el 2016 (Ossa CA., *et al.*, 2016), la variante c.527G>T (p.Cys176Phe) en una mujer de 31 años de edad, natural de Antioquia, con dos tumores sincrónicos un leiomioma de antebrazo y un tumor filoides de mama, con antecedente de un hijo con diagnóstico de carcinoma cortical suprarrenal a los tres años, que murió a los cinco años por la enfermedad, la abuela y bisabuela maternas murieron de cáncer gástrico a los 56 y 60 años, y su mamá y una hermana de su abuelo materno presentaron cáncer de mama entre los 40 a 60 años. El segundo reporte de caso por Cardona *et al.* en el 2018 informa la variante c.586C>T (p.Arg196\*) en una mujer que fue diagnosticada a los 12 años con osteosarcoma y a los 24 años se evidenciaron múltiples adenocarcinomas pulmonares primarios sincrónicos relacionados con la diseminación tumoral intraalveolar,

tenía historia familiar de cáncer de seno en madre a los 32 años y tías maternas con astrocitoma anaplásico y cáncer gástrico.

Se planteó este estudio con el objetivo de ampliar el panorama de investigación del síndrome de Li-Fraumeni haciendo uso de tecnología de secuencia nueva generación realizada en nuestro propio país.

## 3. Objetivos

### 3.1 Objetivo General

Caracterizar variantes genéticas en línea germinal en una familia con diagnóstico clínico de cáncer hereditario de síndrome de Li-Fraumeni like mediante panel de secuencia de nueva generación.

### 3.2 Objetivos Específicos

Caracterizar variantes genéticas con un panel de 111 genes asociados con predisposición al cáncer hereditario usando secuencia de nueva generación en 7 miembros afectados de una familia con diagnóstico clínico de síndrome de Li-Fraumeni like.

Evaluar la patogenicidad de las variantes identificadas en línea germinal en 7 miembros de una familia con diagnóstico clínico de síndrome de Li-Fraumeni like mediante criterios del ACMG/AMP y herramientas de predicción *in silico*.

Realizar análisis de segregación en una familia con diagnóstico clínico de síndrome de Li-Fraumeni like de las variantes encontradas en afectados para identificar posibles portadores mediante amplificación por PCR y secuenciación Sanger de la variante específica.

Brindar asesoría genética a portadores con el fin de evaluar riesgos y hacer recomendaciones de seguimiento.

## 4. Marco Teórico

### 4.1 Cáncer hereditario

El cáncer es una enfermedad genética dada por variantes en el DNA que pueden ser somáticas (adquiridas) o en línea germinal (hereditarias) estas últimas se relacionan con los síndromes de cáncer hereditario que engloban del 5-10% de todos los cánceres y se relacionan con variantes patogénicas que son heredadas en línea familiar y aumentan significativamente el riesgo de cáncer (Grissom, A. A., & Friend, P. J., 2016).

Es posible sospechar de la presencia de cáncer hereditario en un individuo si presenta enfermedad de inicio a temprana edad, cánceres primarios múltiples en el mismo órgano o en diferentes órganos, enfermedad bilateral en órganos pareados, enfermedad multifocal o afectación del sexo generalmente no afectado. De igual forma en un grupo familiar es posible sospecharlo si hay dos o más miembros en primer grado que presenten cáncer en la misma zona, o tipos de cáncer que hacen parte de un síndrome de cáncer hereditario, cánceres raros o evidencia de herencia autosómica dominante con penetrancia incompleta (Kulkarni A., & Carley H., 2016).

### 4.2 Síndromes de cáncer hereditario

Los principales síndromes de predisposición al cáncer en adultos se enuncian a continuación:

-Síndrome de cáncer de seno y ovario: La mayoría de los casos están relacionados a las variantes patogénicas en *BRCA1* y *BRCA2*, un número menor de casos tienen variantes en línea germinal de *RAD51C*, *PALB2*, *PTEN*, *TP53*, *CHEK2*, *BRIP1*, *CDH1* (Kasmintan A. *et al.*, 2015; Daly MB, *et al.*, 2021) entre otros, todos caracterizados por predisponer al desarrollo de cáncer de mama y ovario a edades más tempranas. La incidencia de cáncer de seno en Colombia para 2020 en mujeres de todas las edades fue 25.7%, equivalente a 15509 casos nuevos al año, de estos, alrededor del 10% estarían relacionados con cáncer hereditario es decir 1550 casos al año (Globocan 2020).

-Síndrome de Cowden: Tiene una herencia autosómico dominante, se caracteriza por múltiples hamartomas con alto riesgo de desarrollo de tumores benignos y malignos de tiroides, seno y endometrio. Se ha observado un mayor riesgo de cáncer de seno masculino de inicio temprano en los portadores de alguna variante patogénica (PV) relacionada con este síndrome, el gen asociado es el *PTEN* un gen supresor tumoral que media procesos de arresto celular y apoptosis (Garber JE., & Offit K., 2005; Pilarski R., 2009).

-Síndrome de Lynch: Sigue un patrón de herencia autosómico dominante y es el cáncer colorrectal (CCR) hereditario más frecuente que va entre el 0,9 y el 4% de los casos, genera un riesgo del 50% -80% para desarrollo de cáncer colorrectal a lo largo de la vida con una edad media de presentación de 44 años (Lynch H. T., & de la Chapelle A. 2003). También puede darse como cáncer extracolónico de manera que el riesgo de cáncer de endometrio a lo largo de la vida es de 30% a 60%, para el cáncer de seno 12,8% (Weiss JM., *et al.*, 2021), para el cáncer de urotelio un 8%, cáncer de intestino delgado y ovario entre 4% a 12%, cáncer gástrico y de páncreas 4% (Kasmintan A. *et al.*, 2015), entre otros. Está asociado a variantes patogénicas germinales y cambios epigenéticos en los genes de reparo al daño del DNA (MMR - *mismatch repair*): *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*. Estas variantes patogénicas conducen a una inestabilidad de microsatélites (MSI) en el DNA que llevan a la inactivación de genes supresores de tumor que contiene microsatélites en sus regiones codificadoras (Liu Y., *et al.*, 2019).

-Poliposis adenomatosa familiar (PAF): Sigue herencia autosómico dominante se caracteriza por el desarrollo de más de 100 pólipos de colon adenomatosos en la adolescencia con un riesgo resultante de CCR de aproximadamente el 90% a la edad de 45 años. Este síndrome se relaciona con la presencia de variantes en línea germinal en el gen *APC*. El 25% de las mutaciones son *de novo* (Kasmintan A. *et al.*, 2015).

-Poliposis asociada al gen *MUTYH* (MAP): Sigue un patrón de herencia autosómico recesivo. Hasta el 30% de los pacientes con adenomas múltiples que dan negativo para mutaciones en *APC* son portadores de mutaciones bialélicas en *MUTYH*, genera un riesgo de cáncer colorrectal de al menos el 50% a los 48 años (Kasmintan A. *et al.*, 2015; Garutti M., *et al.*, 2023).

### 4.3 Síndrome de Li-Fraumeni

Este síndrome apareció por primera vez en la literatura médica alrededor de 1969 (Li, FP., & Fraumeni, JF., 1969), el cual se caracteriza por la aparición de tumores en múltiples órganos a edad temprana. Esta condición genética se hereda con un patrón autosómico dominante y presenta una penetrancia de aproximadamente el 70 % en los hombres y más del 90% en las mujeres. El 70% de los pacientes con diagnóstico clínico de síndrome de Li-Fraumeni tiene una variante patogénica germinal en el gen *TP53* y quienes cumplen con los criterios de Chompret tienen 20 % de probabilidades de presentar una PV identificable en este gen. La enfermedad se presenta en dos formas clínicas, el síndrome de Li-Fraumeni clásico (LFS) y el síndrome de Li-Fraumeni like (LFL), cuyos criterios clínicos de clasificación difieren, ya que en este último la prevalencia de variantes germinales en el gen *TP53* es menor y su aparición está probablemente relacionada a otros genes alterados (Vogel W.H., 2017).

Cinco tipos de cáncer representan la mayoría de los tumores LFS (Schneider K., 1999): cáncer de mama, sarcomas, tumores cerebrales, leucemias agudas, carcinoma de la corteza suprarrenal, en conjunto estos representan hasta el 77% de todos los tipos de tumores que ocurren en los pacientes con LFS. Los más comunes en el grupo de 0 a 10 años de edad son los sarcomas, los tumores cerebrales y el carcinoma cortical suprarrenal; en el grupo de 11 a 20 años, los tumores óseos, y en mayores de 20 años, el cáncer de mama y los tumores cerebrales, también en estos pacientes existe un riesgo mayor de desarrollar una segunda neoplasia maligna (entre 30% al 57%) (Garber JE., & Offit K., 2005; Chompret A., *et al.*, 2000).

1- El cáncer de mama femenino representa el 27% -31% de los cánceres LFS, lo que lo convierte en el cáncer más común en mujeres con LFS. Se estima que las mutaciones de la línea germinal *TP53* son responsables de alrededor del 1% de los cánceres de mama hereditarios, también parece haber una asociación entre las mutaciones de la línea germinal *TP53* y el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (*HER2*) (Schneider K., 1999; Chompret A., *et al.*, 2000)

Dentro de los fenotipos clínicos identificados es más probable encontrar variantes patogénicas en *TP53* cuando se trata de una mujer con antecedentes personales de cáncer de seno a una edad más temprana y no tiene una mutación identificable en los genes *BRCA1* o *BRCA2*, si es diagnosticada con cáncer de seno antes de los 30 años

tiene una probabilidad estimada de 4% a 8% de tener una mutación *TP53*. Las mujeres con diagnóstico de este cáncer entre los 30 y los 39 años también pueden tener un pequeño aumento en el riesgo de tener una PV en *TP53*, mientras que en mujeres más jóvenes con cáncer de seno, una PV en *TP53* puede presentarse con cualquiera de las siguientes características: antecedentes familiares de cáncer, especialmente cánceres relacionados con LFS, antecedentes personales de un tumor de mama que es positivo para receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR) y marcadores HER2/neu, también conocidos como cáncer de seno “triple positivo”, y antecedentes personales de un cáncer adicional relacionado con LFS<sup>1</sup>.

2- Los sarcomas representan entre el 3% y el 16% de los cánceres de LFS y generalmente ocurren antes de los 30 años, aunque se han informado diagnósticos posteriores hasta los 55 años.

3- Los tumores del sistema nervioso central representan del 9% al 14% de los cánceres de SLF.

4- Las leucemias primarias y secundarias, especialmente la leucemia linfocítica aguda, la leucemia mieloide aguda y el síndrome mielodisplásico representan alrededor del 2% al 4% de los cánceres LFS. Los linfomas de Hodgkin y no Hodgkin representan aproximadamente el 2% de los cánceres notificados en personas con LFS.

5- Los carcinomas de la corteza suprarrenal se desarrollan en el 6% -13% de las personas con LFS y la mayoría de los diagnósticos ocurren antes de los cinco años, también ocurre en adultos generalmente antes de los 40 años.

Otros cánceres adicionales notificados en familias con una PV en *TP53* identificada o un diagnóstico clínico de LFS han incluido cánceres de cabeza y cuello, riñón, laringe, pulmón, piel (melanoma), ovario, páncreas, próstata, testículo y tiroides (Weiss JM, *et al.*, 2021).

## 4.4 Gen *TP53*

Las variantes patogénicas germinales en el gen *TP53* son las principales responsables del síndrome de Li-Fraumeni, sin embargo, solo se pueden confirmar en aproximadamente el 70% de las familias sospechosas, por lo que su diagnóstico generalmente se basa en la

---

<sup>1</sup> <https://www.lfsassociation.org/what-is-lfs/lfs-criteria/>



evaluación clínica y el cumplimiento de criterios estrictos independiente del estado mutacional (Chompret A., *et al.*, 2000; Penkert J., *et al.*, 2018). Estas variantes genéticas ocurren principalmente en el dominio de unión al DNA, y los del LFL están relacionados con variantes en otros genes de predisposición.

El gen *TP53* es un gen supresor tumoral que codifica la proteína p53, el cual induce la transcripción de genes involucrados en la reparación del material genético, el control del ciclo celular y apoptosis. Se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13), tiene 11 exones, la mayoría de las variantes patogénicas, es decir aproximadamente el 80% se ubican en los exones 5, 6, 7 y 8 que codifican para el dominio de unión al DNA. Este gen codifica una proteína de 400 residuos de aminoácidos con 7 dominios, la cual forma tetrámeros en solución, que se cree que son los predominantes. Los dominios incluyen el dominio de activación de la transcripción (entre el aa 1-67), la región rica en prolina (67-98), el dominio central de unión al DNA (98-303), la región que contiene la señal de localización nuclear (303-323), el dominio de oligomerización (323–363) y dominio básico C-terminal (363–393) (Gargallo P., *et al.*, 2020).

Mediante paneles por NGS que incluyen el gen *TP53*, los pacientes sin antecedentes familiares de LFS y que no cumplen con los criterios de Chompret se les puede identificar una PV en este gen, a menudo con un VAF (Variant Allele Frequency) que es compatible con herencia germinal (es decir, ~ 50%), no obstante, en aproximadamente el 14% de los pacientes con PV en *TP53* se consideran *de novo* ya que la variante no se identifica en ninguno de los padres. La frecuencia de las mutaciones *de novo* en *TP53* no está bien establecida; sin embargo, según dos estudios, se ha estimado que la tasa *de novo* es tan baja como 7% y tan alta como 24% (Sorrell A. D., *et al.*, 2013).

Las variantes patogénicas *de novo* en *TP53* pueden deberse a un mosaicismo gonadal, que resulta de una variante presente en el gameto de uno de los padres. Se desconoce la penetrancia de estas variantes en *TP53* en pacientes con un genotipo de LFS sin antecedentes personales o familiares representativos de cáncer. En ausencia de datos de estudios longitudinales, las personas con PV de línea germinal *de novo* actualmente se manejan de la misma manera que otras personas con LFS y antecedentes familiares concordantes. Para la interpretación de una PV en *TP53* con una frecuencia alélica baja (< 30%) se debe pensar o en un mosaicismo clásico (somático), hematopoyesis clonal, interferencia técnica en el ensayo o PV tumorales detectados en la sangre a partir de una neoplasia maligna hematológica circulante o de tumores sólidos. La confirmación del

mosaicismo somático se puede lograr mediante la identificación de la PV *TP53* en un segundo tejido a través de cultivos de fibroblastos, o células obtenidas de hisopados bucales (Mester J. L., *et al.*, 2020; Schwartz A. N., *et al.*, 2021). La identificación de una PV *TP53* a través de cualquiera de estos medios confirma el mosaicismo, mientras que la falta de identificación del PV no excluye el mosaicismo. La identificación del mosaicismo clásico debe ir seguida de asesoramiento genético para discutir estrategias de vigilancia para el individuo afectado y pruebas de descendencia. Además, identificar la PV en otro miembro de la familia excluiría la hematopoyesis clonal; por lo tanto, es importante evaluar a otros miembros de la familia, incluida la descendencia (Batalini F., *et al.*, 2019; Berry D. K., *et al.*, 2023).

En el estudio de Subasri, V. *et al.*, 2023 se identificaron epimutaciones asociadas con el riesgo de cáncer en individuos con LFS portadores de variantes en *TP53*. Entre las epimutaciones identificadas, se encontraron hiper e hipometilación en el gen *LEF1* (lymphoid enhancer binding factor 1), que se asociaron con un mayor y menor riesgo de cáncer, respectivamente. En general, estos hallazgos sugieren que las epimutaciones pueden ser un mecanismo importante que contribuye a la variabilidad en la penetrancia del cáncer en pacientes con LFS y la identificación de estas epimutaciones puede tener implicaciones importantes para la predicción del riesgo de cáncer (Subasri, V., *et al.*, 2023).

## 4.5 Metilación de TP53

Se ha observado que algunos pacientes que presentan criterios clínicos para LFS o LFL no tienen ninguna variante patogénica, probablemente patogénica o variante de significado desconocido (VUS) en el gen *TP53*, por lo que se plantea la hipótesis de que tanto la generación o pérdida de isoformas de p53 como la metilación de este gen podría desempeñar un papel crucial en esta aparente falta de correlación genotipo-fenotipo.

La metilación en el gen *TP53* ocurre independiente de la presencia o no de variantes deletéreas en *TP53*, se da principalmente en los exones 5 a 8, lo cuales contienen secuencias de nucleótidos que son reconocidas por enzimas metiltransferasas, que agregan grupos metilo a los residuos de citosina en las secuencias CpG (Tornaletti, S., & Pfeifer, G. P., 1995). La metilación de estos exones puede afectar tanto la selección de exones al modular procesos de empalme, como la generación de diferentes isoformas de p53, lo que a su vez puede afectar la función de la proteína p53 en la célula, así como la

unión de proteínas reguladoras del empalme, como los factores serina/arginina (SR) (Kouidou, S., *et al.* 2009).

Las isoformas de p53 se generan a partir del mismo gen *TP53*, pero difieren en su estructura y función. Se han identificado varias isoformas de p53 en diferentes tejidos y condiciones fisiológicas, y se ha demostrado que tienen diferentes roles en la regulación del ciclo celular, la apoptosis y otros procesos celulares. La isoforma  $\Delta 133p53$  es una de las isoformas de p53 más estudiadas y se ha demostrado que tiene un papel importante en la regulación de la apoptosis y la senescencia. Esta isoforma se produce a partir de un empalme alternativo del transcrito de *TP53* y se expresa en varios tejidos, incluyendo el cerebro, el corazón y el hígado. Se ha demostrado que la pérdida de la isoforma  $\Delta 133p53$  se asocia con la predisposición a desarrollar cáncer en el contexto de LFS y LFL. La regulación del empalme alternativo está controlada por diferentes elementos reguladores del empalme exónico, como los *exonic splicing enhancers* (ESE) y los *exonic splicing silencers* (ESS), así como por factores de empalme específicos (Kouidou, S., *et al.* 2009).

Los ESE son secuencias de nucleótidos en los exones del gen que promueven el reconocimiento y el empalme de los intrones adyacentes durante el proceso de corte y empalme del ARN; estas secuencias facilitan la unión de proteínas reguladoras del empalme, como los factores de empalme serina/arginina (SR), lo que promueve el empalme alternativo y la inclusión de ciertos exones en el ARN maduro. Por otro lado, los ESS son secuencias de nucleótidos en los exones del gen que inhiben el reconocimiento y el empalme de los intrones adyacentes durante el proceso de empalme del ARN. Estas secuencias actúan como sitios de unión para proteínas reguladoras del empalme que bloquean o inhiben el empalme alternativo y la inclusión de ciertos exones en el ARN maduro. La interacción dinámica entre los ESE y ESS, junto con los factores de empalme específicos, regula la selección de exones y la generación de diferentes isoformas de p53, lo que a su vez afecta la función de la proteína p53 en la célula (Lamolle, G., *et al.*, 2006).

## 4.6 Otros genes asociados al síndrome de Li-Fraumeni

*CHEK2* es otro gen relacionado con la etiopatogenia del síndrome de Li-Fraumeni, este gen codifica para una serina treonina quinasa del punto de control del ciclo celular, fosforila la fosfatasa CDC25C, de manera que la inhibe evitando la entrada de la célula a mitosis además de estabilizar a p53, lo que conduce a la detención del ciclo celular. Variantes patogénicas en este gen han sido detectadas en algunas familias de LFS o LFL sin

mutaciones detectables en *TP53*, varios estudios apoyan la hipótesis de que el gen *CHEK2* puede actuar como un factor que contribuye al desarrollo de tumores individuales en familias con tumores LFL (Vahteristo, P., *et al.*, 2001; Schneider K., *et al.*, 1999). Sin embargo, en los últimos años se ha debatido la relación de *CHEK2* con el LFS, tal como lo plantea Fortuno, C. *et al.*, 2023 pues establecen diferencias obvias entre la presentación clínica de los portadores de variantes patógenas de *TP53* y *CHEK2*, sin evidencia de que *CHEK2* esté asociado con ninguno de los cánceres centrales de LFS relacionados con *TP53*, e incluso proponen reemplazar el "síndrome de Li-Fraumeni 2" como aparece en OMIM con el nombre de "enfermedad asociada a *CHEK2*".

Otras variantes patogénicas menos frecuentes y en estudio son las del gen *POT1* (protección de los telómeros 1) este gen codifica una proteína nuclear que es esencial para el mantenimiento de los telómeros y se ha demostrado una mayor fragilidad telomérica en pacientes afectados por variantes patogénicas de *POT1*. Se ha asociado con el riesgo de desarrollar varios tipos de tumores y se han detectado en familias de LFL. En el estudio de Calvete, O. *et al.*, se identificó una nueva variante *missense* en *POT1* (p.R117C) como responsable del LFL asociado específicamente con angiosarcoma cardíaco (CAS) y demuestran que los portadores de esta variante muestran niveles reducidos de *POT1* unido a los telómeros, que son anormalmente largos y frágiles, destacando un nuevo papel de *POT1* como un gen de alta susceptibilidad en cáncer familiar y abriendo oportunidades terapéuticas para el pronóstico y tratamiento en familias con CAS (Calvete, O., *et al.*, 2015).

El gen *CDKN2A*, es otro gen relacionado con LFS y LFL, codifica dos proteínas, la p16INK4a y la p14arf, ambas actúan como supresores de tumores regulando el ciclo celular. La p16 inhibe las quinasas dependientes de ciclina 4 y 6 que bloquean el paso de la fase G1 a la S y por otro lado la p14 activa p53 es decir la estabiliza, ya que corriente arriba puede interactuar y degradar *MDM2* que es la proteína responsable de la estabilidad y actividad de p53, de esta manera p53 se acumula y hace la detención del ciclo celular. En los casos en los que se ha identificado variantes en este gen frecuentemente está asociado a un caso índice de sarcoma (Jouenne F., *et al.*, 2017).

## 4.7 Criterios clínicos diagnósticos del LFS

Para realizar el diagnóstico clínico de LFS y LFL se han planteado unos criterios en términos de severidad, historia familiar, edad de aparición y espectro de neoplasias

malignas, de esta forma se plantearon los criterios clásicos de LFS, los criterios de LFS - Birch y Eeles-, y varias versiones de los criterios de Chompret (originales, versión 2008, 2009 y 2015), que son en los que se basan las guías de la NCCN (Daly MB, *et al.*, 2021).

Los portadores de variantes germinales en *TP53* pueden estar cubiertos por los criterios LFS/LFL y de la misma forma muchas familias que cumplen clínicamente con los criterios LFS/LFL carecen de variantes patogénicas germinales detectables en *TP53*, lo que se demuestra por las tasas de detección de variantes en *TP53* que varían de 55 al 70% con los criterios de clasificación clásicos, 25% a 30% en los criterios de LFL y del 20% al 35% en los criterios de Chompret; esto significa que hasta el 45% de los pacientes que cumplen los criterios clásicos de LFS y hasta el 80% de los pacientes que cumplen los criterios de Chompret o LFL quedan sin explicación en términos de saber la causa genética (Penkert, J., *et al.*, 2018). De forma antagónica también se ha encontrado en población control, es decir individuos sanos sin antecedentes de enfermedades severas una prevalencia de variantes patogénicas o probablemente patogénicas en *TP53* estimada de 1:9.908 (UK Biobank) (De Andrade, K. C. *et al.*, 2024).

Dentro de los criterios clásicos se enumeran los siguientes: diagnóstico de sarcoma antes de los 45 años, un pariente en primer grado con diagnóstico de cáncer antes de los 45 años, un pariente en primer o segundo grado con cualquier cáncer y edad de aparición menor de 45 años o sarcoma a cualquier edad.

No obstante, dado que no todas las familias con variantes en línea germinal en *TP53* cumplían estos criterios, se describieron los Criterios de Chompret (Chompret A., *et al.*, 2000) que abarcan un espectro de pacientes más amplio y se incluyen los siguientes: Caso comprobado de tumor relacionado con LFS (sarcoma, cáncer de mama, tumor cerebral, carcinoma corticosuprarrenal) en persona menor de 46 años y al menos un pariente en primer o segundo grado con un tumor relacionado con el LFS (excepto cáncer de mama si el probando lo tiene) detectado antes de los 56 años de edad, o con múltiples cánceres primarios a cualquier edad. O un caso comprobado con múltiples tumores (excepto cáncer de mama múltiple), dos de los cuales estén relacionados con el LFS y el primero haya aparecido antes de los 46 años. O Caso con diagnóstico de tumor corticosuprarrenal o un carcinoma de plexo coroides, rhabdomyosarcoma subtipo embrionario anaplásico independientemente de la historia familiar. O cáncer de mama antes de los 31 años sin variantes patogénicas en *BRCA1* o *BRCA2*.

La guía médica para el síndrome de Li-Fraumeni 2019, versión 1.1 (Kumamoto T, *et al.*, 2019), remarca que los criterios de Chompret (versión 2015) han demostrado una sensibilidad del 75% y una especificidad del 64.5%, de manera que resultan útiles al evitar pasar por alto a individuos con variantes patogénicas en el gen *TP53* al diagnosticar LFS, con una tasa de falsos negativos del 25%. Se debe tener en cuenta que, para pacientes pediátricos con cáncer, los miembros de la familia también suelen ser jóvenes y, por lo tanto, es posible que aún no hayan desarrollado cáncer, lo que dificulta obtener un historial familiar preciso, mientras que el LFS clásico tiene una alta especificidad (91–98.1%), su sensibilidad es baja (alrededor de 25–40%). Se ha informado que el 25% de los casos son LFS *de novo*.

Se han planteado otros criterios clínicos para el grupo de LFL y en estos se incluyen los criterios de Birch y Eles. Los de Birch fueron descritos en 1994, allí se define: un probando con cualquier cáncer infantil o un sarcoma, tumor cerebral o tumor corticosuprarrenal diagnosticado antes de los 45 años y un familiar de primer o segundo grado con cualquier cáncer LFS a cualquier edad y un familiar de primer o segundo grado con cualquier cáncer antes de los 60 años de edad (Birch, J. M., *et al.*, 1994). Los criterios de Eles planteados en 1995 definen la aparición de dos tumores diferentes que hagan parte del LFS extendido (sarcoma, cáncer de mama, tumor cerebral, leucemia, cáncer de la corteza suprarrenal, melanoma, cáncer de próstata y cáncer de páncreas) en familiares de primer o segundo grado a cualquier edad (Eeles RA., 1995).

En este escenario a pesar que ya se han identificado genes que explican un amplio porcentaje de los pacientes con LFS o LFL, aún hay un número significativo de familias que cumplen los criterios para LF clásico o los criterios modificados para las que no se ha identificado ningún determinante genético relacionado. Esto plantea la posibilidad de otras variantes genéticas de la línea germinal causantes de LFS o LFL, o de pacientes con mosaicismo en *TP53*, que ya han sido reportados (Renaux-Petel M, *et al.* 2018).

Kratz, C. P., *et al.*, 2021 plantean un espectro fenotípico del LFS asociado con las variantes en línea germinal en *TP53* con el fin de estudiar las asociaciones genotipo-fenotipo en todo el espectro, lo que según ellos facilitaría la búsqueda de modificadores de riesgo en el futuro (p. ej., a través de asociaciones de genotipo-fenotipo o mediante el estudio de modificadores de riesgo en familias con variantes de puntos críticos), y no se basa en predicciones de penetrancia A) LFS fenotípico: sin variante germinal P/LP en *TP53* (o mosaico de línea germinal) + ninguna otra explicación genética + que cumple con los

criterios clásicos de LFS. B) LFS: variante germinal P/LP en *TP53* (o mosaico de línea germinal) + que cumple con los criterios de LFS y/o cualquier cáncer antes de los 18 años. C) Portador de LFS: variante germinal P/LP en *TP53* + sin antecedentes personales de cáncer + LFS en la familia. D) LFS atenuado: variante germinal P/LP en *TP53* (o mosaico de línea germinal) + antecedentes personales de cáncer pero que no cumple con los criterios de prueba de LFS + ningún cáncer antes de los 18 años. E) Portador de LFS atenuado: variante germinal P/LP *TP53* + sin historia personal de cáncer + LFS atenuado en la familia. F) LFS incidental: variante *TP53* de línea germinal P/LP (o mosaico de línea germinal) + sin historial de cáncer + sin LFS o LFS atenuada en la familia (Kratz, C. P. *et al.*, 2021). Sin embargo, los portadores de variantes en *TP53* que no son P/LP no están incluidas en la nueva definición, si bien esta separación es clínicamente práctica, es posible que no refleje la verdadera biología de *TP53* y las variantes de significado incierto (VUS) pueden volver a anotarse en el futuro, adicionalmente esta clasificación actualmente no tiene implicaciones inmediatas en los protocolos de vigilancia del cáncer porque se requieren más análisis de riesgo.

## 4.8 Análisis por secuencia de nueva generación (NGS)

El análisis por NGS ha facilitado la realización de pruebas de múltiples genes simultáneamente, a un costo menor y tiempos de respuesta rápidos, permitiendo la implementación de esta técnica como una prueba clínica de primera línea para las personas que se sospecha de síndrome de cáncer familiar y desde hace algunos años se implementó también para el análisis rápido y de alto rendimiento de variantes en el número de copias (CNVs), los cuales constituyen aproximadamente el 7% de las PV en los genes de susceptibilidad al cáncer y pueden identificarse mediante algoritmos específicos de análisis. Se ha demostrado que estos métodos computacionales detectan con precisión alteraciones en el número de copias de >50 pb, como deleciones y/o duplicaciones de exón, y permiten detectar PV en un panel completo de genes al tiempo que disminuyen los costos al evitar las pruebas paralelas como el MLPA o LR-PCR (Bhai P., *et al.* 2021).

En el 2018 Penkert *et al.*, publicaron los resultados de un estudio con análisis de secuencia de nueva generación y de número de copias para un conjunto de 94 genes de predisposición al cáncer en una cohorte de 83 pacientes alemanas con diagnóstico de cáncer de mamá negativos para *TP53*, *BRCA1* y *BRCA2* y que su vez cumplieran los criterios clínicos para Li-Fraumeni sugeridos hasta el momento (criterios

LFS/Chompret/LFL). Los resultados evidenciaron 13 variantes patogénicas o probablemente patogénicas germinales en 10 pacientes y en nueve genes diferentes, de manera que en cinco pacientes (5 de 83; 6% de la cohorte) se detectaron variantes patogénicas causales en genes de susceptibilidad al cáncer de mama establecidos (*PALB2*, *CHEK2*, *ATM*) y en los restantes cinco (6%) variantes patogénicas en genes que carecen de una asociación firme con la susceptibilidad al cáncer de mama (genes de la vía Fanconi, genes de la familia *RECQ*, *CDKN2A/p14* y *RUNX1*), tres pacientes se presentaron como portadores de doble variante con dos genes diferentes cada uno (Penkert *et al.*, 2018).

De esta manera se define un espectro mutacional amplio en pacientes con cáncer de mama con criterios para LF, señala la necesidad de intensificar la investigación sobre variantes monoalélicas en la vía de Fanconi y genes de la familia *RECQ* y enfatiza la necesidad de investigación avanzada sobre nuevos genes de susceptibilidad, así como variantes de *TP53* no codificantes en pacientes con resultados de prueba negativos para variantes de *TP53* en regiones codificantes, se plantea la hipótesis que para la aparición de un fenotipo LFL sin variantes patogénicas detectables en *TP53* se da la aparición simultánea y aditiva de alteraciones claramente patogénicas dobles o múltiples en más de un gen de susceptibilidad al cáncer.

## 4.9 Panorama en Colombia

La prevalencia del síndrome de Li-Fraumeni no está bien establecida, sin embargo, se habla de 1:3.555 a 1:5.476 personas en todo el mundo (De Andrade KC, *et al.*, 2019), con una alta variabilidad interregional. En América Latina, Brasil es el país que tiene la mayor prevalencia, principalmente debido a una variante patogénica puntual en el gen *TP53*, c.1010G>A (p.Arg337His). Esta variante no se encuentra dentro del dominio de unión al DNA de la proteína p53, sino en un motivo estructural (una hélice  $\alpha$ ) que media la formación de dímeros p53 y que genera un alto riesgo de desarrollo de carcinoma de la corteza suprarrenal; se considera una variante fundadora en el sur de Brasil. Los estudios en dos ciudades (Porto Alegre y Curitiba) mostraron que 1 de cada 300 personas tiene Li-Fraumeni, es decir hay aproximadamente 250.000 a 300.000 portadores en estas poblaciones (Achatz MI, Zambetti GP., 2015).

En Colombia se han publicado tres artículos reportes de caso en los que se identifican variantes patogénicas en línea germinal en *TP53*, el primero por Ossa en el 2016, la



variante c.527G>T (p.Cys176Phe) en el exón 5 en una mujer de 31 años de edad, natural de Antioquia, con dos tumores sincrónicos un leiomioma de antebrazo y un tumor filoides de mama. Como antecedente de un hijo con diagnóstico de carcinoma cortical suprarrenal a los tres años, que murió a los cinco años por la enfermedad, la abuela y bisabuela maternas murieron de cáncer gástrico a los 56 y 60 años, y su mamá y una hermana de su abuelo materno presentaron cáncer de mama entre los 40 a 60 años (Ossa CA., 2016).

El segundo reporte de caso por Cardona *et al.*, en el 2018 informa la variante c.586C>T (p.Arg196\*) en una mujer que fue diagnosticada a los 12 años con osteosarcoma y a los 24 años se evidenciaron múltiples adenocarcinomas pulmonares primarios sincrónicos relacionados con la diseminación tumoral intraalveolar, tenía historia familiar de cáncer de seno en madre a los 32 años y tías maternas con astrocitoma anaplásico, cáncer gástrico (Cardona AF., *et al.*, 2016). El tercer reporte de caso por Insuasty-Enríquez *et al.*, en el 2022 también informa la variante c.586>T (p.Arg196\*) en un hombre de 38 años sin antecedentes familiares de importancia quien desarrolla de forma metacrónica sarcoma de tejidos blandos en región pretibial izquierda, adenocarcinoma gástrico y sarcoma cardiaco (Insuasty-Enríquez, *et al.*, 2021).

## 5. Metodología

### 5.1 Tipo de investigación

Estudio analítico-descriptivo

### 5.2 Descripción de los pacientes

Sujetos de estudios: 25 muestras de sangre periférica en total. Se describe en cada individuo el tipo de cáncer (ver figura 5) y la edad del diagnóstico. Cada uno de los individuos se etiquetó con una letra y un número. Para el estudio inicial se tomaron siete individuos afectados, es decir aquellos con diagnóstico de cáncer relacionado con LFL (D5, F1, F3, F9, F11, G1, J3) y 18 de familiares sanos de una familia venezolana con diagnóstico clínico de síndrome de Li-Fraumeni like (ver figura 1, 2, 3 y 4), tomadas previo consentimiento informado en las instalaciones de Servicios Médicos Yunis-Turbay, y remitidas para estudio por uno de los investigadores principales.

El individuo D5, es un hombre de 58 años con diagnóstico de micosis fungoide, un tipo de linfoma cutáneo de células T. El individuo F1 se trata de una mujer que falleció a los 80 años con diagnóstico de cáncer uterino. El individuo F3 es un hombre de 64 años con diagnóstico de cáncer de próstata. El individuo F9 se trata del caso índice, que se describe más adelante con detalle. El individuo F11 es un hombre de 48 años con diagnóstico de Linfoma Hodgkin. El individuo G1 se trata de una mujer que falleció a los 79 años con cáncer de mama diagnosticado a los 49 años. El individuo J3 se trata de una mujer que falleció a los 44 años con cáncer de ovario diagnosticado a los 38 años.

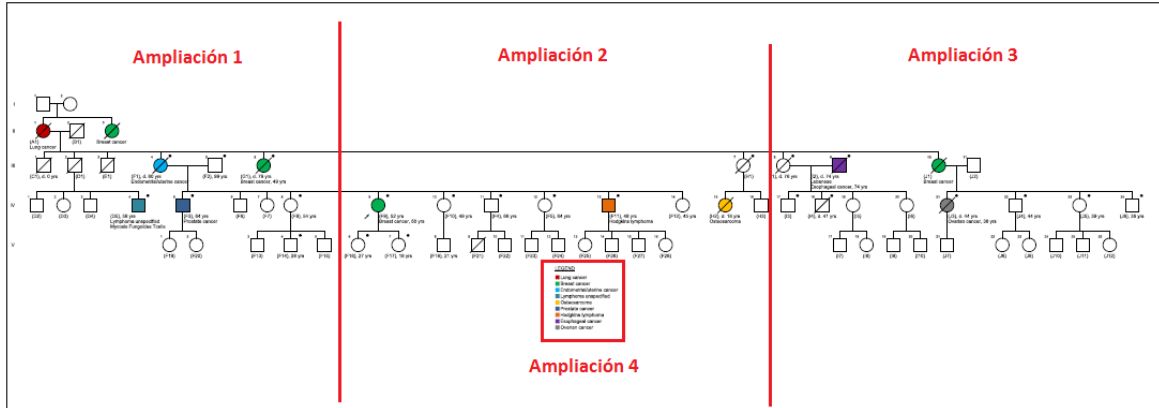


Figura 1. Genealogía familia con diagnóstico clínico de LFL

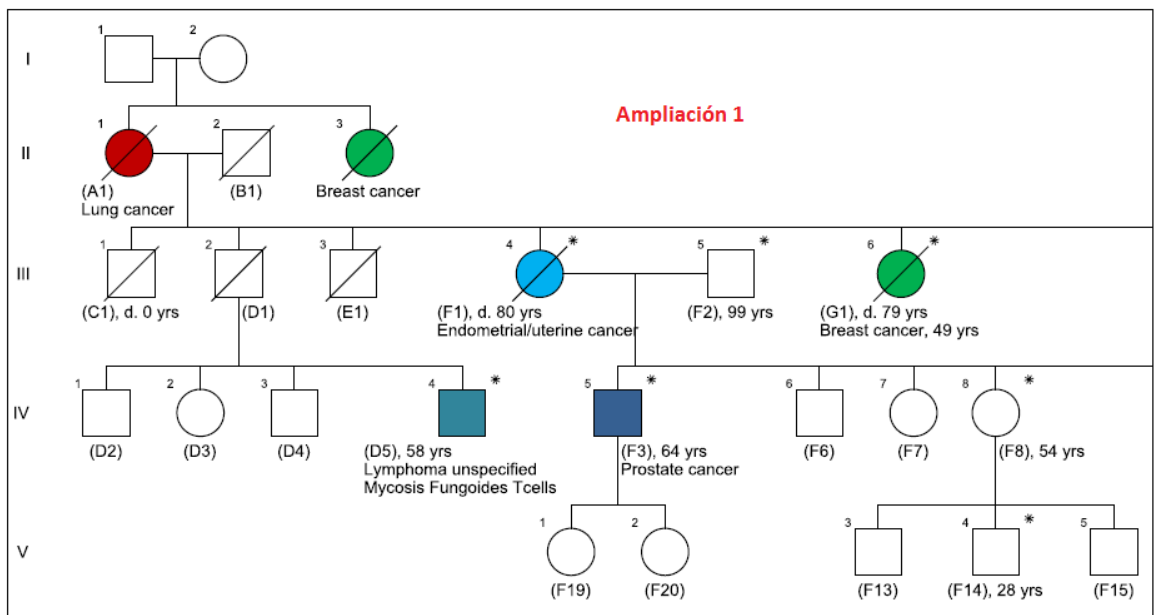
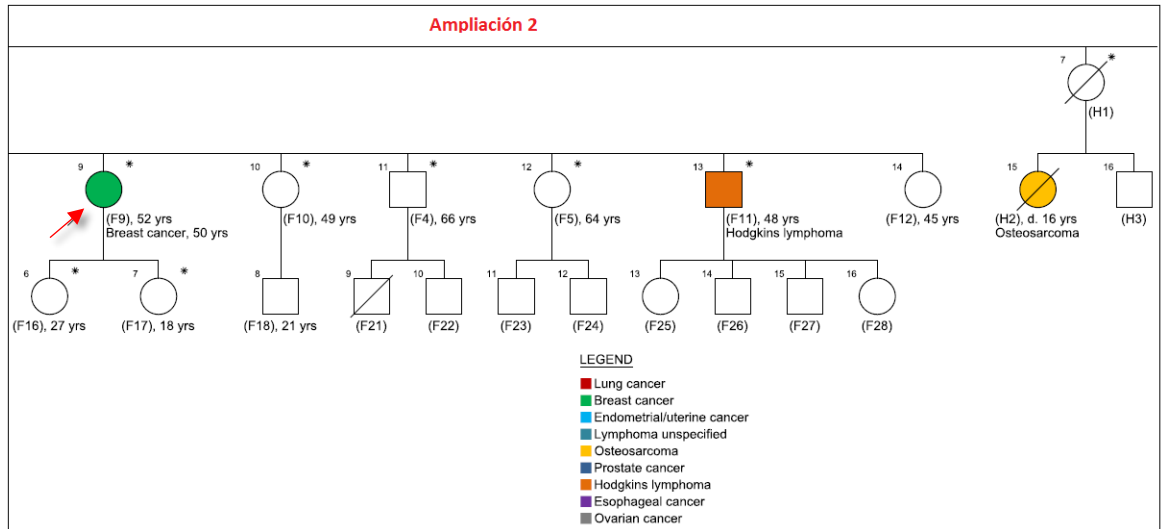
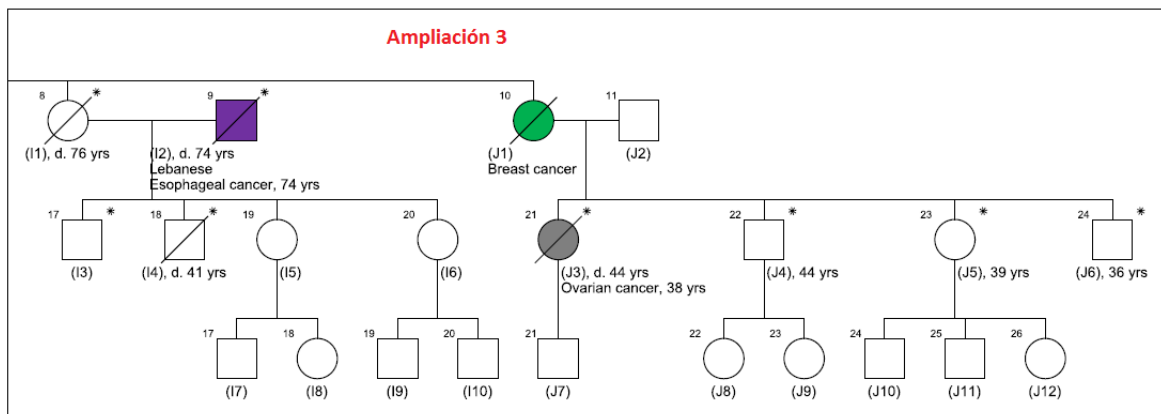


Figura 2. Genealogía. Ampliación 1

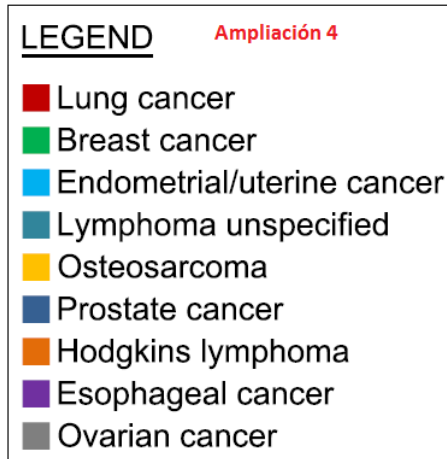


**Figura 3.** Genealogía. Ampliación 2

El caso índice (se señala con indicador rojo en figura 3) se trata de una mujer (IV-9(F9)) diagnosticada con cáncer de seno a los 50 años, con antecedente familiar de una prima materna que fue diagnosticada con sarcoma a los 16 años ya fallecida, una prima materna con diagnóstico de cáncer de ovario antes de los 45 años, fallecida, un primo materno con linfoma cutáneo tipo micosis fungoides, un hermano con cáncer de próstata otro con linfoma Hodking y dos tías maternas con diagnóstico de cáncer de seno ya fallecidas (ver figura 3).



**Figura 4.** Genealogía. Ampliación 3



**Figura 5.** Genealogía. Ampliación 4

### 5.3 Extracción de DNA, cuantificación y verificación de calidad

Los procedimientos y análisis de datos se llevaron a cabo en las instalaciones de Servicios Médicos Yunis-Turbay. Se realizó la extracción de DNA genómico de 25 muestras de sangre periférica mediante QIAamp DNA Mini Kit de Quiagen, estas muestras de sangre pertenecen a miembros de una familia con criterios clínicos para síndrome de Li-Fraumeni-like, posteriormente se realizó la cuantificación de DNA mediante Qubit y la medición del radio de absorbancias 260/280 nm entre 1.8-2.0, se hizo la comprobación de la calidad del DNA mediante gel de agarosa al 1%.

### 5.4 Panel genético de 111 genes relacionados con cáncer

Luego de obtener DNA genómico de adecuada calidad se purificó, se tomó 50ng del mismo para iniciar el proceso de secuenciación y preparación de librerías, se procesaron 7 muestras correspondientes a familiares afectados, se usó el Kit de captura con panel de 111 genes relacionados con cáncer hereditario (*ACD, AIP, APC, ATM, ATR, AXIN2, BAP1, BARD1, BLM, BMPR1A, BRCA1, BRCA2, BRIP1, BUB1, CDH1, CDK4, CDKN1B, CDKN2A, CHEK2, DDB2, DICER1, DIS3L2, DKC1, ELANE, EPAS1, EPCAM, ERCC1, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERCC6, FANCA, FANCB, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCI, FANCL, FANCM, FH, FLCN, G6PC3, GF11, GREM1, HOXB13, KIF1B, KIT, MAX, MDH2, MEN1, MET, MITF, MLH1, MNX1, MSH2, MSH6, MSR1, MUTYH, NBN, NF1, NF2, NFIX, NSD1, NTHL1, PALB2, PARN, PDGFRA, PMS1, PMS2,*

*POLD1, POLE, POLH, POT1, PRKAR1A, PTCH1, PTEN, RAD50, RAD51, RAD51C, RAD51D, RB1, RECQL, RECQL4, RET, RTEL1, SCG5, SDHD, SLX4, SMAD4, SMARCA4, STK11, SUFU, TMEM127, TP53, TERT, TSC1, TINF2, TSC2, UBE2T, VHL, VPS45, WAS, WRN, WT1, XPA, XPC, XRCC2 y XRCC3*) a partir de DNA (Oncogene Profile de SG KITS- SISTEMAS GENÓMICOS), secuencia NGS MiSeq (SMYT) como se describe a continuación:

1. Tagmentación del DNA genómico y purificación: Se realizó la fragmentación enzimática y se añadieron simultáneamente unos adaptadores a los extremos de los fragmentos. Posteriormente el DNA fragmentado se purificó usando *beads* magnéticas (AMPure XP beads).
2. Amplificación del DNA Tagmentado y purificación: El DNA tagmentado y purificado se amplificó mediante un número reducido de ciclos de PCR. Tras la amplificación, la librería se purificó utilizando *beads* magnéticas.
3. Validación de la librería obtenida: Se analizó una alícuota de la librería en un equipo Fragment Analyzer (Agilent).
4. Hibridación: Las librerías obtenidas se mezclaron con las sondas que capturan las regiones de interés.
5. Captura: Las *beads* cubiertas de estreptavidina capturan las sondas que a su vez están hibridadas con las regiones diana de interés. Se hicieron lavados posteriores para eliminar las uniones no específicas de las *beads*.
6. Adición de índices por PCR y purificación: A cada librería individual se le añadió una secuencia de nucleótidos específica mediante amplificación por PCR, lo que permitió mezclar varias librerías enriquecidas para secuenciarlas juntas en un único RUN o lane.
7. Validación de la librería enriquecida: La calidad de la librería enriquecida obtenida se determinó analizando una alícuota de la librería en un equipo Fragment Analyzer (Agilent).
8. Pooling de Librerías para secuenciación: Se combinaron diferentes librerías etiquetadas con diferentes índices para su posterior secuenciación.
9. Secuenciación: Con el sistema de SGkit para cáncer hereditario se obtuvieron librerías listas para proceder con la generación de *clusters* y secuenciación en plataformas Illumina. La concentración de librería o pool de librerías obtenidas con el Kit para llevar a cabo la secuenciación estuvo entre 8-12 pM, en un equipo MySeq de Illumina.

10. Análisis de datos: Después de la secuenciación de las librerías, los ficheros *fastq* obtenidos en el secuenciador se analizaron y visualizaron en la plataforma de análisis bioinformático GeneSystems (Sistemas Genómicos, Paterna, Valencia España).
11. Se generaron lecturas de “*paired end*” de longitud 101nt. Se tomaron como resultados aceptables aquellos con profundidad mayor a 20x, verificando los valores de calidad que se proporcionan en una escala similar a *Phred*, verificando valores de >30 es decir que existe una probabilidad de 1 entre 1000 de que esa base sea incorrecta. El estudio global de los valores de calidad proporciona información sobre la calidad de la secuenciación.
12. Se realizó la alineación con el genoma referencia GRCh38 y la identificación de variantes genéticas. El análisis de las variantes encontradas se fundamentó en los criterios del ACMG/AMP (Colegio Americano de Genética Médica y Genómica y la Asociación de Patología Molecular), validación mediante herramientas de *Clingen* (Clinical Genome Resource), se usó además softwares de predicción *in silico* (como MutationTaster, Human Splicing Finder) para la clasificación final de las variantes como patogénicas, probablemente patogénicas y de significado clínico incierto.

## 5.5 Exoma completo individuo índice

Con el objetivo de ampliar la búsqueda de variantes en otros genes relacionados con el fenotipo, se seleccionó el individuo índice (F9) para realizarle un exoma completo en institución externa mediante plataforma MGI. Se obtuvieron los archivos crudos *fastq* y *.vcf* con los que posteriormente se realizó el llamado de variantes mediante la herramienta WANNVAR (Chang X., *et al.*, 2012) en el que se filtraron las variantes no sinónimas, aquellas con frecuencia <0.001 y con score >0.6 para evaluación del predictor REVEL eliminando aquellas que tuviesen un efecto neutral.

## 5.6 Exoma dirigido: 157 genes relacionados con cáncer en caso índice

Se realizó un exoma dirigido en el individuo índice (F9) ampliando la búsqueda a 157 genes en los que se ha establecido alguna relación con cáncer (*ACD, ABRAXAS1(FAM175A), AIP, AKT1, ALK, APC, ATM, ATR, AXIN2, BAP1, BARD1, BLM, BMPR1A, BRCA1, BRCA2, BRIP1, BUB1, CCND1, CDC73, CDH1, CDK4, CDKN1B, CDKN1C, CDKN2A, CHEK2, CTNNA1, CYLD, DDB2, DICER1, DIS3L2, EPAS1, EPCAM,*

*ERCC1, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERCC6, FANCA, FANCB, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCI, FANCL, FANCM, FH, FLCN, GREM1, HNF1A, HNF1B, HOXB13, HRAS, IL1B, IL1RN, KIF1B, KIT, LIG4, LZTR1, MAD2L2, MAX, MC1R, MDH2, MEN1, MET, MITF, MLH1, MNX1, MRE11(MRE11A), MSH2, MSH3, MSH6, MSR1, MUTYH, NBN, NF1, NF2, NFIX, NSD1, NTHL1, PALB2, PALLD, PDGFRA, PIK3CA, PMS1, PMS2, POLD1, POLE, POLH, POT1, PRKAR1A, PRSS1, PTCH1, PTEN, RAD50, RAD51, RAD51C, RAD51D, RASAL1, RB1, RECQL, RECQL4, RET, RHBDF2, RINT1, RNF43, RPS20, SCG5, SDHA, SDHAF2, SDHB, SDHC, SDHD, SEC23B, SLX4, SMAD4, SMARCA4, SMARCB1, SMARCE1, SPINK1, SPRED1, SRGAP1, STK11, SUFU, TMEM127, TP53, TSC1, TSC2, UBE2T, VHL, WRN, WT1, XPA, XPC, XRCC2, XRCC3, YAP1, DKC1, ELANE, G6PC3, GF11, PARN, TERT, RTEL1, TINF2, VPS45, WAS, CDKN1A, CEBPA, EGFR, GATA2, GPC3, PHOX2B, RUNX1)* y determinar mediante criterios de la ACMG aquellas variantes deletéreas o de significado clínico incierto.



## 6. Resultados

### 6.1 Verificación de calidad

Para cada uno de los siete individuos a los que se le realizó en panel dirigido de 111 genes, se obtuvo una adecuada calidad de las secuencias (Phred QS) en *forward* y *reverse* (ver figura 6 y 7), el contenido de secuencia por base (ver figura 8 y 9) y los scores de calidad por secuencia (ver figura 10 y 11).

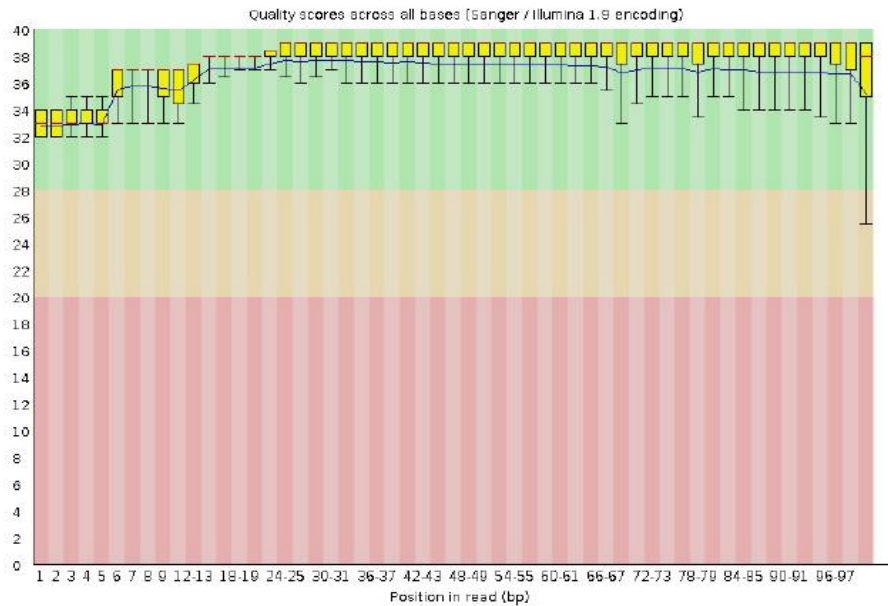


Fig. 1.1.1. Per base sequence quality: sample LF1.

Figura 6. Score de Calidad (Phred QS) *forward* Individuo F1

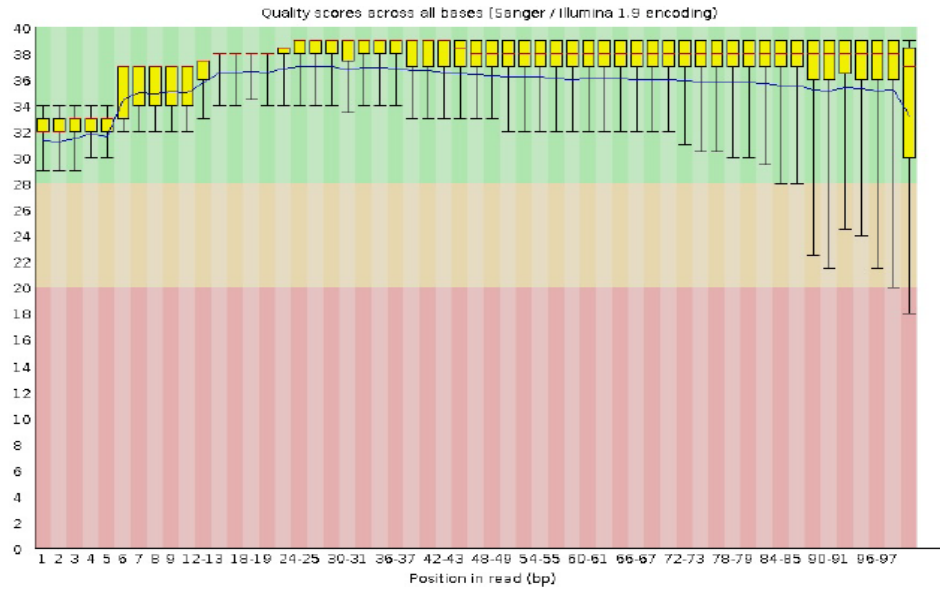


Figura 7. Score de Calidad (Phred QS) reverse Individuo F1

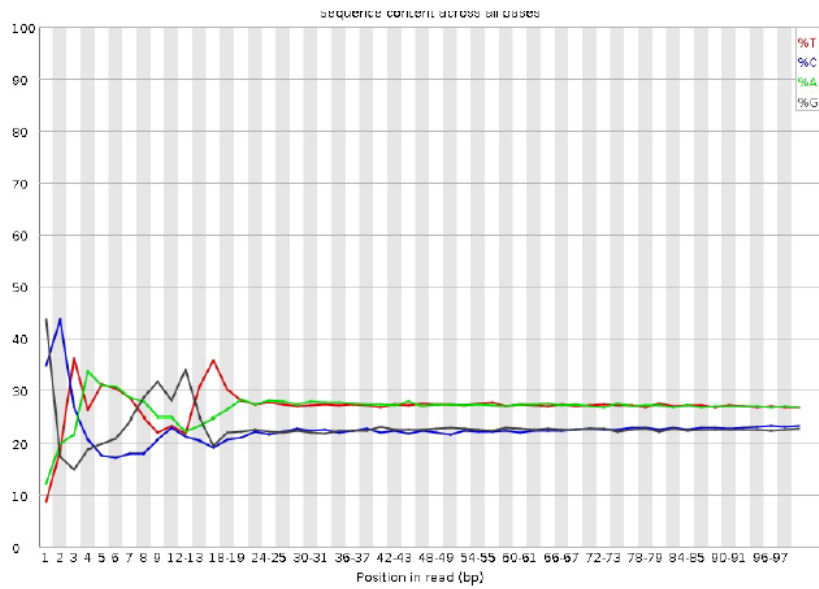


Fig. 1.1.1. Per base sequence content: sample LF1.

Figura 8. Contenido de secuencia de bases - forward Individuo F1

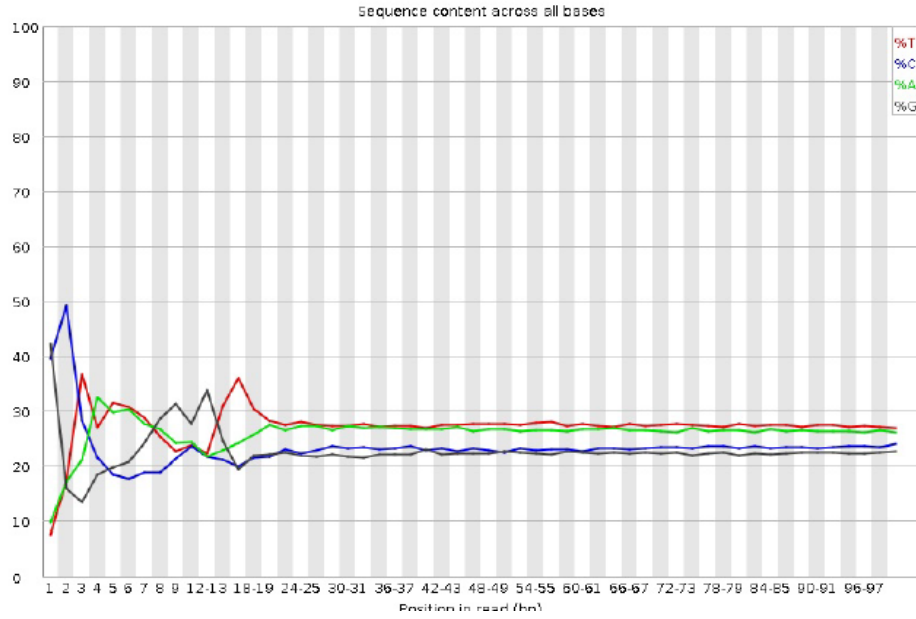


Figura 9. Contenido de secuencia de bases - reverse Individuo F1

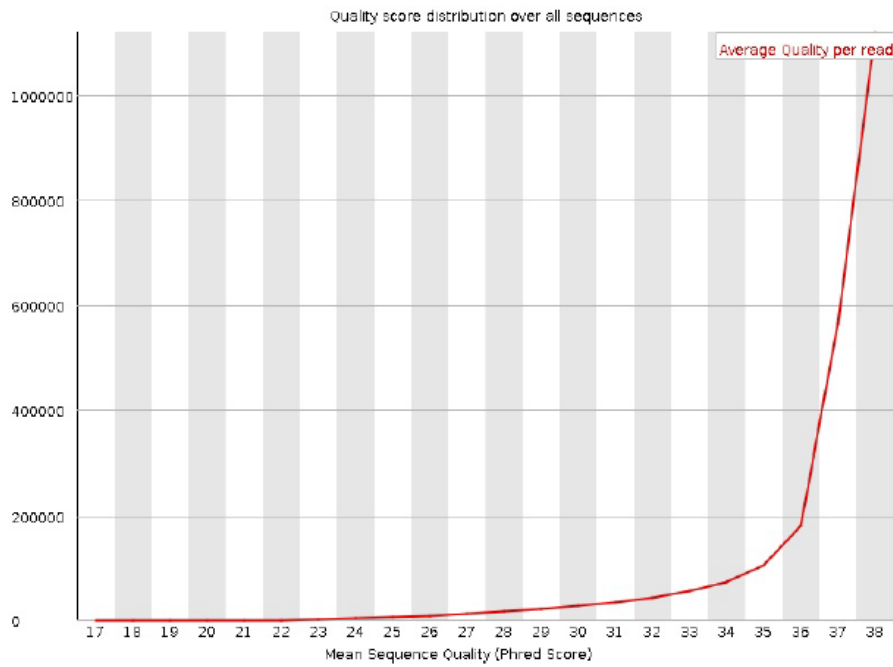
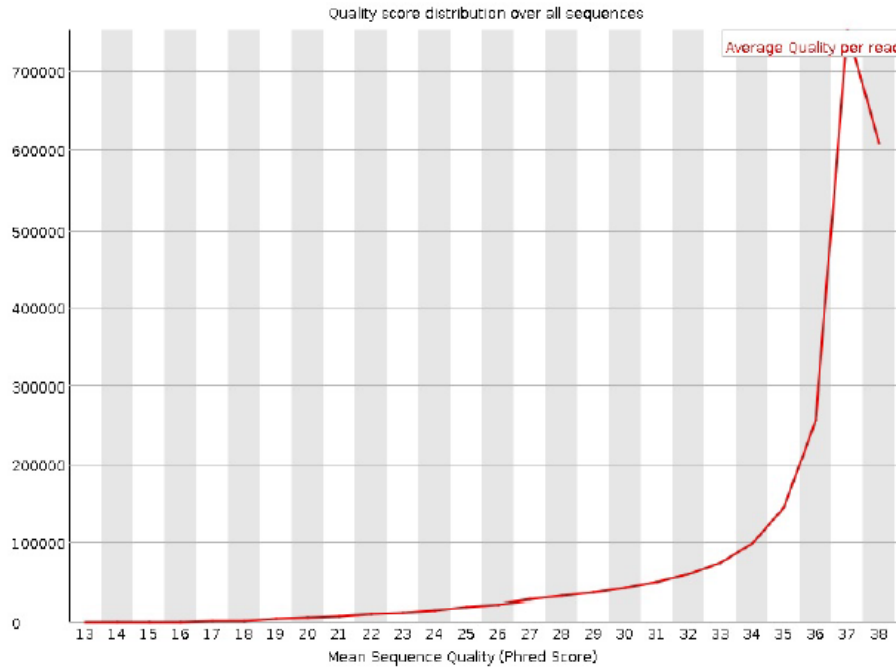


Fig. 1.1.1. Per sequence quality: sample LF1.

Figura 10. Score de calidad por secuencia - forward Individuo F1



**Figura 11.** Score de calidad por secuencia - reverse Individuo F1

## 6.2 Análisis Panel de 111 Genes

Se realizó el análisis de 111 genes asociados con predisposición al cáncer hereditario utilizando secuenciación de nueva generación en siete miembros afectados (D5, F1, F3, F9, F11, G1, J3) (ver figuras 2, 3 y 4) de una familia con diagnóstico clínico de síndrome de Li-Fraumeni like.

Se obtuvo una profundidad promedio de 203.53x. El porcentaje total no cubierto (<20x) fue en promedio de 0,017%. Se determinó en cada gen el porcentaje codificante no cubierto, por ejemplo, para el individuo F1 en los genes de mayor interés los valores fueron: *TP53*: 0.0%; *POT1*: 4.17%; *CHEK2*: 9.95%; *RECQL4*: 0.0%; *BRCA1*: 0.29%; *BRCA2*: 3.49%.

En el individuo F1 se encontró una variante en el gen *TP53* (NM\_000546.6):c.1129A>C; p.Thr377Pro, sin embargo según guías de *Clingen*, no se puede dar los criterios PM2 y PP2, por lo que la clasificación resulta incierta, adicionalmente se realizó la búsqueda en los otros seis individuos sin encontrar segregación de esta variante.

No se identificaron variantes patogénicas, probablemente patogénicas ni variantes de significado clínico incierto (VUS) en ninguno de los genes analizados en ninguno de los siete individuos evaluados.

### 6.3 Análisis de Exoma Completo en Individuo F9

Ante la ausencia de resultados significativos en el panel de 111 genes, se realizó un análisis de exoma completo en el individuo F9 (caso índice), se trata de una mujer diagnosticada con cáncer de seno a los 50 años, con antecedente familiar de una prima materna que fue diagnosticada con sarcoma a los 16 años ya fallecida, una prima materna con diagnóstico de cáncer de ovario antes de los 45 años, fallecida, un primo materno con linfoma cutáneo tipo micosis fungoides, un hermano con cáncer de próstata otro con linfoma Hodking y dos tías maternas con diagnóstico de cáncer de seno ya fallecidas.

En este análisis, no se encontraron variantes genéticas de interés que pudieran explicar la predisposición al cáncer hereditario en este individuo.

### 6.4 Panel Dirigido de 157 Genes en Individuo F9

Para profundizar en la búsqueda de variantes relevantes, se llevó a cabo un panel dirigido que incluyó 157 genes asociados con cáncer hereditario en el individuo F9.

Se identificaron las siguientes variantes:

*RECQL4* (NM\_004260): c.3251G>A; p.Ser1084Asn. Criterios de clasificación: PM2 soporte por frecuencia desconocida en población control, metapredictor otorga un BP4 soporte, sin embargo, el metapredictor REVEL no calcula un score específico. En *Clinvar* está con un ingreso clasificada como VUS para el fenotipo recesivo asociado, no está reportada en *The Human Gene Mutation Database* (HGMD) ni *Leiden Open Variation Database* (LOVD). Este gen, aunque principalmente se asocia al síndrome de Baller-Gerold y el síndrome de Rapadilino, ambos de herencia autosómica recesiva, no asociada con el fenotipo de la paciente, también se ha relacionado con las vías de daño al DNA e insuficiencia ovárica primaria y aunque no hay asociación firme con la susceptibilidad al síndrome de Li-Fraumeni se ha descrito como gen candidato.

*MAGI1* (NM\_001033057): c.2108T>C; p.Val703Ala. Criterios de clasificación: PM2 soporte por frecuencia desconocida en población control, metapredictores (BayesDel addAF, BayesDel noAF y REVEL) no son conclusivos, no está reportada en ninguna base de datos

(*ClinVar*, *The Human Gene Mutation Database* (HGMD) ni *Leiden Open Variation Database* (LOVD)). Este gen no tiene un fenotipo OMIM específico, en Genecards se asocia con tumores neuroendocrinos, sin embargo, no directamente con cáncer de mama ni osteosarcomas.

## 7. Discusión

Se realizó un análisis de segregación de las dos variantes de significado clínico incierto (VUS) identificadas en el individuo índice F9 en los genes *RECQL4* (c.3251G>A; p.Ser1084Asn) y *MAGI1* (c.2108T>C; p.Val703Ala) sin embargo, al verificar la presencia de estas variantes en los demás familiares estudiados no se identificó en ninguno de ellos. La variante en *RECQL4* se ha asociado previamente a un fenotipo de susceptibilidad a neoplasias mamarias, este gen ha emergido recientemente como un posible gen candidato implicado en algunos casos de síndrome de Li-Fraumeni en los que no se detectan variantes patogénicas en el gen *TP53* (Penkert, J., *et al.*, 2018). *RECQL4* codifica una DNA helicasa involucrada en la estabilidad del genoma y vías de reparación del DNA (Croteau, D. L., *et al.*, 2012); por su parte las variantes en *MAGI1* se han implicado con carcinoma neuroendocrino de células grandes de cuello uterino y papiloma atípico del plexo coroideo (Alday-Parejo, B. *et al.*, 2020; Zhu, R., *et al.*, 2019).

Esto indica que muy probablemente estas VUS representan hallazgos incidentales o polimorfismos raros en el individuo índice más que variantes responsables del fenotipo de susceptibilidad al cáncer observado en esta familia.

La ausencia de variantes deletéreas, es decir aquellas patogénicas o probablemente patogénicas en el gen *TP53* en la familia estudiada, que cumple tanto con los criterios clínicos clásicos para el síndrome de Li-Fraumeni como los modificados, es un hallazgo esperable, si se tiene en cuenta que hasta el 45% de los pacientes que cumplen los criterios clásicos de LFS y hasta el 80% de los pacientes que cumplen los criterios de Chompret o LFL quedan sin explicación genética (Penkert, J., *et al.*, 2018).

Para ello se plantean algunas posibles explicaciones:

1. Alteración de la metilación de *TP53*: La metilación del DNA es un proceso epigenético clave que regula la expresión génica al agregar grupos metilo a las regiones promotoras del gen. En el caso del gen *TP53*, la metilación anormal podría resultar en

la inactivación epigenética de este gen, comprometiendo su función como supresor tumoral. Esta inactivación podría ser un factor determinante en la expresión clínica del síndrome de Li-Fraumeni en aquellos individuos que no presentan variantes genéticas identificables. Se ha demostrado que la metilación de exones puede afectar la selección de exones y la generación de diferentes isoformas de p53, así como la unión de proteínas reguladoras de *splicing* (Kouidou, S., *et al.*, 2009).

2. Isoformas alternativas de p53: Además de la proteína p53 canónica codificada por el gen *TP53*, se conocen al menos 13 isoformas de p53 generadas por promotores alternativos, sitios de empalme diferentes o sitios de iniciación de la traducción (Marcel, V., *et al.*, 2011). Muchas de estas isoformas tienen funciones reguladoras sobre la isoforma canónica de p53. Se ha propuesto que la expresión aberrante de isoformas de p53 podría contribuir a la patogénesis del cáncer en familias con Li-Fraumeni sin variantes detectables en *TP53*, un ejemplo es la isoforma  $\Delta 133p53$  que inicia en el codón 133, es decir en el exón 5, manteniendo los exones 10 y 11 en la proteína (Vieler, M., & Sanyal, S., 2018), y se asocia con predisposición a cáncer, dado que inhibe la senescencia celular inducida por p53 y su pérdida podría contribuir al fenotipo en estas familias (Kouidou, S., *et al.*, 2009). Otro punto importante es que la regulación del empalme alternativo implica elementos como los ESE y ESS, así como factores de *splicing* específicos, de manera que la interacción entre estos elementos afectaría la generación de isoformas y la función de p53 (Lamolle, G., *et al.*, 2016).
3. Variantes intrónicas profundas o en regiones reguladoras no detectadas: En este estudio tanto en el panel como en el exoma completo se analizaron las regiones codificantes y sitios canónicos de *splicing* del gen *TP53*, sin embargo, se sabe que puede haber variantes en regiones intrónicas profundas o en regiones reguladoras distantes que podrían afectar la expresión y/o función del gen y no haber sido detectadas.

En cuanto al asesoramiento genético en esta familia, a la luz del conocimiento actual del síndrome de Li-Fraumeni y la ausencia de variantes claramente deletéreas, se realiza una cuidadosa asesoría genética a los individuos analizados. La evaluación de riesgos y las recomendaciones de seguimiento se basaron en una comprensión completa de los resultados genéticos y la consideración de la historia clínica de cada uno de los familiares.



Se establece entonces en esta familia una agregación familiar al cáncer que no se explica por variantes deletéreas en regiones codificantes de genes relacionados con cáncer hereditario, más posiblemente explicadas o por variantes intrónicas profundas, genes de regulación de *TP53* o un sustrato epigenético.

## 8. Conclusiones

En el análisis mediante panel dirigido de 111 genes asociados a cáncer hereditario en los 7 miembros afectados de la familia con criterios de síndrome Li-Fraumeni Like no se identificaron variantes patogénicas, probablemente patogénicas o de significado clínico incierto (VUS) en regiones codificantes del gen *TP53* ni en los otros genes relacionados con LF.

El análisis de exoma completo y el panel dirigido de 157 genes en el caso índice tampoco revelaron la presencia de variantes genéticas convincentemente asociadas con la agregación familiar de cáncer observada en esta familia.

Las variantes VUS identificadas en los genes *RECQL4* y *MAGI1* en el individuo índice no segregaron en el resto de familiares estudiados, por lo que se descarta su implicación causal en la enfermedad.

La agregación familiar de cáncer observada en esta familia permanece sin explicación genética mediante las técnicas de secuenciación aplicadas.

Entre los posibles mecanismos no evaluados que podrían contribuir al fenotipo se encuentran: metilación de regiones promotoras de *TP53*, variantes profundas intrónicas o en regiones reguladoras de *TP53* y alteraciones en la expresión de isoformas de *TP53*.

Se logra demostrar que este tipo de análisis de secuencia de nueva generación se están realizando en Colombia bajo estándares de alta calidad, con resultados óptimos, en menor tiempo y a un costo equiparable con el de otros países.

Se requieren estudios adicionales con técnicas complementarias para caracterizar más a fondo la posible base genética o epigenética de susceptibilidad al cáncer en esta familia.

## 9. Recomendaciones

Realizar estudios de metilación diferencial del promotor y regiones intrónicas del gen *TP53* en esta familia con el fin de aclarar si existe un sustrato epigenético que explique la aparición de cáncer.

Realizar un estudio de genoma completo en el que se pueda analizar las regiones intrónicas profundas y regiones reguladoras de *TP53* y de los demás genes candidatos.

## 10. Bibliografía

Achatz, M. I., & Zambetti, G. P. (2016). The Inherited p53 Mutation in the Brazilian Population. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(12), a026195. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026195>

Alday-Parejo, B., Richard, F., Wörthmüller, J., Rau, T., Galván, J. A., Desmedt, C., Santamaria-Martinez, A., & Rüegg, C. (2020). MAGI1, a New Potential Tumor Suppressor Gene in Estrogen Receptor Positive Breast Cancer. *Cancers*, 12(1), 223. <https://doi.org/10.3390/cancers12010223>

Batalini, F., Peacock, E. G., Stobie, L., Robertson, A., Garber, J., Weitzel, J. N., & Tung, N. M. (2019). Li-Fraumeni syndrome: not a straightforward diagnosis anymore-the interpretation of pathogenic variants of low allele frequency and the differences between germline PVs, mosaicism, and clonal hematopoiesis. *Breast cancer research : BCR*, 21(1), 107. <https://doi.org/10.1186/s13058-019-1193-1>

Berry, D. K., Gillis, N., Padron, E., Moore, C., Barton, L. V., Gewandter, K. R., Haskins, C. G., & Knepper, T. C. (2023). Interpretation of ambiguous TP53 test results: Mosaicism, clonal hematopoiesis, and variants of uncertain significance. *Journal of genetic counseling*, 10.1002/jgc4.1789. Advance online publication. <https://doi.org/10.1002/jgc4.1789>

Bhai, P., Levy, M. A., Rooney, K., Carere, D. A., Reilly, J., Kerkhof, J., Volodarsky, M., Stuart, A., Kadour, M., Panabaker, K., Schenkel, L. C., Lin, H., Ainsworth, P., & Sadikovic, B. (2021). Analysis of Sequence and Copy Number Variants in Canadian Patient Cohort With Familial Cancer Syndromes Using a Unique Next Generation Sequencing Based Approach. *Frontiers in genetics*, 12, 698595. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.698595>

Birch, J. M., Hartley, A. L., Tricker, K. J., Prosser, J., Condie, A., Kelsey, A. M., Harris, M., Jones, P. H., Binchy, A., & Crowther, D. (1994). Prevalence and diversity of constitutional

mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. *Cancer research*, 54(5), 1298–1304.

Calvete, O., Martínez, P., García-Pavía, P., Benítez-Buelga, C., Paumard-Hernández, B., Fernández, V., Domínguez, F., Salas, C., Romero-Laorden, N., García-Donas, J., Carrillo, J., Perona, R., Triviño, J. C., Andrés, R., Cano, J. M., Rivera, B., Alonso-Pulpon, L., Setien, F., Esteller, M., Rodríguez-Perales, S., ... Benítez, J. (2015). A mutation in the POT1 gene is responsible for cardiac angiosarcoma in *TP53*-negative Li-Fraumeni-like families. *Nature communications*, 6, 8383. <https://doi.org/10.1038/ncomms9383>

Cardona, A. F., Zatarain-Barrón, Z. L., Rubio, C., Martínez, S., Ruiz-Patiño, A., Ricaurte, L., Serna, A., Barrios, R., Garzón, J. C., Navarrete, C., Balaguera, A., Corrales, L., Rojas, L., & Arrieta, O. (2018). Probable hereditary familial overlap syndrome with multiple synchronous lung tumors. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 124, 279–282. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2018.08.022>

Chang, X., & Wang, K. (2012). wANNOVAR: annotating genetic variants for personal genomes via the web. *Journal of medical genetics*, 49(7), 433–436. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-100918>

Chompret, A., Brugières, L., Ronsin, M., Gardes, M., Dessarps-Freichay, F., Abel, A., Hua, D., Ligot, L., Dondon, M. G., Bressac-de Paillerets, B., Frébourg, T., Lemerle, J., Bonaïti-Pellié, C., & Feunteun, J. (2000). P53 germline mutations in childhood cancers and cancer risk for carrier individuals. *British journal of cancer*, 82(12), 1932–1937. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1167>

Croteau, D. L., Singh, D. K., Hoh Ferrarelli, L., Lu, H., & Bohr, V. A. (2012). RECQL4 in genomic instability and aging. *Trends in genetics: TIG*, 28(12), 624–631. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.08.003>

Daly MB, Pal T, Berry MP, Buys SS, Dickson P, Domchek SM, Elkhanany A, Friedman S, Goggins M, Hutton ML; CGC, Karlan BY, Khan S, Klein C, Kohlmann W; CGC, Kurian AW, Laronga C, Litton JK, Mak JS; LCGC, Menendez CS, Merajver SD, Norquist BS, Offit K, Pederson HJ, Reiser G; CGC, Senter-Jamieson L; CGC, Shannon KM, Shatsky R, Visvanathan K, Weitzel JN, Wick MJ, Wisinski KB, Yurgelun MB, Darlow SD, Dwyer MA. (2021). Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast, Ovarian, and Pancreatic, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2021 Jan 6;19(1):77-102. <https://doi:10.6004/jnccn.2021.0001>

Daly, M. B., Pal, T., Maxwell, K. N., Churpek, J., Kohlmann, W., AlHilli, Z., Arun, B., Buys, S. S., Cheng, H., Domchek, S. M., Friedman, S., Giri, V., Goggins, M., Hagemann, A., Hendrix, A., Hutton, M. L., Karlan, B. Y., Kasseem, N., Khan, S., Khoury, K., ... Darlow, S. D. (2023). NCCN Guidelines® Insights: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast, Ovarian, and Pancreatic, Version 2.2024. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*, 21(10), 1000–1010. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2023.0051>

De Andrade, K. C., Frone, M. N., Wegman-Ostrosky, T., Khincha, P. P., Kim, J., Amadou, A., Santiago, K. M., Fortes, F. P., Lemonnier, N., Mirabello, L., Stewart, D. R., Hainaut, P., Kowalski, L. P., Savage, S. A., & Achatz, M. I. (2019). Variable population prevalence estimates of germline *TP53* variants: A gnomAD-based analysis. *Human mutation*, 40(1), 97–105. <https://doi.org/10.1002/humu.23673>

De Andrade, K. C., Strande, N. T., Kim, J., Haley, J. S., Hatton, J. N., Frone, M. N., Khincha, P. P., Thone, G. M., Mirshahi, U. L., Schneider, C., Desai, H., Dove, J. T., Smelser, D. T., Penn Medicine BioBank, Regeneron Genetics Center, Levine, A. J., Maxwell, K. N., Stewart, D. R., Carey, D. J., & Savage, S. A. (2024). Genome-first approach of the prevalence and cancer phenotypes of pathogenic or likely pathogenic germline *TP53* variants. *HGG advances*, 5(1), 100242. <https://doi.org/10.1016/j.xhgg.2023.100242>

Eeles R. A. (1995). Germline mutations in the *TP53* gene. *Cancer surveys*, 25, 101–124.

Fortuno, C., Richardson, M., Pesaran, T., Yussuf, A., Horton, C., James, P. A., & Spurdle, A. B. (2023). *CHEK2* is not a Li-Fraumeni syndrome gene: time to update public resources. *Journal of medical genetics*, 60(12), 1215–1217. <https://doi.org/10.1136/jmg-2023-109464>

Garber, J. E., & Offit, K. (2005). Hereditary cancer predisposition syndromes. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(2), 276–292. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.10.042>

Gargallo, P., Yáñez, Y., Segura, V., Juan, A., Torres, B., Balaguer, J., Oltra, S., Castel, V., & Cañete, A. (2020). Li-Fraumeni syndrome heterogeneity. *Clinical & translational oncology: official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 22(7), 978–988. <https://doi.org/10.1007/s12094-019-02236-2>

Garutti, M., Foffano, L., Mazzeo, R., Michelotti, A., Da Ros, L., Viel, A., Miolo, G., Zambelli, A., & Puglisi, F. (2023). Hereditary Cancer Syndromes: A Comprehensive Review with a Visual Tool. *Genes*, 14(5), 1025. <https://doi.org/10.3390/genes14051025>

Globocan 2020 Graph production: Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr>)

Grissom, A. A., & Friend, P. J. (2016). Multigene Panel Testing for Hereditary Cancer Risk. *Journal of the advanced practitioner in oncology*, 7(4), 394–407. <https://doi:10.6004/jadpro.2016.7.4.3>

Insuasty-Enríquez, J. S., Ortega Apraez, V., Arias-Quiroz, E. J., Alarcón-Tarazona, M. L., & Calderón-Cortés, C. A. (2021). Síndrome de Li-Fraumeni: Presentación metacrónica de sarcoma de tejidos blandos, sarcoma cardíaco y cáncer gástrico. *Acta Médica Colombiana*, 47(1). <https://doi.org/10.36104/amc.2022.2198>

Jouenne, F., Chauvot de Beauchene, I., Bollaert, E., Avril, M. F., Caron, O., Ingster, O., Lecesne, A., Benusiglio, P., Terrier, P., Caumette, V., Pissaloux, D., de la Fouchardière, A., Cabaret, O., N'Diaye, B., Velghe, A., Bougeard, G., Mann, G. J., Koscielny, S., Barrett, J. H., Harland, M., ... Bressac-de Pailleters, B. (2017). Germline CDKN2A/P16INK4A mutations contribute to genetic determinism of sarcoma. *Journal of medical genetics*, 54(9), 607–612. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2016-104402>

Kasmintan A. Schrader, Ravi Sharaf, Shaheen Alanee, and Kenneth Offit. Genetic Factors: Hereditary Cancer Predisposition Syndromes. (2015) Part I: Science of Clinical Oncology chapter 2

Kouidou, S., Malousi, A., & Maglaveras, N. (2009). Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndrome mutations in p53 are associated with exonic methylation and splicing regulatory elements. *Molecular carcinogenesis*, 48(10), 895–902. <https://doi.org/10.1002/mc.20537>

Kratz, C. P., Freycon, C., Maxwell, K. N., Nichols, K. E., Schiffman, J. D., Evans, D. G., Achatz, M. I., Savage, S. A., Weitzel, J. N., Garber, J. E., Hainaut, P., & Malkin, D. (2021). Analysis of the Li-Fraumeni Spectrum Based on an International Germline TP53 Variant Data Set: An International Agency for Research on Cancer TP53 Database Analysis. *JAMA oncology*, 7(12), 1800–1805. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2021.4398>

Kulkarni, A., & Carley, H. (2016). Advances in the recognition and management of hereditary cancer. *British medical bulletin*, 120(1), 123–138. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldw046>

Kumamoto, T., Yamazaki, F., Nakano, Y., Tamura, C., Tashiro, S., Hattori, H., Nakagawara, A., & Tsunematsu, Y. (2021). Medical guidelines for Li-Fraumeni syndrome 2019, version 1.1. *International journal of clinical oncology*, 26(12), 2161–2178. <https://doi.org/10.1007/s10147-021-02011-w>

Lamolle, G., Marin, M., & Alvarez-Valin, F. (2006). Silent mutations in the gene encoding the p53 protein are preferentially located in conserved amino acid positions and splicing enhancers. *Mutation research*, 600(1-2), 102–112.

<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.03.004>

Li, F. P., & Fraumeni, J. F., Jr (1969). Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome. *Journal of the National Cancer Institute*, 43(6), 1365–1373.

Liu, Y., Wang, M., Chen, Q., Zheng, Q., Li, G., Cheng, Q., Liu, S., & Ye, S. (2019). A novel heterozygous large deletion of MSH6 gene in a Chinese family with Lynch syndrome. *Gene*, 704, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.04.011>

Lynch, H. T., & de la Chapelle, A. (2003). Hereditary colorectal cancer. *The New England journal of medicine*, 348(10), 919–932. <https://doi.org/10.1056/NEJMra012242>

Mester, J. L., Jackson, S. A., Postula, K., Stettner, A., Solomon, S., Bissonnette, J., Murphy, P. D., Klein, R. T., & Hruska, K. S. (2020). Apparently Heterozygous TP53 Pathogenic Variants May Be Blood Limited in Patients Undergoing Hereditary Cancer Panel Testing. *The Journal of molecular diagnostics: JMD*, 22(3), 396–404.

<https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2019.12.003>

Ossa, C. A., Molina, G., & Cock-Rada, A. M. (2016). Li-Fraumeni syndrome. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud*, 36(2), 182–187.

<https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.2793>

Penkert, J., Schmidt, G., Hofmann, W., Schubert, S., Schieck, M., Auber, B., Ripperger, T., Hackmann, K., Sturm, M., Prokisch, H., Hille-Betz, U., Mark, D., Illig, T., Schlegelberger, B., & Steinemann, D. (2018). Breast cancer patients suggestive of Li-Fraumeni syndrome: mutational spectrum, candidate genes, and unexplained heredity. *Breast cancer research : BCR*, 20(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s13058-018-1011-1>

Pilarski R. (2019). Cowden syndrome: a critical review of the clinical literature. *J Genet Couns*. 2009 Feb;18(1):13-27. <https://doi:10.1007/s10897-008-9187-7>

Renau-Petel, M., Charbonnier, F., Théry, J. C., Fermey, P., Lienard, G., Bou, J., Coutant, S., Vezain, M., Kasper, E., Fourneaux, S., Manase, S., Blanluet, M., Leheup, B., Mansuy, L., Champigneulle, J., Chappé, C., Longy, M., Sévenet, N., Paillerets, B. B., Guerrini-Rousseau, L., ... Bougeard, G. (2018). Contribution of *de novo* and mosaic TP53 mutations



to Li-Fraumeni syndrome. *Journal of medical genetics*, 55(3), 173–180.  
<https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2017-104976>

Schneider, K., Zelle, K., Nichols, K. E., & Garber, J. (1999). Li-Fraumeni Syndrome. In M. P. Adam (Eds.) et. al., *GeneReviews®*. Rev 2019. University of Washington, Seattle.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1311/>

Schwartz, A. N., Hyman, S. R., Stokes, S. M., Castillo, D., Tung, N. M., Weitzel, J. N., Rana, H. Q., & Garber, J. E. (2021). Evaluation of TP53 Variants Detected on Peripheral Blood or Saliva Testing: Discerning Germline From Somatic TP53 Variants. *JCO precision oncology*, 5, 1677–1686. <https://doi.org/10.1200/PO.21.00278>

Sorrell, A. D., Espenschied, C. R., Culver, J. O., & Weitzel, J. N. (2013). Tumor protein p53 (*TP53*) testing and Li-Fraumeni syndrome: current status of clinical applications and future directions. *Molecular diagnosis & therapy*, 17(1), 31–47. <https://doi.org/10.1007/s40291-013-0020-0>

Subasri, V., Light, N., Kanwar, N., Brzezinski, J., Luo, P., Hansford, J. R., Cairney, E., Portwine, C., Elser, C., Finlay, J. L., Nichols, K. E., Alon, N., Brunga, L., Anson, J., Kohlmann, W., de Andrade, K. C., Khincha, P. P., Savage, S. A., Schiffman, J. D., Weksberg, R., ... Malkin, D. (2023). Multiple Germline Events Contribute to Cancer Development in Patients with Li-Fraumeni Syndrome. *Cancer research communications*, 3(5), 738–754. <https://doi.org/10.1158/2767-9764.CRC-22-0402>

Tornaletti, S., & Pfeifer, G. P. (1995). Complete and tissue-independent methylation of CpG sites in the p53 gene: implications for mutations in human cancers. *Oncogene*, 10(8), 1493–1499.

Toss, A., Venturelli, M., Peterle, C., Piacentini, F., Cascinu, S., & Cortesi, L. (2017). Molecular Biomarkers for Prediction of Targeted Therapy Response in Metastatic Breast Cancer: Trick or Treat?. *International journal of molecular sciences*, 18(1), 85. <https://doi.org/10.3390/ijms18010085>

Vahteristo, P., Tamminen, A., Karvinen, P., Eerola, H., Eklund, C., Aaltonen, L. A., Blomqvist, C., Aittomäki, K., & Nevanlinna, H. (2001). p53, *CHK2*, and *CHK1* genes in Finnish families with Li-Fraumeni syndrome: further evidence of *CHK2* in inherited cancer predisposition. *Cancer research*, 61(15), 5718–5722.

Vieler, M., & Sanyal, S. (2018). p53 Isoforms and Their Implications in Cancer. *Cancers*, 10(9), 288. <https://doi.org/10.3390/cancers10090288>

Vogel W. H. (2017). Li-Fraumeni Syndrome. *Journal of the advanced practitioner in oncology*, 8(7), 742–746. <https://doi.org/10.6004/jadpro.2017.8.7.7>

Weiss, J. M., Gupta, S., Burke, C. A., Axell, L., Chen, L. M., Chung, D. C., Clayback, K. M., Dallas, S., Felder, S., Gbolahan, O., Giardiello, F. M., Grady, W., Hall, M. J., Hampel, H., Hodan, R., Idos, G., Kanth, P., Katona, B., Lamps, L., Llor, X., ... Campbell, M. (2021). NCCN Guidelines® Insights: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal, Version 1.2021. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN*, 19(10), 1122–1132. <https://doi.org/10.1164/jnccn.2021.0048>

<https://www.lfsassociation.org/what-is-lfs/lfs-criteria/>