

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

TESI DOCTORAL

Estudi de mutacions en línia germinal en gens associats a l'hiperparatiroidisme primari

Isabel Mazarico Altisent



UAB

**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Departament de Medicina

Programa de Doctorat en Medicina
Sabadell, 2025

ESTUDI DE MUTACIONS EN LÍNIA GERMINAL EN GENS ASSOCIATS A L'HIPERPARATIROIDISME PRIMARI

Tesi doctoral realitzada i presentada per:

Isabel Mazarico Altisent

Per optar al títol de Doctora

Directors: Ismael Capel Flores i Mercedes Rigla Cros

Tutora: Maria Assumpta Caixàs Pedragós

Programa de Doctorat en Medicina

Departament de Medicina. Facultat de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona

Sabadell, 2025

AGRAÏMENTS

Vull començar mostrant el meu agraïment més gran per a l'Ismael, qui ha confiat en mi des del primer dia i m'ha ajudat, inspirat, animat i acompanyat en tot el procés de la tesi. Ho he dit en diferents ocasions i ho segueixo pensant: difícilment m'hagués plantejat fer la tesi doctoral si no arriba a ser amb tu i en el moment en què ho vam pensar. Gràcies! Sempre he admirat la teva intel·ligència, dedicació i constància. Ets brillant. Em considero ben afortunada de poder aprendre de tu cada dia. Seguidament, vull agrair a la Neus la seva entrega, interès i dedicació. De ser una persona que no coneixia, ha passat a ser una peça clau en la realització i comprensió de tota la part de genètica que inclou aquest projecte. Gràcies per ajudar-me i motivar-me, per la teva disponibilitat i per l'estima que m'has transmès durant tots els anys del doctorat. A la Mercedes i a l'Assumpta us he d'agrair la confiança que m'heu donat durant el procés de la tesi i també durant tots els anys de residència i d'adjunta. Us considero a les dues unes endocrinòlogues de referència, treballadores i amb una gran dedicació per la ciència. Els vostres consells sempre han estat i són benvinguts i necessaris.

Mereixen una menció especial la Lara, la Laia i l'Albert, que des d'R1 han estat uns referents per a mi (així com la Flor, la millor resident petita que podia tenir). Totes quatre han estat i són unes companyes excel·lents, així com bones amigues, sempre disponibles per consolar-me quan ho necessito i aconsellar-me en molts àmbits de la vida professional i personal. Per a la resta d'adjunts/es (David, Olga, Alba i José Miguel), residents (en especial l'Ana, l'Andreea i la Valeria, les meves nenes, a punt de ser ja unes grans adjuntes) i per a tot el personal del servei d'Endocrinologia i Nutrició només tinc bones paraules. Som un equip. Amb vosaltres venir a treballar cada dia es fa lleuger. Em feu sentir com a casa. Poder compartir dubtes, penes, alegries, curiositats i casos interessants o complicats amb tots vosaltres és una sort.

Rocío, moltes gràcies per la teva ajuda en la realització de les analítiques a tots els pacients de l'estudi, i per fer-ho sempre amb eficàcia i amabilitat. Així mateix, voldria agrair a la resta d'infermeres d'hospital de dia la seva col·laboració sempre que l'he necessitat. A la Tona, d'Anatomia Patològica, t'agraeixo l'ajuda durant la recopilació de mostres i, sobretot, la motivació i interès que has posat en el tema. Els teus consells han estat de gran ajuda. Una menció especial també per als cirurgians de Cap i Coll de la casa, el Santi i el Xavier. Em va agradar molt poder assistir a l'acte quirúrgic d'una de les meves pacients més especials, gràcies per convidar-m'hi. També vull mostrar el meu agraïment a tots i cadascun dels pacients que han accedit a participar en aquest projecte, així com als seus familiars. Gràcies per la paciència (sobretot amb algunes visites infinites plenes de preguntes i més preguntes per reconstruir arbres genealògics), per l'interès i per motivar-nos a voler aprendre cada dia una mica més. Sense vosaltres, la nostra feina no tindria cap sentit.

En l'àmbit familiar, cal destacar la gran tasca que han realitzat les àvies i l'avi del Roger els darrers mesos. Això m'ha permès escriure el manuscrit durant el permís de maternitat i l'excedència, fet que veia pràcticament impossible quan estava embarassada. Especialment, un súper agraïment a la *iaia de la tesi*, la meva mare, que ho ha tingut ben clar des del principi: "La tesi s'ha d'acabar, si cal dormiré menys hores". Mama, ets una persona persistent, resiliència i pacient. Gràcies per haver-me ensenyat aquestes qualitats, així com moltes altres, ets la millor. I a tu, papa, gràcies per transmetre'm l'amor cap a la ciència i el coneixement, així com la importància de ser una persona justa i bona. Us estimo molt als dos. Al meu germà Albert, vull agrair-li l'estima i els bons consells. Per molt que a vegades em queixi, els teus tocs d'atenció i la teva ajuda en molts aspectes de la vida són benvinguts i agraïts. Per a la resta de la família, tiets, cosins, cunyats, nebots i avis (els sempre presents iaia Rosita i avi Paco), gràcies per estimar-me com ho feu. Quina fortuna tenir-vos.

Als amics de sempre, la família que triem, els ÉremSomSerem (Laia, Olga, Sergi, Gerard, Pasti, Rodri, Kle i Lota) gràcies per existir i per fer-me sentir lliure i amb una confiança extrema cada vegada que ens veiem. Amb vosaltres sento que puc dir absolutament tot el que em passi pel cap i que no seré jutjada. Gràcies per escoltar-me sempre i interessar-vos per la meva vida, em feu sentir valorada. Les sortides trimestrals són or. Lota, gràcies per haver-me explicat el mètode Kaizen l'estiu passat, va ser una empenta per començar a escriure el manuscrit, encara que fos un minut al dia els primers dies. Les circumstàncies de la vida m'han portat a conèixer el darrer any la que ara és la meva filòloga de capçalera i una molt bona amiga. Gràcies Bàrbara per haver dedicat unes estones del teu dia a aconsellar-me i corregir-me dubtes lingüístics del manuscrit. A la Marta, la meva millor amiga, padrina i companya d'embaràs, de part i de criança, et vull recordar el molt que t'estimo i et necessito. Sempre em fas sentir important i valorada. Els teus ànims, consells i bones vibracions m'arriben a diari i m'ajuden. Ets imprescindible. No vull deixar de mencionar la resta d'amics que formen part de la meva vida i que són cadascun d'ells i elles essencials, tant de l'àmbit mèdic, del *padeler* com del musical. No sempre és possible veure'ns amb la freqüència que voldríem, però quan ho fem sembla que el temps no hagi passat.

Vull acabar donant un gràcies ben gran al meu company de vida, el Sergi, per tot. Per escoltar-me, aconsellar-me i estimar-me com ho fas cada dia. Amb tu, em sento a casa. Penso en veu alta, ric, em diverteixo i sento que podem compartir-ho tot. La teva última lectura de la tesi, amb correccions incloses (de bon periodista i d'un recent, però gran, professor de Llengua Catalana), és una prova més del teu gran amor. I, finalment, Roger, unes últimes paraules per a tu, fill. El darrer any ha estat el més intens, cansat i feliç de tota la meva vida gràcies a haver-te conegut. És difícil expressar en paraules el que sento per tu. Et vull donar les gràcies per ser un sol, per la teva mirada plena d'amor i simpatia, per fer-me descobrir sentiments que desconeixia que existien i per haver-me permès escriure la tesi durant aquests mesos en petits moments. El meu cervell actualment, amb la disminució de substància gris corresponent després de l'embaràs i el postpart, està dividit en dos coneixements bàsics: l'hiperparatiroidisme familiar i la teva persona.

ABREVIACIONS

ACMG: American College of Medical Genetics and Genomics

AD: herència autosòmica dominant

ADN: àcid desoxirribonucleic

AIP: gen *aryl hydrocarbon receptor-interacting protein*

AF: antecedents familiars

AP: antecedents mèdics personals

APC: gen *adenomatous polyposis coli*

AP2S1: gen *adaptor related protein complex 2 subunit sigma 1*

AR: herència autosòmica recessiva

ARN: àcid ribonucleic

ASBMR: American Society for Bone and Mineral Research

Ca: calci plasmàtic

CaSR: receptor-sensor sensible al calci

CASR: gen *calcium sensing receptor*

CCCR: ràtio d'aclariment de calci/creatinina

CCr: aclariment de creatinina

CDC73: gen *cell division cycle 73*

CDKs: quinases dependent de ciclina

CDKIs: gens *inhibidors de quinases dependent de ciclina*

CgA: cromogranina A

CLU: cortisol lliure urinari

CMT: carcinoma medul·lar de tiroides

CNV: *copy number variants* o variacions en nombre de còpies

CP: carcinoma paratiroidal

Cr: creatinina sèrica

D: dona

DMO: densitometria òssia

ESE: The European Society of Endocrinology

EUA: Estats Units d'Amèrica

FG: filtrat glomerular

FIHP: hiperparatiroidisme familiar aïllat

FO: fibromes ossificants

FSH: hormona estimulant del fol·licle

Gastr: gastrina
GCM2: gen *glial cells missing transcription factor 2*
GNA11: gen *G protein subunit alpha 11*
H: home
HGMD: Human Gene Mutation Database
HHF: hipercalcèmia hipocalciúrica familiar
HP: histologia paratiroidal
HPNST: hiperparatiroidisme neonatal transitori
HPP: hiperparatiroidisme primari
HPPF: hiperparatiroidisme primari hereditari o familiar
HPPNC: hiperparatiroidisme primari normocalcèmic
HPS: hiperparatiroidisme secundari
HPT-JT: hiperparatiroidisme lligat a tumor mandibular
Hr: patró d'herència
ID: número d'identificació de cada participant de la cohort
IGF1: factor de creixement semblant a la insulina 1
LH: hormona luteïnitant
LOH: pèrdua d'heterozigosi
LP: *likely pathogenic* o probablement patogènica
MEN1: neoplàsia endocrina múltiple tipus 1
MEN2: neoplàsia endocrina múltiple tipus 2
MEN4: neoplàsia endocrina múltiple tipus 4
MEN5: neoplàsia endocrina múltiple tipus 5
MLPA: *multiplex ligation-dependent probe amplification*
MMG: malaltia multiglandular
NA: no avaluat
NGS: *next generation sequencing*
Nom: nomenclatura
NPDP: neoplàsia paratiroidal amb dèficit de parafibromina
NSHPT: hiperparatiroidisme primari neonatal greu
OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man
OMS: Organització Mundial de la Salut
P: fosfatèmia
Prl: prolactina
PTH: parathormona

PTHbio: PTH de 3a generació

PTHi: PTH intacta o de 2a generació

PTHio: PTH intraoperatòria

PTHrp: pèptid o proteïna relacionada amb la PTH

RM: ressonància magnètica

RN: rang de normalitat

SLC12A1: gen *Solute Carrier Family 12 Member 1*

TC: tomografia computada

TC-TA: tomografia computada toracoabdominal

TGEP: tumors gastro-entero-pancreàtics o de les cèl·lules dels illots pancreàtics

TPA: tumor paratiroidal atípic

TRPV6: gen *transient receptor potential cation channel subfamily V member 6*

T(f): testosterona lliure

T(t): testosterona total

UPD: disomia uniparental

V: classificació de les variants segons les guies ACMG

VUS: variants de significat incert

WES: Whole-Exome Sequencing

WGS: Whole-Genome Sequencing

X: grup heterogeni

1,25(OH)₂D: calcitriol

ÍNDEX

RESUM.....	9
SUMMARY.....	11
1.INTRODUCCIÓ	13
1.1 L'Hiperparatiroidisme primari: aspectes generals.....	13
1.1.1 Epidemiologia.....	13
1.1.2 Diagnòstic.....	13
1.1.3 Manifestacions clíniques.....	14
1.1.4 Tractament.....	15
1.1.5 Anatomia patològica i mecanismes moleculars.....	16
1.2 L'Hiperparatiroidisme primari familiar.....	19
1.2.1 Formes sindròmiques.....	20
1.2.2 Formes no sindròmiques.....	28
1.2.3 Cribratge genètic de l'hiperparatiroidisme familiar.....	33
2. HIPÒTESI.....	41
3. OBJECTIUS.....	42
3.1 Objectiu principal.....	42
3.2 Objectius secundaris.....	42
4. COMPENDI DE PUBLICACIONS.....	43
4.1 Primera publicació.....	43
4.2 Segona publicació.....	56
5. RESUM GLOBAL DELS RESULTATS.....	69
6. RESUM GLOBAL DE LA DISCUSSIÓ DELS RESULTATS OBTINGUTS.....	83
7. CONCLUSIONS.....	91
8. LÍNIES DE FUTUR.....	92
9. BIBLIOGRAFIA.....	93
10. ANNEXOS.....	110
10.1 Annex 1: finançament.....	110
10.2 Annex 2: material suplementari del primer article.....	110

RESUM

L'hiperparatiroidisme familiar o hereditari (HPPF) podria explicar fins al 10-15% dels casos d'hiperparatiroidisme primari (HPP), tot i que aquest percentatge pot ser molt més elevat en pacients amb determinades característiques de risc. En general, es considera una patologia infradiagnosticada i encara poc coneguda. S'han fet estudis en diferents territoris amb pacients amb fenotip de risc per avaluar-ne la prevalença i els tipus més freqüents. Tanmateix, les poblacions estudiades i els mètodes usats són força heterogenis, i els resultats mostren molta variabilitat. A més, pocs d'ells són fets en població de l'àrea mediterrània i, concretament, no n'hi ha cap que avaluï població espanyola. Això provoca una mancança de guies clíniques i d'evidència científica sobre a quins pacients caldria realitzar un estudi genètic i quins gens caldria avaluar en cada cas. Tanmateix, el fet de ser portador o portadora d'una mutació en línia germinal d'algun dels gens relacionats amb l'HPPF té implicacions clíniques, algunes d'elles potencialment greus, tant pel subjecte avaluat com pels seus familiars. La present tesi doctoral ha pretès determinar la prevalença de mutacions en línia germinal dels gens associats a l'HPPF en individus amb hiperparatiroidisme que presentessin un fenotip de risc, en població resident a l'àrea Mediterrània. Per aconseguir-ho, es va seleccionar una cohort de pacients amb hiperparatiroidisme primari que tinguessin alguna característica de risc d'HPPF (n=40) i se'ls va realitzar un estudi genètic cercant mutacions en línia germinal mitjançant un panell de gens personalitzat (*AIP*, *AP2S1*, *CASR*, *CDC73*, *CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN2B*, *CDKN2C*, *GCM2*, *GNA11*, *MEN1*, *PTH*, *RET* i *TRPV6*). El projecte consta de dos articles. El primer article exposa la detecció de tres variants en línia germinal en gens de la família d'inhibidors de quinasa dependents de ciclina (*CDKIs*), prèviament no descrites a la literatura, i en caracteritza els seus portadors i familiars. Es van descobrir dues mutacions al gen *CDKN1B* en dos pacients que presentaven tumors paratiroidals atípics i una variant de significat incert (VUS) al gen *CDKN2C* a una pacient amb un adenoma paratiroidal quístic que havia estat diagnosticada d'HPP als 28 anys. En els dos primers casos no es va detectar pèrdua d'heterozigosi ni variacions en nombre de còpies en les anàlisis genètiques de les peces tumorals paratiroidals. En canvi, a la peça tumoral de la portadora d'una mutació a *CDKN2C* es va observar un guany de cromosoma 1 sencer i una disomia uniparental somàtica del mateix cromosoma. Els dos individus portadors de variants a *CDKN1B* van ser diagnosticats de síndrome de MEN4 atesa l'alteració genètica i l'afectació paratiroidal mencionada. A nivell fenotípic, tots dos presentaven, addicionalment, altres tumors: un adenoma de còlon amb displàsia i lipomes atípics en un dels casos i una població de cèl·lules T aberrant en l'altre. Durant el cribratge d'altres tumors, es va detectar un microadenoma hipofisiari no funcionant en la pacient portadora de la variant a *CDKN2C*. A través dels estudis de segregació familiar es va detectar una portadora de la mateixa variant a *CDKN2C*, fet que va permetre diagnosticar-la de forma precoç d'HPP amb osteoporosi associada. El segon article descriu el projecte general de la tesi. Reporta un estudi observacional ambispectiu de 40 pacients amb fenotip de risc d'HPPF a qui es va realitzar un estudi genètic amb el panell mencionat de catorze gens. Vam detectar 9/40 variants en algun dels gens (22,5%), cinc de les quals, patogèniques o probablement patogèniques (12,5%): dues a *CDKN1B* (gen associat a MEN4), una VUS a *CDKN2C*, quatre variants a *CASR* (una d'elles VUS i les altres de classe 1 o 2) i dues VUS al gen *TRPV6*. La comparació de les variables clíniques i analítiques dels participants en funció del resultat de l'estudi genètic no va mostrar diferències estadísticament significatives entre els grups (portadors de variants en contraposició a no portadors), a excepció de la ràtio d'aclariment de calci creatinina (CCCR), que va ser inferior en el grup amb estudi genètic positiu. El grup de pacients portadors d'alguna variant va presentar de forma més freqüent dos o més factors de risc d'HPPF, en comparació amb el grup amb estudi genètic negatiu. Tot i això, les diferències no van ser estadísticament significatives. En conclusió, l'estudi genètic de pacients amb HPP i alguna característica de risc d'HPPF mitjançant el panell seleccionat va tenir una

taxa diagnòstica rellevant en població de l'àrea mediterrània. La detecció de variants en línia germinal en algun dels gens estudiats ha permès un maneig clínic més adequat tant dels pacients com dels seus familiars, així com la implementació d'una estratègia racional d'estudi genètic a la pràctica clínica habitual al nostre medi.

SUMMARY

Familial hyperparathyroidism (HPPF) could account for up to 10-15% of primary hyperparathyroidism (HPP) cases, although this percentage may be much higher in patients with certain risk characteristics. It is considered a likely underdiagnosed and still poorly understood condition. Some authors have reported the prevalence and characteristics of this disease in different geographic areas. Even so, data until now show significant variability and heterogeneous methods and population studied. Moreover, very few of these studies have been carried out in Mediterranean populations, and specifically, none of them have assessed the Spanish population. Therefore, there is a lack of clinical guidelines and scientific evidence about which patients with HPP should undergo genetic testing and which specific genes should be evaluated. It is worth noting that having a germline mutation in a gene associated with HPPF means clinical implications, some of which may be potentially serious for both the index case and their potentially affected family members. This doctoral thesis aimed to determine the prevalence of germline mutations in genes associated with HPPF in hyperparathyroidism patients who exhibited a risk phenotype, in a population residing in the Mediterranean area. A cohort of patients with HPP and at least one risk feature for inherited origin was selected (n=40). These individuals underwent genetic testing to identify germline mutations using a gene panel (*AIP*, *AP2S1*, *CASR*, *CDC73*, *CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN2B*, *CDKN2C*, *GCM2*, *GNA11*, *MEN1*, *PTH*, *RET*, and *TRPV6*). The project consists of two articles; The first paper describes the detection of three germline variants in cyclin-dependent kinase inhibitor genes (*CDKIs*), previously unreported in the literature, and characterizes their carriers and relatives. Two mutations were discovered in the *CDKN1B* gene in two patients with atypical parathyroid tumors, and one variant of uncertain significance (VUS) was detected in the *CDKN2C* gene in a patient with a cystic parathyroid adenoma who had been diagnosed with HPP at the age of 28. In the first two cases, no loss of heterozygosity or copy number variations were identified in the parathyroid tumor specimens. In contrast, in the third case, a gain of the entire chromosome 1 and a somatic uniparental disomy of the same chromosome was observed. Both carriers of *CDKN1B* variants were diagnosed with MEN4 syndrome due to the genetic alteration and the aforementioned parathyroid involvement. Phenotypically, both also presented with other tumors: colon adenoma with dysplasia and atypical lipomas in one case, and aberrant T-cell population in the other. During screening for other tumors, a non-functioning pituitary microadenoma was detected in the patient carrying a *CDKN2C* variant. Family segregation studies identified another carrier of the same *CDKN2C* mutation, fact that enabled the early diagnosis of HPP with associated osteoporosis. The second paper describes an observational ambispective study, which was the general project of the thesis. A cohort of 40 individuals with a risk phenotype for HPPF were recruited for genetic testing, using the aforementioned gene panel. Variants were detected in nine out of 40 patients (22.5%), five of which were pathogenic or likely pathogenic (12.5%): two variants in *CDKN1B* (gene associated with MEN4), one VUS in *CDKN2C*, four variants in *CASR* (one classified as VUS, the others as class 1 or 2 variants), and two variants in the *TRPV6* gene classified as VUS. The comparison of clinical and analytical variables among participants based on the genetic study results did not show statistically significant differences between groups (variant carriers versus non-carriers), except for the calcium-creatinine clearance ratio (CCCR), which was lower in the group with positive genetic study results. The group of carriers more frequently presented with two or more HPPF risk factors compared to the group with negative genetic study results, although the differences were not statistically significant. In conclusion, genetic testing of patients with HPP and a risk feature for inherited origin using the selected panel demonstrated a significant diagnostic rate in the Mediterranean population. The detection of germline variants in certain genes enabled more appropriate clinical management of both the patients and their relatives, as well as the implementation of a rational genetic testing strategy in routine clinical practice in our setting.

1. INTRODUCCIÓ

1.1 L'Hiperparatiroidisme primari: aspectes generals

1.1.1 Epidemiologia

L'hiperparatiroidisme primari (HPP) és la causa més freqüent d'hipercalcèmia, amb una prevalença global del 0,84-0,86%. La incidència augmenta amb l'edat i amb el sexe femení, essent més freqüent en dones postmenopàusiques (1–4). En canvi, en menors de 50 anys, la incidència sol ser similar entre sexes (5). Els darrers anys la prevalença ha anat augmentant a conseqüència d'un increment generalitzat de les determinacions de calci plasmàtic i també d'una major consciència de certes condicions clíniques com l'osteoporosi o les litiasis renals a escala poblacional (6–9).

1.1.2 Diagnòstic

El diagnòstic de l'HPP és principalment bioquímic i requereix d'uns nivells de parathormona (PTH) elevats o inadequadament normals amb nivell de calcèmia alt (sigui calci plasmàtic total corregit per nivells d'albumina o calci iònic). Es recomana confirmar aquesta troballa en dues ocasions separades. S'ha vist que la sensibilitat del calci total i del calci iònic per diagnosticar HPP és similar (10–12). Tanmateix, la hipoalbuminèmia pot falsejar el resultat del calci plasmàtic total, fent-lo disminuir, motiu pel qual en aquests casos es recomana usar la fórmula corregida de calci total o el calci iònic (12). El límit alt de la normalitat de calcèmia varia en funció del laboratori, però majoritàriament es considera elevada quan els nivells són superiors a 10,2-10,4 mg/dL. En general, es parla d'hipercalcèmia moderada quan els nivells de calcèmia total (corregida per albumina) són d'11,4-14 mg/dL i greu quan se superen els 14 mg/dL (8).

A l'hora de fer el diagnòstic d'HPP, també cal tenir en compte l'hiperparatiroidisme normocalcèmic (HPPNC), que es defineix per nivells plasmàtics de PTH elevats amb normocalcèmia, un cop excloses totes les possibles causes d'hiperparatiroidisme secundari (HPS), com ara: dèficit de vitamina D, malaltia renal crònica, síndromes malabsortius (com cèliaquia, malaltia inflamatòria intestinal, cirurgia bariàtrica o insuficiència pancreàtica) i presència de fàrmacs (diürètics, liti, bifosfonats, denosumab, inhibidors de la bomba de protons, inhibidors del cotransportador de sodi-glucosa tipus 2, etc.) (3,13). També s'han descrit patrons d'HPS, amb calcèmia normal i PTH elevada, en casos de consum oral insuficient de calci, que es resolen un cop la ingesta es normalitza (14). Per últim, es parla d'hiperparatiroidisme terciari quan un HPS molt avançat acaba donant lloc a un estat d'hipercalcèmia.

De vegades, l'HPP també es pot manifestar amb hipercalcèmia i nivells de PTH inadequadament normals. En aquests casos, sobretot, caldria descartar una hipercalcèmia tumoral, tot i que és molt poc freqüent que aquesta s'associï a una secreció ectòpica de PTH. La majoria de causes d'hipercalcèmia tumoral cursen amb nivells de PTH baixos, com ara aquells estats mediats per PTHrp (pèptid o proteïna relacionada amb la PTH) o per calcitriol (1,25(OH)₂D), així com algunes malalties granulomatoses com la sarcoïdosi i la tuberculosi.

Un cop fet el diagnòstic bioquímic d'HPP, es recomana completar l'estudi amb: estudi de la funció renal mitjançant l'estimació del filtrat glomerular (FG) o el càlcul de l'aclariment de creatinina, nivells de 25-hidroxi vitamina D i determinació del calci en orina de 24h. Parlem d'hipercalciúria quan en 24h el calci en orina és major de 250 mg/dia en dones i > 300 mg/dia en homes. També s'ha considerat un llindar de > 400 mg/dia per definir hipercalciúria en pacients asimptomàtics. Algunes situacions poden afavorir un estat d'hipocalciúria tot i presentar HPP, com el tractament amb liti o diürètics tiazídics, el dèficit de vitamina D o la malaltia renal crònica. En canvi, en pacients que

segueixen una dieta alta en sodi podem trobar un augment de l'excreció urinària de calci. En l'HPP no és estrictament necessari mesurar el fosfat en sang, però habitualment el trobarem normal o baix. En canvi, sempre és recomanable avaluar amb proves d'imatge la presència de càlculs renals. Preferentment, se sol usar l'ecografia, però també es poden utilitzar altres mètodes com la tomografia computada (TC) o la radiografia d'abdomen. Així mateix, s'aconsella avaluar el risc de fractura de tot pacient amb HPP a través de la densitometria òssia (DMO) mesurada a través d'absorciometria de raigs X d'energia doble o DXA (10,15).

1.1.3 Manifestacions clíniques

L'excés de PTH pot donar lloc a hipercalcèmia, hipofosfatèmia, osteoporosi, nefrolitiasi i deteriorament del FG, entre altres complicacions. Tanmateix, actualment la forma més freqüent de presentació de l'HPP, sobretot en països desenvolupats, és incidental i asimptomàtica, sovint en forma d'hipercalcèmia lleu (8,16). La clínica de l'HPP pot ser deguda a la pròpia hipercalcèmia (poliúria, polidípsia, vòmits, restrenyiment, deshidratació, arrítmies, etc.), quan aquesta és superior a 12 mg/dL o ha augmentat de forma aguda, o a l'afectació d'òrgans diana. Els símptomes i afectacions d'òrgans diana depenen sobretot de la cronicitat i gravetat de la malaltia i s'expliquen de forma detallada a continuació (3,8,10,17):

1) Afectació òssia: és la manifestació més freqüent de l'HPP, en forma d'osteoporosi, fractures, deformitats esquelètiques i dolor ossi. En la malaltia avançada es poden trobar lesions d'osteïtis fibrosa quística, com ara tumors marrons, lesions lítiques i quists ossis. La prevalença d'osteoporosi a l'HPP pot arribar al 50-65%, especialment en dones postmenopàusiques i en pacients d'edat avançada.

2) Afectació renal: l'HPP pot provocar hipercalciúria, nefrocalcinosi, nefrolitiasi i deteriorament de la funció renal. L'afectació més freqüent són les nefrolitiasis, per càlculs d'oxalat o fosfat càlcic, amb una prevalença de l'11-35%.

3) Afectació cardiovascular i mortalitat: alguns estudis descriuen un augment del risc d'hipertensió arterial i d'insulinoresistència en pacients amb HPP respecte a controls sans (18). També s'ha observat un augment en l'índex de la velocitat d'ona de pols aòrtic, una major prevalença d'aterosclerosi, un augment de la massa ventricular esquerra, un interval QT més curt i un augment del risc de mortalitat. Tanmateix, la causalitat entre HPP i malaltia cardiovascular de moment és incerta, atesa la manca de reversibilitat d'aquesta després de dur-se a terme una paratiroidectomia (16,19-23).

4) Afectació neuromuscular: s'han reportat símptomes com fatiga, debilitat muscular, rampes, parestèsies i atròfia muscular, sobretot a extremitats inferiors.

5) Manifestacions neuropsiquiàtriques, neurocognitives i de qualitat de vida: s'han descrit símptomes com ansietat, disminució de la concentració, deteriorament cognitiu, disminució de la qualitat de vida, depressió, psicosi, deliri, al·lucinacions, alteracions de la personalitat, alteracions del son i demència, en diferents graus i freqüències en l'HPP. De totes maneres, solen ser inespecífics i fins ara no s'ha pogut demostrar fermament la seva associació amb l'HPP en assajos clínics (24).

6) Altres: en pacients amb HPP s'han descrit afectacions gastrointestinals com dolor abdominal, anorèxia, nàusees, vòmits, restrenyiment, colelitiasi, pancreatitis, colelitiasis i malaltia ulcerosa pèptica. Tot i això, els estudis realitzats fins ara mostren resultats controvertits, sobretot quant a la pancreatitis i la colelitiasi. L'associació de l'HPP amb la malaltia ulcerosa pèptica tampoc és ferma, excepte per als casos d'HPP associada a neoplàsia endocrina múltiple tipus 1 (MEN1) i síndrome de

Zollinger-Ellison. També s'han descrit alteracions bioquímiques com acidosi hiperclorèmica i hiperuricèmia, així com troballes reumatològiques (pseudogota, sinovitis i sacroileïtis), tot i que la seva relació amb l'HPP és incerta (25,26).

1.1.4 Tractament

El tractament de l'HPP sol ser **quirúrgic**. L'extirpació de la glàndula o les glàndules paratiroidals afectades permet normalitzar els paràmetres bioquímics associats a l'HPP i a mitjà-llarg termini augmenta la densitometria òssia, disminueix el risc de fractures i de càlculs renals (27). Els criteris per a considerar la cirurgia es basen en l'evidència d'afectació d'òrgans diana, en l'edat i en la clínica de cada pacient (vegeu la Taula 1). Abans de la cirurgia cal realitzar estudis de localització, ja que permeten ajudar a minimitzar l'extensió de la dissecció quirúrgica, limitar el temps d'intervenció i disminuir el risc de persistència o recurrència postquirúrgica. Les tècniques més usades són l'ecografia cervical i la gammagrafia amb Tc99-sestamibi, normalment usades en combinació. El TC cervical presenta una major sensibilitat i especificitat, però suposa una major exposició a radiació ionitzant i també l'ús de contrast endovenós, per la qual cosa no sol ser la primera opció. Altres tècniques de localització són la ressonància magnètica (RM) i la tomografia d'emissió de positrons amb 18-F fluorocolina (28).

Taula 1: Indicacions per al tractament quirúrgic de l'HPP. CCr: aclariment de creatinina (10).

HPP simptomàtic	La clínica és indicació de cirurgia, excepte si existeix alguna contraindicació
HPP asimptomàtic	Calci sèric > 1 mg/dL (0,25 mmol/L) per sobre del límit superior de la normalitat
	Afectació òssia: - Fractura vertebral detectada per tècnica de morfometria vertebral, radiografia de columna o RM, o - DMO amb T-score < -2,5 en qualsevol localització (lumbar, femoral o terç distal de radi)
	Afectació renal: - FG estimat o CCr < 60 ml/min, o - Nefrocalcinosi/nefrolitiasi detectada amb radiografia simple, ecografia o TC, o - Hiper calciúria (> 250 mg/dia en dones; > 300 mg/dia en homes)
	Edat < 50 anys (tot i que no compleixi altres criteris, aquest ja n'és suficient)
	En absència dels criteris previs, sempre que hi hagi un acord entre pacient i cirurgia i no hi hagi contraindicacions

Hi ha dues **tècniques principals en la cirurgia de paratiroides**: la paratiroidectomia selectiva i l'exploració cervical bilateral. Davant d'un HPP causat per un únic adenoma paratiroidal, la tècnica d'elecció és la paratiroidectomia única o selectiva de la glàndula afectada. Consisteix en l'excisió d'un únic adenoma sense l'objectiu d'identificar l'altra glàndula ipsilateral normal durant l'acte quirúrgic. Aquesta tècnica permet un menor temps de quiròfan, menys lesions estructurals i menys costos hospitalaris i sol tenir èxit en el 95-97% dels casos (29).

En casos de sospita o confirmació de malaltia multiglandular (MMG), tant en l'HPP esporàdic com en l'hereditari o familiar, així com en la malaltia paratiroidal per liti o si els estudis de localització són negatius, es recomana una exploració cervical bilateral. Aquesta consisteix a explorar les quatre

glàndules i ressecat aquelles que tinguin un augment de mida o criteris de sospita (28). D'aquesta manera, es pot realitzar una paratiroidectomia subtotal o una paratiroidectomia total amb autotrasplantament. En la primera, es ressequen tres glàndules paratiroidals i sovint part de la quarta, deixant teixit paratiroidal normal romanent marcat amb sutura no absorbible o clip radioopac per si calgués identificar-lo en una futura cirurgia. També es recomana realitzar una timectomia per ressecat possibles glàndules supernumeràries ectòpiques. En la paratiroidectomia total amb autotrasplantament s'extreuen totes les glàndules paratiroidals i habitualment s'instaura teixit paratiroidal normal a la musculatura braquioradial. Aquesta tècnica, però, no se sol realitzar, ja que té un risc molt elevat d'hipoparatiroidisme permanent.

Per últim, en casos de sospita elevada de carcinoma paratiroidal, se sol realitzar una paratiroidectomia en bloc, ressecant el lòbul tiroïdal ipsilateral i, si cal, també el nervi laringi recurrent, per obtenir marges quirúrgics negatius. També cal ressecat els ganglis limfàtics sospitosos del compartiment central. A tota cirurgia paratiroidal es recomana la determinació de la PTH intraoperatòria (PTHio). El criteri de curació més acceptat arreu és el de Miami, definit per un descens > 50% de la PTHio deu minuts després de l'exèresi de l'adenoma (28,30).

Tot i que la cirurgia és el tractament d'elecció de l'HPP, existeixen situacions en què és preferible optar per un **tractament farmacològic o mèdic**: contraindicació clara per a la cirurgia, edat molt avançada o moltes comorbiditats, HPP persistent després d'haver-se realitzat una cirurgia per un cirurgia experimentat o per la mateixa decisió del pacient. Els fàrmacs que han demostrat evidència de millora de l'HPP, sigui pels seus efectes sobre la calcèmia o sobre la DMO, són: bifosfonats (alendronat), denosumab, vitamina D, estrògens, anàlegs estrogènics i cinacalcet. Els cinc primers incrementen la densitat mineral òssia i el cinacalcet és un calcimimètic que actua a través del receptor-sensor sensible al calci (CaSR), reduint els nivells de calci i de PTH sèrics (10).

1.1.5 Anatomia patològica i mecanismes moleculars

A l'hiperparatiroidisme trobem una secreció autònoma de PTH, expressada amb un augment de pes i/o de mida d'una o més glàndules paratiroidals (31). En principi, qualsevol glàndula paratiroidal amb un pes major a 60 mg o mida superior a 8 mm s'hauria de considerar patològica. La secreció autònoma de PTH es divideix en tres subtipus clinicopatològics: en primer lloc, l'HPP per proliferació clonal o neoplàsica; en segon lloc, l'HPS degut a una malaltia o estimulació crònica que interfereix en la secreció de la PTH; i, finalment, l'hiperparatiroidisme terciari per expansió clonal d'un HPS refractari. L'hiperparatiroidisme secundari i el terciari gairebé sempre es manifesten com a malaltia paratiroidal multiglandular (MMG), mentre que l'HPP sol manifestar-se com a malaltia uniglandular. La base anatomopatològica més freqüent de l'HPP és un únic adenoma paratiroidal (80%) i, en segon lloc, MMG (15-20%). El carcinoma paratiroidal es troba en menys de l'1% dels casos d'HPP (3,32). A continuació, s'expliquen els diferents patrons histològics paratiroidals que existeixen.

L'**adenoma paratiroidal** és una neoplàsia ben delimitada i típicament encapsulada composta per cèl·lules principals, transicionals, oncocítiques i cèl·lules clares. Sovint s'observa un marge de teixit paratiroidal normal al pol vascular i no sol presentar teixit adipós estromal. Els adenomes poden créixer de forma difusa o nodular i contenir estructures fol·liculars. Sol haver-hi correlació entre la mida de l'adenoma i els nivells de calci i PTH sèrics. La majoria presenten hipercel·lularitat i estan compostos per cèl·lules principals. S'anomenen adenomes oncocítics quan > 75% de les cèl·lules són oncocítiques; de cèl·lules clares quan estan compostos per aquest tipus cel·lular; i lipoadenomes en cas de presentar teixit adipós en més del 50% del volum glandular. Es parla d'adenoma quíctic

quan >50% del volum tumoral presenta canvis quítics. En l'àmbit immunohistoquímic, els adenomes solen presentar: positivitat difusa per PTH, GATA-3, cromogranina A, p27, E-cadherina, APC (*Adenomatous polyposis coli*) i parafibromina nuclear i marcadors tiroïdals fol·liculars negatius (factor de transcripció tiroïdal 1, tiroglobulina, PAX8 monoclonal) (32,33).

Fins fa poc es creia que la majoria de tumors paratiroidals tenien un origen monoclonal, però l'evidència actual suggereix que venen causats per proliferacions neoplàsiques multiclonals. S'han descobert diferents mecanismes moleculars implicats en la formació d'adenomes paratiroidals, que impliquen mutacions somàtiques (no germinals) en diferents gens. El mecanisme genètic més freqüentment involucrat en la formació d'adenomes paratiroidals esporàdics són les mutacions somàtiques en *MEN1*, tot i que la majoria tenen un origen molecular desconegut (4,34,35). Altres gens que també s'han vist implicats en la formació d'adenomes esporàdics són: *CCND1*, *CDK1s*, *CASR*, *CTNNB1*, *EZH1/EZH2*, *ZFX*, *GMC2*, *AIP*, *CDC73*, *RET*, *PIK3CA*, etc. (36–40).

Aproximadament un 15% dels casos d'HPP són deguts a **malaltia multiglandular**, sigui per adenomes múltiples o sigui per hiperplàsia paratiroidal. En la darrera guia de l'Organització Mundial de la Salut (OMS) de 2022, s'ha canviat el terme “hiperplàsia paratiroidal” en l'hiperparatiroidisme primari per “malaltia paratiroidal multiglandular” o “adenomes paratiroidals multiglandulars múltiples”, ja que s'ha vist que en l'HPP la MMG és deguda principalment a proliferacions neoplàsiques clonals múltiples sincròniques o metacròniques (32). Sol afectar més freqüentment les glàndules paratiroidals superiors. La MMG es considera un factor de risc d'hiperparatiroidisme familiar o hereditari (HPPF), per la qual cosa es recomana valorar fer un estudi genètic dels individus que la presenten, per tal de descartar variants germinals en gens seleccionats. També s'han vist casos de MMG en l'HPP induït per liti (28,32,41).

L'HPP també pot venir causat per adenomes paratiroidals atípics, actualment denominats **tumors paratiroidals atípics (TPA)** segons la nova classificació de l'OMS (2022) (32). Es defineixen com a neoplàsies paratiroidals amb característiques citològiques i arquitectòniques preocupants o atípiques, però sense presentar invasió vascular, capsular, perineural o a estructures adjacents, o metàstasi a distància. Tenen un potencial maligne incert. No queda clar si podrien representar un estadi inicial o precoç de carcinoma paratiroidal. La majoria solen tenir un comportament benigne, però s'ha vist que presenten més risc de recurrència i de malignitat que els adenomes (42,43). S'estima una incidència del 0,5-4,4% de TPA dels casos d'HPP operats (44). A escala histològica poden tenir propietats similars a les del carcinoma paratiroidal, com ara nus cel·lulars dins d'un teixit connectiu engruixit, cèl·lules tumorals a la càpsula, adherència a estructures adjacents sense una invasió franca, fibrosi en banda, creixement trabecular, augment de l'activitat mitòtica (>5 per 10mm²), figures mitòtiques atípiques, necrosi coagulativa, pèrdua d'immunoreactivitat a parafibromina, un índex de proliferació cel·lular elevat (Ki-67 > 5%) i altres aberràncies immunohistoquímiques. Cal tenir en compte que les bandes fibroses també poden trobar-se en adenomes paratiroidals grans, en pacients amb antecedents de manipulació cervical prèvia (sigui per punció aspiració amb agulla fina, per una biòpsia o per un traumatisme) o en adenomes quítics per dipòsits d'hemosiderina.

En els TPA, la parafibromina és útil com a marcador pronòstic, ja que si la immunoreactivitat és negativa, presenten més risc de malaltia metacrònica i de recurrència (32,45). En canvi, en cas de tenir positivitat per parafibromina i ser negatius per PGP9.5 i galectina-3 tenen menys risc de recurrència (46). Quant al tractament dels TPA, es recomana una cirurgia més extensa si hi ha sospita de malignitat, assegurant uns marges de resecció adequats de cara a prevenir la recurrència local. De cara al seguiment clínic dels pacients, alguns autors recomanen fer-lo més estret que en el cas dels adenomes independentment de la immunohistoquímica (43,47).

El **carcinoma paratiroidal (CP)** es defineix com una neoplàsia paratiroidal que presenta alguna de les següents característiques: angioinvasió, invasió limfàtica, invasió perineural o intraneural, invasió local maligna a estructures anatòmiques adjacents o metàstasis a distància documentades histològicament o citològica. Els signes clínics i bioquímics que fan sospitar d'un CP són: una massa cervical palpable, una mida superior a 3 cm, una hipercalcèmia greu (> 12 mg/dL), uns nivells de PTH sèrica molt elevats (> 3 vegades per sobre del límit superior de la normalitat), una ràtio de PTHbio (3a generació) / PTHi (2a generació) > 1 o l'observació intraoperatòria d'adhesió a estructures adjacents. Fins ara no existeix un biomarcador específic que permeti fer el diagnòstic de CP de forma preoperatòria. La citologia no és útil per diferenciar l'adenoma del carcinoma i augmenta el risc de sembra tumoral, així que cal evitar-la. Com a diagnòstic diferencial, cal tenir en compte: TPA; paratiromatosis; proliferació paratiroidal benigna amb característiques histològiques poc clares degut a una punció o alcoholització prèvies; i l'hiperparatiroidisme secundari o terciari de llarga evolució, que pot donar lloc a glàndules amb marges irregulars i altres característiques atípiques (28,32,39).

El CP és una malaltia potencialment hereditària associada amb la síndrome d'hiperparatiroidisme lligat a tumor mandibular (HPT-JT) i a l'hiperparatiroidisme familiar aïllat (FIHP) a causa de variants patogèniques del gen *CDC73* (*cell division cycle 73*), que codifica per la parafibromina (48). Els carcinomes aparentment esporàdics sovint s'han vist relacionats amb mutacions/inactivacions bial·lèliques del gen *CDC73*. Dels pacients amb hiperparatiroidisme degut a la síndrome HPT-JT, el 15% presenten carcinoma paratiroidal. Així, davant la troballa d'un CP cal valorar realitzar estudi genètic, especialment si la immunohistoquímica per parafibromina és negativa (49,50). Es creu que la parafibromina podria actuar tant de supressor tumoral com d'oncogen, depenent del microambient tissular. De fet, a la darrera classificació de tumors paratiroidals de l'OMS, s'ha proposat usar un llindar de creixement invasiu menor per considerar el diagnòstic de CP en tumors amb dèficit de parafibromina. Tot i això, la presència de tinció per parafibromina no exclou del tot la possibilitat de presentar una variant patogènica en el gen *CDC73*, ja que existeixen mutacions puntuals que poden mantenir l'expressió de parafibromina preservada (32,51).

La morbmortalitat dels pacients amb CP sobretot s'explica per la hipercalcèmia i les seves complicacions. S'ha vist que els nivells de calcèmia dels individus amb CP o TPA solen ser més elevats respecte d'aquells amb adenomes paratiroidals (52). El risc de recurrència postcirurgia del CP és força elevat, sobretot locoregional, i per aquest motiu la tècnica quirúrgica recomanada és la resecció en bloc (53). Aproximadament el 6-30% dels pacients amb CP poden presentar metàstasis ganglionars al diagnòstic (39,54). La supervivència dels pacients operats i amb marges negatius és $> 90\%$ al cap de cinc anys i $> 67\%$ deu anys després, i sobretot ve condicionada per la presència de metàstasi a distància (55). Fins ara no s'ha demostrat l'eficàcia de la teràpia sistèmica adjuvant en el CP, però s'han descrit alguns casos de remissió amb immunoteràpia i amb sorafenib (39,45,56).

El diagnòstic de TPA i de CP es basa estrictament en criteris histopatològics, però existeixen tècniques d'immunohistoquímica que poden ajudar a orientar l'origen i el tipus de neoplàsia. En el CP (i sovint també en els TPA) els marcadors PGP9.5, galectina-3, p53 i hTERT solen ser positius, contràriament al que es veu en els adenomes. El Ki67 acostuma a ser $> 5\%$ i els marcadors APC, E-cadherina, parafibromina i p27 solen ser negatius (57,58). No hi ha cap marcador definitiu, però la combinació de diversos d'ells pot ser útil sobretot en els casos difícils de classificar (59). La nova classificació de l'OMS (2022) posa èmfasi sobretot a la utilitat del marcador Ki67 i a la tinció amb parafibromina (32).

Darrerament, s'ha fet èmfasi en el concepte de **neoplàsia paratiroidal amb dèficit de parafibromina (NPDP)**. Fa referència a qualsevol tumor paratiroidal (sigui adenoma, tumor atípic

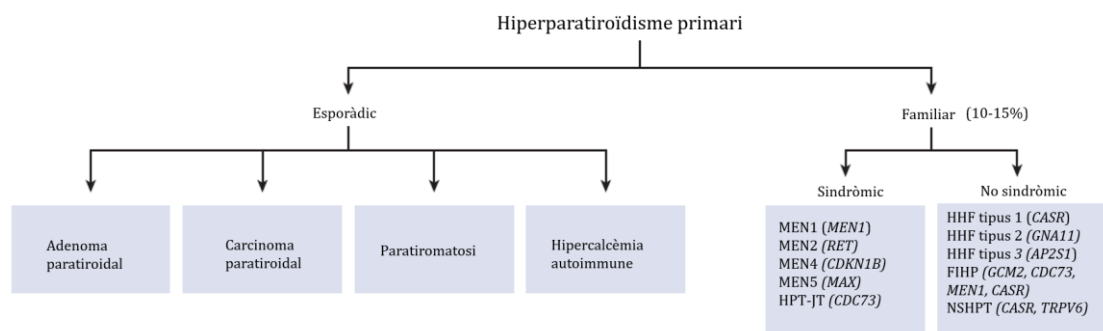
o carcinoma) que mostri una absència completa d'immunoreactivitat nuclear a parafibromina. Aquesta absència es considera una troballa anatomopatològica anormal que requereix tests moleculars addicionals per a confirmar la seva significança, ja que s'ha associat a major recurrència de malaltia paratiroidal i a majors trets atípics (51,60). Es correlaciona amb mutacions en el gen *CDC73*, siguin somàtiques o germinals. Les variants somàtiques s'han relacionat més freqüentment a adenomes paratiroidals quístics (45,51,61). En general, es recomana analitzar el gen *CDC73* en casos de: carcinoma paratiroidal (NPDP o no), TPA (si NPDP) i en adenomes paratiroidals que siguin NPDP i presentin altres característiques de risc com ara en pacients joves o amb tumors múltiples (32).

Per últim, la **paratiromatosi** és una causa molt poc freqüent d'HPP recurrent, deguda a l'existència de teixit paratiroidal hiperfuncionant dispers fora de les glàndules paratiroidals, usualment a les zones cervical i mediastínica. Pot ser primària, com a conseqüència d'una proliferació de restes paratiroidals durant el descens de les glàndules en el desenvolupament embriològic, o secundària. Aquesta darrera resulta de la sembra de teixit paratiroidal lesional durant una biòpsia o cirurgia, per ruptura de la càpsula (39,62,63).

1.2 L'Hiperparatiroidisme primari familiar

Majoritàriament, l'HPP és una malaltia esporàdica sense afectació familiar i amb afectació uniglandular per adenomes. Tanmateix, s'estima que el 10-15% dels casos d'HPP són de causa familiar, deguts a mutacions germinals en determinats gens (9,39,64). Els darrers 25 anys s'han descobert diferents causes d'hiperparatiroidisme familiar (HPPF) i cada vegada està augmentant més l'interès en l'estudi molecular i genètic d'aquesta patologia. L'HPPF es pot classificar com a sindròmic, quan s'associa a altres tumors no paratiroidals (com ara les neoplàsies endocrines múltiples tipus 1, 2A, 4 i 5 [MEN1, MEN2A, MEN4 i MEN5] i la síndrome HPT-JT) o com a no sindròmic quan no associen altres tumors. Dins l'HPPF no sindròmic s'hi inclou: l'hiperparatiroidisme familiar aïllat (FIHP), l'hiperparatiroidisme primari neonatal greu (NSHPT) i la hipercalcèmia hipocalciúrica familiar (HHF) (vegeu la Figura 1) (4,65).

Figura 1: espectre d'anomalies que poden donar lloc a HPP. S'exposen les causes hereditàries a la dreta de l'esquema, amb el gen causant de la malaltia entre parèntesis (Modificat de Jha2023) (39).



El diagnòstic de l'hiperparatiroidisme hereditari sol ser complicat de fer, per desconeixença d'antecedents familiars del pacient (si són asimptomàtics o si no s'ha investigat prou), per mutacions germinals *de novo* o per penetrància incompleta d'algunes formes sindròmiques. Habitualment, cal sospitar HPPF en aquells individus amb HPP si: són joves, presenten una anatomia patològica de risc (malaltia multiglandular, carcinoma paratiroidal o tumor paratiroidal atípic) o si hi ha indicis d'una història familiar suggestiva (4). A l'HPPF l'afectació multiglandular és més freqüent que a

l'espòradic, sigui de forma sincrònica o sigui asincrònica, per això un HPP persistent o recurrent després d'haver-se tractat quirúrgicament també ha de fer pensar en un possible origen hereditari (66). A continuació, s'expliquen les diferents causes d'HPPF.

1.2.1 Formes sindròmiques

Parlem d'HPPF sindròmic quan la causa és una variant germinal d'un gen que, a part de manifestar-se fenotípicament amb HPP, s'associa a altres tumors no paratiroidals. S'hi inclouen les síndromes MEN1, MEN2A, MEN4, MEN5 i HPT-JT (vegeu la Taula 2).

Taula 2: classificació i característiques dels diferents tipus d'hiperparatiroidisme familiar o hereditari. Nom: nomenclatura; Hr: patró d'herència; AD: herència autosòmica dominant; AR: herència autosòmica recessiva; TGEP: tumors gastro-entero-pancreàtics; CMT: carcinoma medul·lar de tiroides; X: grup heterogeni.

	Nom	Gens associats	Hr	Proteïna afectada	HPP	Altres tumors o característiques associades
HPPF sindròmic	MEN1	<i>MEN1</i>	AD	Menina	MMG. Afectació asimètrica i greu. Sovint diagnòstic a la 2a-3a dècada.	- TGEP - Adenomes hipofisiaris - Altres: lipomes, tumors suprarenals, carcinoides tímics o bronquials, etc.
	MEN2A	<i>RET</i>	AD	Receptor tirosin-kinasa	MMG o adenomes. Més lleu i menys recidives que en MEN1.	- CMT - Feocromocitoma
	MEN4	<i>CDKN1B</i>	AD	p27	MMG o adenomes. Més lleu que en MEN1. Risc de recurrència postcirurgia. Sovint paratiroides intratímiques.	- TGEP - Adenomes hipofisiaris - Altres: tumors de mama, urinaris/genitals, renals, suprarenals, de còlon, lipomes, etc.
	MEN5	<i>MAX (MYC-associated factor X)</i>	AD	MAX	Adenomes paratiroidals.	- Feocromocitomes i paragangliomes - Adenomes hipofisiaris funcionants - Altres: ganglioneuromes, neuroblastomes, condrosarcomes, etc.
	Síndromes MEN1-like	<i>CDKN2B</i>	AD	p15	MMG.	- Similar a MEN1 - Altres: schwannomes, meningiomes, tumors de pròstata, mama, hemangiomes hepàtics, etc.
		<i>CDKN2C</i>		p18		
		<i>CDKN1A</i>		p21		
	HPT-JT	<i>CDC73 (HRPT2)</i>	AD	Parafibromina	MMG asincrònica. Més freqüents adenomes i TPA. Risc CP (15%). Adenomes quístics. Més agressiu.	- Fibromes ossificants benignes de mandíbula o maxil·lar. - Quists/tumors renals - Tumors uterins
HPPF no sindròmic	HHF1	<i>CASR</i>	AD	CaSR	Hipercalcèmia crònica, [PTH]	- CCCR baixa - Augment del Mg sèric
	HHF2	<i>GNA11</i>		Gα11		

	HHF3	<i>AP2S1</i>		<i>Adaptor-protein 2 σ-subunit</i>	normal o lleu↑ i poden asintomàtics. Glàndules normals o MMG. HPP persistent postcirurgia.	- No augment de la nefrocalcinosi o litiasis renals - Sovint DMO normal
	HPP neonatal	<i>CASR</i> <i>TRPV6</i>	AR/ AD	CaSR	Hiperparatiroidisme primari neonatal greu. MMG.	Fractures, hipotonia, distrés respiratori, alteracions del neurodesenvolupament, CCCR baixa.
				TRPV6	Hiperparatiroidisme neonatal transitori.	?
	FIHP	<i>GCM2</i> <i>CDC73</i> <i>MEN1</i> <i>CASR</i>	X		Diferents patrons. S'han reportat casos de CP.	No altres endocrinopaties (per definició).

Síndrome de MEN1

La síndrome MEN1, antigament anomenada síndrome de Wermer, es caracteritza per una combinació de tumors paratiroidals, d'adenohipòfisi i de les cèl·lules dels illots pancreàtics, entre d'altres. Té una prevalença estimada de 3-20/100.000 persones i de l'1-18% dins dels pacients amb HPP. Es considera una malaltia d'herència autosòmica dominant (AD). Per definició, per poder fer-ne el diagnòstic, l'individu ha de presentar dos dels tres tumors citats anteriorment (67–69). El **gen responsable** de la síndrome s'anomena *MEN1* i es troba al cromosoma 11q13. Consta de deu exons que codifiquen una proteïna de 610 aminoàcids coneguda com a menina, que regula la transcripció, estabilitat genòmica, divisió i proliferació cel·lulars. Aquest gen es comporta com un gen supressor tumoral i segueix el model de Knudson dels dos successos (teoria del doble impacte o *second hit*), que defensa que perquè es produeixi el desenvolupament tumoral, cal una inactivació de les dues còpies del gen. Així, perquè es formi un tumor cal que en una determinada cèl·lula tingui lloc una mutació somàtica (adquirida) de la còpia sana del gen, és a dir, que hi hagi una pèrdua d'heterozigosi o LOH (70–75).

S'han descrit més de 1.100 mutacions germinals del gen *MEN1* en els pacients amb síndrome de MEN1 i > 80% són inactivadores. Aquestes provoquen que la menina sigui disfuncional, fet que reforça la idea que es tracta d'un gen supressor tumoral. Dins de les mutacions germinals, aproximadament el 23% són sense sentit (*nonsense*), el 41% són delecions o insercions que produeixen canvi en la pauta de lectura o de desfasament, el 6% són delecions o insercions sense canvi en la pauta de lectura (*inframe*), el 9% es produeixen en regions de tall i empalmament (*splice site*), el 20% provoquen un error de sentit (*missense*) i l'1% són delecions senceres o parcials del gen. S'estima que més del 10% de les mutacions causants de MEN1 són *de novo* (70,76,77). En aquesta síndrome no existeix una correlació aparent genotip-fenotip i, a més, s'ha vist una gran variabilitat fenotípica entre famílies i dins la mateixa família (78,79). Es calcula que entre el 5 i el 30% dels pacients amb un fenotip *MEN1-like* poden no tenir mutacions germinals en les regions codificants de menina. Aquests casos podrien ser deguts a mutacions en la regió promotora o no traduïda del gen *MEN1*, a grans delecions sovint no detectades per mètodes convencionals, a variacions epigenètiques o a variants en altres gens possiblement associats a patrons similars a MEN1, com ara els gens inhibidors de quinasa dependents de ciclina o *CDKIs* (70,80–83).

El 95% dels pacients amb MEN1 presentaran HPP a causa d'un o més tumors de paratiroides, típicament als 25-45 anys. La hipercalcèmia sol ser la primera manifestació de la síndrome fins en el

90% dels pacients (69,78). La lesió **paratiroidal** més freqüent és la malaltia multiglandular (MMG), amb afectació difusa de totes les glàndules per hiperplàsia cel·lular i/o per adenomes. L'afectació acostuma a ser asimètrica i asincrònica, ja que les mutacions somàtiques no tenen lloc al mateix moment en totes les glàndules paratiroidals (84). També s'hi han descrit canvis quítics en alguns casos (85). És poc habitual, però s'han reportat alguns casos de CP o de TPA en MEN1 (86,87).

Les principals diferències de l'HPP en la síndrome MEN1 respecte a l'HPP esporàdic són: l'edat d'aparició (segona-tercera dècada en MEN1 en contraposició a 50-60 anys en l'esporàdic); una afectació per sexes similar en MEN1 a diferència de predomini femení en l'esporàdic; la MMG com a patró anatomopatològica més freqüent en MEN1; una major freqüència de glàndules paratiroides supernumeràries i ectòpiques a MEN1; una menor concentració de PTH sèrica per als mateixos nivells de calci en MEN1; una menor correlació entre [PTH] i la massa òssia respecte dels HPP esporàdics; una major afectació òssia i renal en els pacients amb MEN1; i, per últim, més recidives postquirúrgiques en MEN1 (88–90). Ateses aquestes característiques, en els pacients amb MEN1 es recomana iniciar el cribratge d'HPP a partir dels vuit anys d'edat (69). La localització preoperatòria de les glàndules paratiroidals té un valor limitat i en general es recomana l'exploració bilateral independentment dels estudis d'imatge. La tècnica d'elecció és la paratiroidectomia subtotal amb timectomia (tot i que aquesta darrera és controvertida), però cal valorar sempre el risc-benefici de recurrència o persistència de l'HPP contra el risc d'hipoparatiroidisme permanent (28,39,63,89).

La incidència de **tumors d'adenohipòfisi** en MEN1 és del 30%. El més freqüent és el prolactinoma, seguit dels adenomes no funcionants, els adenomes somatotrops i rarament corticotrops o tirotrops. L'edat d'aparició mitjana és a la 3a-4a dècada de vida (39,67). Els tumors hipofisaris en MEN1 respecte dels esporàdics són més grans, més invasius i amb pitjor resposta al tractament. Tot i això, l'aparició de carcinoma hipofisari és infreqüent. No tenen una histologia específica i el tractament no difereix del proposat per a tumors hipofisaris esporàdics. Atès que s'han reportat casos d'aquests tumors en pacients pediàtrics, es recomana iniciar-ne el cribratge a la infància (39,67,69).

Els **tumors gastro-entero-pancreàtics** o de les cèl·lules dels illots pancreàtics (TGEP) tenen una incidència aproximada del 40% en la síndrome de MEN1. Solen aparèixer en edats més joves que els esporàdics i sovint són múltiples. Els més habituals són els no funcionants (67,91–93). El tumor funcionant més freqüentment associat a MEN1 és el gastrinoma i representa la causa principal de morbmortalitat en aquests pacients. La localització més freqüent és la submucosa duodenal, seguit dels TGEP pancreàtics, que solen tenir un curs clínic més agressiu. Quan els gastrinomes provoquen múltiples úlceres gastro-duodenals per hipersecreció gàstrica àcida poden donar lloc a la síndrome de Zollinger-Ellison. Els insulinomes representen el 10-30% de tots els TGEP en MEN1 i en comparació amb els esporàdics solen presentar-se en edats més precoces i tenir més recurrències. Altres tumors més rars que es poden trobar en MEN1 són el glucagonoma, el VIPoma i el somatostatina. Els TGEP malignes són la causa més freqüent de mortalitat en MEN1, probablement degut a un retràs en el diagnòstic per manca de clínica en molts casos. Es recomana iniciar-ne el cribratge a partir dels setze anys (39,69,94–96).

Els pacients amb MEN1 també tenen més risc de desenvolupar **tumors carcinoides i suprarenals corticals**. Els tumors carcinoides es troben en el 3% dels pacients amb MEN1 i poden ser tímics, broncopulmonars o gàstrics. Solen tenir un comportament benigne i la majoria són asimptomàtics, però poden donar clínica per secreció de serotonina com diarrea, flushing, broncoconstricció o malaltia valvular dreta. Els tímics són els més prevalents i poden tenir un curs més agressiu, i per això alguns autors proposen la timectomia profilàctica. Els tumors suprarenals que s'han descrit en pacients amb MEN1 (amb una prevalença del 20-73%) són: adenomes corticals, hiperplàsia suprarenal, adenomes múltiples, hiperplàsia nodular, quists o carcinomes. La majoria són no

funcionants, però també s'han reportat tumors secretors d'aldosterona i de cortisol. En canvi, els feocromocitomes rarament s'associen a aquesta síndrome (39,69,97,98).

Altres tumors associats a la síndrome MEN1 són angiofibromes, col·lagenomes o lipomes i, de forma menys freqüent, endimomes, schwannomes, meningiomes i tumors tiroïdals. També s'han reportat casos amb leiomiomes d'esòfag i del tracte genitourinari i tumors de còlon, de mama i ossis, tot i que no existeix un clar augment de la predisposició del càncer de còlon en comparació a la població general (69,99).

Segons les darreres guies i revisions de MEN1, les **recomanacions per a realitzar un cribratge** genètic per a mutacions germinals del gen *MEN1* són: en primer lloc, presentar dos o més tumors endocrins associats a MEN1; en segon lloc, ser familiar de primer grau d'un pacient amb MEN1, amb clínica o sense; i, per últim, presentar una MMG, un gastrinoma o tumors dels illots pancreàtics múltiples a qualsevol edat (69,100).

Síndrome de MEN2

La síndrome MEN2 es caracteritza per una combinació de carcinoma medul·lar de tiroides (CMT), feocromocitoma i tumors paratiroidals i ve provocada per mutacions germinals en el protooncogen *RET*. Es tracta d'una malaltia AD amb una prevalença estimada d'1:30.000. Existeixen quatre variants de MEN2 (anteriorment anomenada MEN2A), produïdes per diferents mutacions (39,69,78,101):

- 1) MEN2 clàssic: és la variant més freqüent, associada a CMT en el 90% dels casos, a tumors paratiroidals en el 20-30% i a feocromocitomes en el 10-50%, que poden ser bilaterals.
- 2) MEN2 amb líquen cutani amiloïdòtic: poden presentar aquesta lesió cutània, sobretot a la regió escapular.
- 3) MEN2 amb malaltia d'Hirschprung: variant causada per mutacions amb pèrdua de funcionalitat de l'exó 10, a diferència de la resta de variants, en què les mutacions provoquen un guany de funcionalitat. Aquesta dualitat s'explica perquè l'activació constitutiva del *RET* és suficient per a la transformació neoplàsica de les cèl·lules C i les cèl·lules de la medul·la suprarenal, però insuficient per a generar una resposta tròfica en el precursor de neurones (provocada per una manca d'expressió de la proteïna RET a la superfície cel·lular). Es manifesta per l'absència de cèl·lules ganglionars intrínseques al tracte gastrointestinal distal, que provoca obstrucció intestinal i megacòlon.
- 4) CMT familiar aïllat: presenten CMT sense altres afectacions fenotípiques.

El **gen causant** dels diferents tipus de MEN2 és el ***RET***, localitzat al cromosoma 10q11.2. Codifica per un receptor tirosina-quinasa que té dominis extracel·lulars i intracel·lulars i està involucrat en senyals de transducció necessaris per al creixement i la diferenciació cel·lulars (69). S'expressa a les cèl·lules que deriven de la cresta neural, dels arcs branquials i al sistema urogenital (102). L'activació del gen *RET* dona com a resultat la posada en marxa de moltes vies com ara la RAS/MAPK i la PIK3/AKT. El MEN2 clàssic majoritàriament ve causat per mutacions amb error de sentit que afecten el domini extracel·lular. El 85% són mutacions del codó 634 (exó 11), essent la més freqüent la p.Cys634Arg, i s'associen a una penetrància moderada-alta d'HPP. Altres mutacions de *RET* dels codons 609, 611, 618 i 620 (exó 10) s'associen a una penetrància del 2-12% d'HPP (39,103).

El CMT sol ser la manifestació més precoç i prevalent de MEN2, amb una penetrància gairebé completa, per la qual cosa és una causa d'HPPF sindròmic relativament fàcil de diagnosticar. L'HPP

té una prevalença del 20-30% en el MEN2 clàssic i l'anatomia patològica sol ser d'adenoma paratiroidal, de MMG amb hiperplàsia o una combinació d'ambdós. Comunament, es tracta d'un HPP lleu, asimptomàtic i en edats joves (67). Així com la tiroïdectomia en MEN2 és altament recomanada i de forma profilàctica, la paratiroidectomia profilàctica no es recomana d'entrada, atesa la baixa prevalença de l'HPP (28). En general, només es recomana la cirurgia paratiroidal si el pacient presenta símptomes d'hiperparatiroidisme. Tot i això, algunes guies recomanen examinar les glàndules paratiroidals durant la cirurgia tiroïdal i valorar extreure'n aquelles engrandides macroscòpicament (102).

D'altra banda, existeix la **síndrome MEN3** (anteriorment anomenada MEN2B), que representa el 5-6% de tots els casos de MEN2 i s'associa a la presència de CMT i feocromocitoma, així com a hàbit marfanoide, anomalies oculars, neuromes mucosos i disfunció intestinal autònoma ganglionar (que pot produir diverticulosi i megacòlon). En canvi, no s'associa a tumors paratiroidals. La majoria de mutacions del gen *RET* en els casos de MEN3 són del codó 918 (4,39).

Síndrome de MEN4

Aproximadament el 10-15% dels pacients amb fenotip de MEN1 no presenten mutacions germinals en el gen *MEN1* (69). Com s'ha comentat, això podria ser degut als diferents mètodes de cerca de mutacions, com ara en casos de grans delecions o d'alteracions genètiques a regions no codificants, que poden no ser detectades amb els mètodes convencionals, però s'ha vist que és poc habitual (70,82,104,105). En les darreres dècades s'ha descobert que mutacions en altres gens com ara els inhibidors de quinasa dependents de ciclina (*CDKIs*) podrien ser una explicació per aquests pacients amb patró *MEN1-like* i sense mutacions del gen *MEN1*.

La síndrome MEN4 es va descriure inicialment en rates (anomenada MENX) l'any 2000, explicada per mutacions patogèniques en el gen *cdkn1b*. Aquest gen, equivalent al *CDKN1B* en humans, codifica per la **proteïna p27** o P27KIP1, que té una funció reguladora de la progressió del cicle cel·lular (106–108). Les rates amb síndrome MENX, d'herència autosòmica recessiva (AR) en aquesta espècie, presentaven un fenotip combinació de MEN1 i MEN2 que incloïa tumors neuroendocrins hipofisaris, suprarenals i del tracte gastrointestinal. No presentaven tumors paratiroidals però sí hiperplàsia paratiroidal (109). Les mutacions en *cdkn1b* en rates provocaven una disminució de l'expressió de la proteïna p27. El 2006 es va reportar el primer cas de *MEN1-like* amb una mutació germinal demostrada en el gen *CDKN1B* en humans, en una família amb HPP, acromegàlia i angiomiolipomes renals (106). La immunohistoquímica dels teixits tumorals va demostrar una manca de tinció de la proteïna p27.

Finalment, l'any 2008, durant el Congrés Internacional de Neoplàsia Endocrina Múltiple, es va proposar denominar "síndrome MEN4" aquells pacients amb fenotip de MEN1, sense mutacions en *MEN1*, que presentessin variants patogèniques germinals en *CDKN1B* (Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM 610755) (110). Des de llavors s'han anat reportant casos similars, sempre amb un patró d'herència AD. S'estima una prevalença de l'1,5-3,7% dels casos de fenotip MEN1 sense mutacions a *MEN1* que es podrien classificar com a MEN4. Tanmateix, fins ara hi ha pocs casos descrits, així que la penetrància clínica i l'afectació fenotípica encara no està ben definida i es creu que podria ser una patologia infradiagnosticada (39,69,105,111–114). A part dels tres tumors típics de MEN1 (hipofisaris, paratiroidals i TGEP), també s'han descrit altres tumors en pacients amb la síndrome de MEN4: meningiomes, hemangiomes hepàtics, tumors cutanis, nòduls suprarenals, neoplàsia de còlon, tumors de mama i neoplàsies genitourinàries (114–118).

Les quinases dependents de ciclina (CDK) necessiten unir-se a la resta de ciclins per a fer la seva funció d'aturar o posposar la progressió del cicle cel·lular (119). Concretament, la ciclina D té un paper important en la regulació de la progressió del cicle cel·lular i la seva inactivació determina la progressió de fase G0 a S1, un pas crucial pel control del cicle cel·lular de les cèl·lules paratiroidals (78). Es coneixen dues **famílies de gens *CDKIs***, tots ells encarregats de codificar per a proteïnes implicades en el control del cicle cel·lular (118): en primer lloc, la família d'***INK4a/ARF***, formada pels gens *CDKN2A* (codifica per la proteïna p16), *CDKN2B* (p15), *CDKN2C* (p18) i *CDKN2D* (p19); i, en segon lloc, la família de ***Cip/Kip***, que conté els gens *CDKN1A* (p21), *CDKN1B* (p27) i *CDKN1C* (p57). En models de ratolins s'ha vist que modificacions genètiques de les proteïnes p27, p21 i p18 causen tumors endocrins típics de MEN1 i MEN2 (107).

El **gen *CDKN1B*** es localitza al cromosoma 12p13, conté dos exons i codifica per la proteïna p27, de 196 aminoàcids i membre de la família Cip/Kip. Té diferents dominis d'unió a proteïnes, es localitza tant a escala intranuclear com citoplasmàtica i conté senyals de localització nuclear. S'ha demostrat més d'un 90% d'homologia de l'ADN (àcid desoxiribonucleic) codificant del *CDKN1B* entre rates i humans (109). Es considera un gen supressor tumoral atípic o protooncogen, ja que el segon al·lel rarament està mutat en les neoplàsies humanes (120). És a dir, a diferència del que passa a MEN1, en la MEN4 no hi ha LOH, sinó que es pensa que la tumorigènesi pot tenir lloc amb haploinsuficiència del gen, sense ésser necessària una mutació somàtica del segon al·lel (39,115–117). Alguns autors suggereixen que el desenvolupament tumoral podria explicar-se per alteracions epigenètiques (70,121) i diferents estudis suggereixen que la quantitat de p27 té un rol important en la formació tumoral tant en humans com en ratolins (81,107,118). De fet, s'ha demostrat que l'expressió de p27 està disminuïda i que implica un pitjor pronòstic en certes neoplàsies (mama, hepàtiques, colorectals i renals) (122). L'estreta relació entre MEN1 i MEN4 segurament ve donada perquè la transcripció del *CDKN1B*, i per tant l'expressió de p27, venen regulades per la menina. A més, s'ha vist que la inactivació bial·lèlica de *MEN1* provoca una inhibició de la transcripció de *CDKN1B* i una disminució de l'expressió de p27 (122–126). Així, en resum, les mutacions inactivadores de *CDKN1B* disminueixen l'expressió de p27, fet que augmenta la susceptibilitat a neoplàsies.

Fins ara s'han descrit poc més de 100 casos de MEN4, que inclouen unes 52 variants de *CDKN1B* (83,106,113,115–118,125,127–141). No s'ha trobat una clara relació genotip-fenotip, atesa la gran variabilitat intrafamiliar tant en el tipus com en la gravetat de les manifestacions clíniques. Les principals diferències fenotípiques entre les síndromes de MEN4 i MEN1 són (39,81,114,115):

- 1) **HPP** (prevalença del 80-90% aproximadament): en general l'edat d'aparició és més tardana en MEN4 (56 anys en oposició a 25 anys), existeix un predomini en dones, menor penetrància, menys recurrència i sol ser més lleu. Així com en MEN1, en MEN4 també acostuma a ser la primera manifestació clínica. Alguns autors recomanen una cirurgia mínimament invasiva (paratiroidectomia única) atès que la majoria de pacients presenten un únic adenoma paratiroidal. Només s'ha descrit MMG en el 14% dels casos i malaltia recurrent en el 6%.
- 2) **Tumors hipofisiaris** (14-44%): en algunes sèries són més petits, menys freqüents i menys agressius en MEN4 que en MEN1. S'han descrit somatotropinomes, corticotropinomes, prolactinomes i adenomes no funcionants. La presència de prolactinomes és menys freqüent que en MEN1.
- 3) **TGEP** (19-25%): són menys freqüents en MEN4 que en MEN1. Els més freqüents són els no funcionants i els gastrinomes. Fins ara no s'han descrit insulinomes, VIPomes, glucagonomes, Cushing ectòpic ni TGEP malignes en MEN4. Per contra, sí que s'ha descrit algun cas de TGEP metastàtic.

- 4) Altres tumors: en pacients amb MEN4 s'han descrit meningiomes, lipomes, tumors renals, adrenocorticals, carcinoides bronquials, colònics, mamaris i neoplàsies genitourinàries.

Fins ara, no hi ha guies específiques sobre el maneig més adequat dels pacients amb síndrome de MEN4. La majoria d'autors recomanen seguir les recomanacions clíniques establertes per als pacients amb síndrome de MEN1, tot i que en alguns casos es podria ser menys estricte, atesa la menor gravetat fenotípica en MEN4 (81,104,114,115,142,143).

D'altra banda, cal destacar que també s'han reportat set mutacions germinals en **altres gens de la família de CDKIs** (*CDKN2C/p18*, *CDKN2B/p15* i *CDKN1A/p21*) en pacients amb patró fenotípic de *MEN1-like*. Es considera que mutacions en aquests altres gens *CDKIs*, diferents al *CDKN1B*, podrien explicar entre l'1 i el 2% dels individus amb patró *MEN1-like* i sense mutacions al gen *MEN1* (118,144). Hi ha estudis fets en ratolins en què es relacionen mutacions germinals de *CDKN2C* (que codifica per la proteïna p18) amb fenotips similars a MEN1 i on s'ha vist una disminució de l'expressió de p18 en teixits tumorals (145). A més, és conegut que la menina té un efecte sobre la transcripció genètica del *CDKN1B* i del *CDKN2C*, fet que pot explicar que mutacions en aquests gens puguin donar lloc a un fenotip *MEN1-like* (123,146). Tot i això, falten estudis que ajudin a corroborar la patogenicitat d'aquestes alteracions.

Síndrome de MEN5

De forma més recent s'ha descrit una nova síndrome de la família de les neoplàsies endocrines múltiples: la MEN5. Ve causada per variants germinals inactivadores del gen supressor tumoral *MAX* (*MYC-associated factor X*) i es considera de patró AD. El fenotip inclou endocrinopaties clàssiques de MEN (feocromocitomes-paragangliomes, tumors hipofisaris i malaltia paratiroidal) i tumors no endocrins, sobretot d'origen a la cresta neural. S'ha associat a feocromocitomes, sovint bilaterals, múltiples i a vegades malignes (39,65,147). De forma menys freqüent, s'han descrit paragangliomes, ganglioneuromes, ganglioneuroblastomes i neuroblastomes extraadrenals. També s'associa a adenomes paratiroidals i tumors hipofisaris funcionants (sobretot prolactinomes o somatotropinomes), que solen aparèixer més tard que els feocromocitomes. Per últim, s'han reportat casos de tumors no neuroendocrins associats a mutacions en aquest gen, com ara condrosarcomes i adenocarcinomes pulmonars (147–149).

De forma general, els tumors associats a mutacions en el gen *MAX* solen ser múltiples, bilaterals i/o multicèntrics. S'han descrit casos d'hiperplàsia suprarenal medul·lar, però de forma menys freqüent que en casos de MEN2. El gen *MAX* codifica per un factor de transcripció que regula la proliferació i diferenciació cel·lulars, l'angiògenesis i l'apoptosi. Es tracta d'un gen supressor tumoral clàssic, que requereix la pèrdua del segon al·lel per provocar la tumorogènesi. Fins ara hi ha pocs casos descrits i encara no es coneix bé el fenotip exacte que pot provocar (147). La immunohistoquímica de *MAX* i l'estudi genètic del gen *MAX* no se sol realitzar a la pràctica clínica (65). Alguns autors, però, recomanen el cribratge de mutacions en línia germinal del gen i, en cas de trobar variants patogèniques, fer una avaluació completa mitjançant: RM d'hipòfisi, analítica amb metabolisme fosfocàlcic, perfil hipofisari, metanefrines urinàries i proves d'imatge, tenint en compte el risc de desenvolupar feocromocitomes bilaterals i/o metastàtics (147).

Síndrome d'HPT-JT

La síndrome d'hiperparatiroidisme lligat a tumor mandibular o HPT-JT (OMIM 145001) es va descriure per primera vegada l'any 1990 en una família amb malaltia paratiroidal i fibromes

ossificants de mandíbula (150). Es van identificar mutacions germinals inactivadores en heterozigosi al gen *HRPT2*, posteriorment anomenat *CDC73*, com a causants d'aquesta síndrome (39,151). Fins ara s'han descrit a la literatura unes 150 famílies afectades per aquesta síndrome, que és d'herència AD (50,142,152).

El **gen *CDC73*** és un gen supressor tumoral, situat al cromosoma 1q31.2, que codifica per la parafibromina. La **parafibromina** és una proteïna predominantment nuclear que forma part del complex PAF1 (*polymerase-associated factor 1*) i s'encarrega de regular diferents vies de transcripció cel·lular com la modificació d'histones, la remodelació de cromatina, la via Wnt/beta-catenina, etc (4,39,153). També té un paper al citoplasma, on controla l'estabilitat de l'ARN (àcid ribonucleic) i regula l'apoptosi cel·lular (154). El patró de tumorogènesi d'aquest gen segueix el model de Knudson de pèrdua d'heterozigosi, ja que s'han demostrat mutacions somàtiques concomitants a teixits tumorals de pacients amb mutacions germinals en *CDC73*. És a dir, per a produir-se l'alteració tumoral, cal una inactivació bial·lèlica del gen, fet que donarà lloc a una pèrdua d'expressió de parafibromina (4,39,48,142). S'han descrit més de 60 variants germinals patogèniques en *CDC73* que afecten la regió codificant. La majoria prediuen un truncament prematur i, per tant, una pèrdua funcional de la parafibromina (48,155). Els exons més freqüentment afectats són l'1, el 7 i el 2. La majoria de variants són de desfasament, delecions o insercions (54%), sense sentit (24%), amb error de sentit (15%) o variacions *splice site* (7%) (48,50).

La síndrome HPT-JT, en la seva expressió clínica completa, es manifesta amb HPP, tumors mandibulars o maxil·lars, tumors renals i tumors uterins. Tanmateix, presenta una penetrància incompleta i variable, amb una manca de correlació genotip-fenotip (39,48,66). D'altra banda, s'ha vist que fins a un 20% dels pacients amb diagnòstic clínic d'HPT-JT no presenten variants patogèniques detectables a *CDC73*. Aquest fet podria explicar-se per mutacions no identificades en regions promotores o per delecions de tot un exó o gen que no s'hagin localitzat amb els mètodes convencionals (156,157).

L'**HPP** és la manifestació més freqüent i precoç del HPT-JT, amb una penetrància aproximadament del 80-100% en adults i una edat mitjana d'aparició de 28 anys. Els pacients amb HPT-JT tenen més prevalença de tumors paratiroidals atípics i de carcinomes paratiroidals (CP) respecte dels pacients amb HPP esporàdic (66,155,158). La prevalença de carcinoma paratiroidal en aquesta síndrome és del 23%, a diferència de l'1% en la resta d'HPP (152). S'ha vist que les mutacions germinals de major impacte, és a dir, les que prediuen major disrupció de la parafibromina, s'associen més fortament a CP (159). Els tumors paratiroidals associats a una inactivació bial·lèlica del gen *CDC73* solen tenir una pèrdua d'expressió immunohistoquímica nuclear i/o nucleolar de parafibromina (39,160). Com s'ha comentat anteriorment, la pèrdua de tinció per parafibromina pot ser útil per predir el comportament dels tumors paratiroidals, ja que s'associen a pitjor pronòstic (45,60). Tot i això, la majoria de pacients amb HPT-JT presenten adenomes paratiroidals benignes indistingibles dels adenomes esporàdics. També s'ha vist una major freqüència d'adenomes amb canvis quítics i amb característiques morfològiques diferents (51,142). L'afectació anatomopatològica en l'HPT-JT sol ser uniglandular (70-90%), a diferència del que passa en altres tipus d'HPPF (50,66,161).

Fins ara no existeix un consens sobre la cirurgia paratiroidal més adequada en aquesta síndrome, però en general s'aconsella que sigui precoç pel risc de CP (142). Tot i que cal individualitzar cada cas, habitualment es recomana l'exploració unilateral amb paratiroidectomia selectiva en cas d'una sola glàndula afectada detectada per proves de localització preoperatòries. L'exploració bilateral es reserva per aquells casos en què la localització és negativa o discordant o en casos d'alta sospita de CP. El risc de recurrència dels pacients amb CP és del 50%, amb una supervivència global al cap de deu anys d'un 60-70% (28,161–163). No s'ha demostrat un clar benefici de la paratiroidectomia

profilàctica per prevenir malignitat a la HPT-JT. En aquells pacients que no vulguin o puguin sotmetre's a cirurgia i presentin símptomes d'HPP, s'ha suggerit el tractament amb cinacalcet (50,152).

Les **lesions uterines** són la segona manifestació més freqüent en l'HPT-JT després de l'HPP, amb una prevalença del 50%. S'han descrit adenofibromes, leiomiomes, hiperplàsia endometrial, adenomiosi i adenosarcomes, tots amb un origen embriològic comú del sistema mesodèrmic ductal Mülleria. Habitualment, afecta dones d'entre 20 i 40 anys i es manifesta amb menorràgia, fet que pot derivar en una necessitat d'histerectomia i, per tant, en una disminució de la capacitat reproductora respecte de la població general (158,164). Tot i que l'adenomiosi és un trastorn amb una incidència poblacional elevada, alguns autors recomanen tenir en compte el diagnòstic d'HPT-JT en els casos en què aquesta s'associï amb HPP (39,50).

Un 10-30% dels pacients amb HPT-JT presenten **fibromes ossificants de mandíbula o maxil·lar** (FO). Són tumors benignes amb un risc de degeneració maligna menor al 0,5% (165). L'origen d'aquests tumors no queda clar. Es creu que deriven de les cèl·lules mesenquimàtiques blàstiques de la membrana periodontal. Cal diferenciar-los dels tumors marrons (o *pardos*) típics de l'osteïtis fibrosa quística o de l'HPP greu. Els FO poden aparèixer o empitjorar després de la paratiroidectomia (a diferència dels tumors marrons, que se solen resoldre amb la cirurgia de l'HPP), es limiten a la zona mandibular-maxil·lar, no presenten abundància de cèl·lules gegants multinucleades i poden presentar una vora escleròtica a la radiografia (50,166,167).

Un 15-30% dels pacients amb HPT-JT presenten **lesions renals**, essent els quists les més habituals. De forma menys freqüent s'han descrit casos d'hamartomes, tumors de Wilms, tumors epitelials i adenocarcinomes (152,168). **Altres manifestacions** reportades en pacients afectats d'aquesta síndrome són: aneurisma aòrtic toràctic, carcinoma de còlon i tumors tiroïdals. D'altra banda, en certs tumors com carcinomes gàstrics i neoplàsies de mama s'ha demostrat una regulació a la baixa de l'expressió de parafibromina, però sense evidenciar-se mutacions en el gen *CDC73* (169–172).

Atès que l'expressió clínica d'aquesta síndrome és força variable, caldria sospitar l'HPT-JT no només en casos d'HPP i tumors mandibulars, sinó també en casos d'HPP en edats joves (< 40 anys), malaltia multiglandular, anatomia patològica de risc (tumor atípic, adenoma paratiroidal quístic o CP), o en el cas d'HPP i coexistència de fibroma ossificant de mandíbula, tumor renal o uterí. Tot i que no hi ha guies consensuades sobre el maneig d'aquesta síndrome, es recomana un seguiment periòdic que inclogui estudi analític del metabolisme fosfocàlcic, ecografia cervical, ortopantomografia i ecografia renal i ginecològica (50).

1.2.2 Formes no sindròmiques

Les causes d'HPPF no sindròmic són aquelles en què l'única manifestació associada a l'alteració genètica és l'hiperparatiroidisme, sense altres signes ni símptomes extra paratiroidals. S'hi inclouen la hipercalcèmia hipocalciúrica familiar (HHF), l'hiperparatiroidisme primari neonatal greu i l'hiperparatiroidisme familiar aïllat (FIHP).

Hipercalcèmia hipocalciúrica familiar

La hipercalcèmia hipocalciúrica familiar (HHF), [OMIM #145980], és una malaltia AD que es va descriure per primera vegada l'any 1966 i va rebre aquest nom el 1972 (173). Se li estima una prevalença d'1/1000 a 1/5000 (174,175). Habitualment, s'ha descrit com a una hipercalcèmia asimptomàtica associada a hipocalciúrica inapropiada i a nivells de PTH circulant normals (68,176).

Existeixen tres formes de la malaltia, causades per mutacions germinals en tres gens diferents: l'HHF tipus 1, associada a mutacions del *CASR* (*Calcium sensing receptor*); l'HHF tipus 2, causada per mutacions en el *GNA11* (*Gα11 o G protein subunit alpha 11*); i l'HHF tipus 3, deguda a variants del gen *AP2S1* (*adaptor related protein complex 2 subunit sigma 1*). Aquestes mutacions acaben provocant una sensibilitat alterada al calci per part del receptor sensible al calci (CaSR) i, per tant, una resposta inadequada dels nivells de PTH a la calcèmia. Es necessiten nivells plasmàtics més elevats d'aquest electròlit per frenar l'alliberament de PTH. Així, s'acaba produint una hipercalcèmia compensatòria amb hipocalciúria (177).

L'**HHF tipus 1** és el subtipus més freqüent (65%), amb una prevalença estimada de 74,1 per 100.000 (39,175,178). La causen mutacions inactivadores en heterozigosi del gen *CASR*. Mutacions d'aquest mateix gen inactivadores en homozigosi s'han associat a l'hiperparatiroidisme primari neonatal greu (NSHPT), [OMIM #239200]. En canvi, mutacions activadores del *CASR* s'han associat a la hipocalcèmia autosòmica dominant [OMIM #146200] (177,179). El **gen CASR** se situa al cromosoma 3q13.3-q21.1, presenta vuit exons (sis de codificants i dos de no codificants 1A i 1B) i dos promotors. Codifica pel CaSR, una glicoproteïna receptora de classe C acoblada a proteïnes G amb set dominis transmembrana, formada per 1078 aminoàcids, implicada en l'homeòstasi del calci (142,180,181). Aquest receptor modula la secreció de pèptics, l'activitat de transport/canals iònics i la diferenciació, proliferació i apoptosi cel·lulars (182). S'expressa en múltiples teixits, però fonamentalment a les glàndules paratiroidals, les cèl·lules dels túbuls renals i al sistema ossi (177,183). Les cèl·lules paratiroidals responen a petites disminucions dels nivells de calci extracel·lular a través d'aquest receptor, que genera canvis en les vies intracel·lulars provocant finalment un augment de la secreció de PTH al torrent sanguini. En l'HHF el CaSR és menys sensible als nivells de calci, i per aquest motiu es produeix una hipercalcèmia compensatòria. S'han descrit més de 300 mutacions causants d'HHF tipus 1, que actuen mitjançant diferents mecanismes com ara la disminució de l'activació del CaSR, la disminució de l'expressió del receptor a la superfície cel·lular, la disminució de l'afinitat pel calci plasmàtic, etc. La majoria d'aquestes mutacions són amb error de sentit (>85%), però també poden ser sense sentit, deleccions, insercions i mutacions *splice site*. Aquestes mutacions acaben donant lloc a una proteïna CaSR disfuncional, sigui per alteració en la biosíntesi o en la senyalització. En una cohort francesa de 77 pacients adults s'ha vist una manca de correlació genotip-fenotip a l'HHF tipus 1 (178).

L'**HHF tipus 2** és la menys freqüent i ve causada per mutacions de pèrdua de funció, en heterozigosi, del **gen GNA11**, situat al cromosoma 19p.13.3. Codifica per la subunitat α de la proteïna G acoblada al CaSR, que està involucrada en la senyalització d'aquest receptor (184). S'estima que un 5-10% dels pacients amb HHF i sense mutacions a *CASR* podrien ser portadors de mutacions en el *GNA11* (142,185). Els pacients amb aquest subtipus solen presentar un fenotip més lleu d'HHF (186).

L'**HHF tipus 3** és el subtipus més greu i se li estima una prevalença de 7,8 per 100.000 (187). La causen mutacions germinals inactivadores del **gen AP2S1**, que codifica per la AP2 σ , una subunitat d'un complex multimèric implicat en l'endocitosi del CaSR. Les mutacions descrites fins ara en aquest gen provoquen una interrupció entre l'AP2 σ i el domini intracel·lular del CaSR. D'aquesta manera, disminueixen l'endocitosi i afecten l'expressió del receptor a la superfície cel·lular i el senyal de transducció. Això genera una disminució de la sensibilitat al calci extracel·lular (184,186,188,189). Aquests pacients solen presentar nivells més alts d'hipercalcèmia, hipermagnesèmia i hipocalciúria respecte a les altres dues formes d'HHF. També poden mostrar una disminució de la DMO a la infància, un augment de risc d'osteomalàcia i tenen un risc més elevat de disfunció cognitiva. S'estima que fins a un 15-20% dels pacients amb HHF i sense mutacions a *CASR* podrien presentar mutacions del *AP2S1* (185,190).

El **fenotip** típicament associat a l'HHF és un patró bioquímic d'hiperparatiroidisme, hipercalcèmia lleu-moderada, PTH normal o elevada i hipocalciúrica relativa, juntament amb hipermagnesèmia lleu. La hipercalcèmia habitualment és asimptomàtica i no progressa al llarg dels anys (190,191). Els nivells de PTH plasmàtica són inapropiadament normals en el 80% dels pacients i l'excreció urinària de calci sol ser baixa o amb valors normal-baixos en relació amb la calcèmia plasmàtica (186,191). La majoria d'individus amb HHF es mostren asimptomàtics, no obstant això, s'han descrit casos amb condrocalcinosi, pancreatitis recurrent i amb hipercalcèmia greu (4,178,192–196). També s'han reportat pacients amb nefrolitiasis, tot i que la seva composició i patogènesi no està ben definida en aquests casos (9). En una cohort de pacients amb HHF s'ha reportat fins a un 43% de característiques que fins ara es consideraven atípiques d'aquesta malaltia (178).

La **sospita diagnòstica** més habitual apareix en pacients amb patró bioquímic d'HPP que presenten proves d'imatge cervicals negatives. Per al diagnòstic s'utilitza la mesura de la ràtio d'aclariment de calci/creatinina (CCCR), que sol ser $<0,01$ en el 80-95% de pacients amb HHF. Una CCCR superior a 0,02 correspon a HPP (d'altres causes que no siguin HHF) amb $>90\%$ de probabilitat, mentre que una ràtio inferior a 0,01 indica HHF, en presència de nivells adequats de vitamina D, funció renal normal, ingesta normal de calci i manca d'exposició a diürètics tiazídics o liti. Tot i això, fins a un 20% poden tenir-la igual o major a 0,01, per la qual cosa sovint aquesta mesura sola fa difícil distingir l'HHF d'altres causes d'HPP (178,189,197). A més, pacients amb HPP esporàdic poden presentar una ràtio CCCR baixa a causa d'un dèficit de vitamina D o d'una insuficiència renal (198). Per millorar la fiabilitat diagnòstica s'han proposat altres eines diagnòstiques com el Pro-FHH, que té en compte el calci plasmàtic, la PTH, l'osteocalcina i la CCCR (199). Així mateix, algun grup proposa usar els valors de magnesi sèric per distingir l'HHF d'altres tipus d'HPP (200).

El diagnòstic definitiu de l'HHF es realitza amb l'**estudi genètic**, que permet detectar mutacions en algun dels gens relacionats amb l'HHF (*CASR*, *GNA11* i *AP2S1*). De forma genèrica, es recomana el cribratge genètic en pacients amb sospita d'HHF si la CCCR és menor a 0,02 (68). Per diferenciar l'HHF tipus 3 de la tipus 1 Hannan et al. proposen l'índex d'aclariment de calci/magnesi (calci plasmàtic x magnesi plasmàtic / $100 \times$ CCCR) (190). Recomanen aplicar l'índex en casos de pacients amb CCCR $< 0,01$ i, si el resultat és > 5 , descartar primer mutacions del gen *AP2S1*. En canvi, si l'índex surt < 5 , és recomanable avaluar directament els tres gens associats a l'HHF (*CASR*, *GNA11* i *AP2S1*). Altres autors proposen inicialment estudiar el *CASR* i en cas d'estudi genètic negatiu, continuar amb l'*AP2S1*, excepte en casos d'hipercalcèmia i hipermagnesèmia marcades o dificultats en l'aprenentatge, en què aconsellen descartar, en primer lloc, l'HHF tipus 3 (201). Si el fenotip és altament suggestiu d'HHF i no es troba cap mutació en cap dels tres gens, hi ha autors que suggereixen completar l'estudi amb una plataforma de seqüenciació d'ADN més àmplia, de cara a detectar mutacions inicialment no identificades o en gens no estudiats prèviament (9,202). En aquests casos cal considerar també la presència d'autoanticossos contra el CaSR (que poden ser causants de síndromes *HHF-like*), sobretot en situacions d'hipercalcèmia i hipocalciúria adquirides i antecedents personals o familiars de malalties autoimmunitàries (203–205).

Davant el diagnòstic d'HHF, és recomanable realitzar l'estudi genètic als familiars de primer grau de cara a poder donar-los **consell genètic** i fer un seguiment clínic adequat. Si els dos progenitors són portadors de mutacions en *CASR* s'aconsella fer diagnòstic genètic prenatal o neonatal. Els fills de persones afectades d'HHF tenen més risc de presentar trastorns relacionats amb el calci els primers dies de vida, tot i no heretar la mutació en qüestió. Els nadons que hereten una mutació paterna que provoca HHF i estan exposats a nivells normals de calci matern a l'úter poden manifestar hipercalcèmia marcada al naixement, mentre que els fills de mares afectades que no hereten la mutació poden manifestar hipoparatiroidisme neonatal transitori després de l'exposició a nivells de calci relativament alts durant l'embaràs (142,206,207).

Quant al **maneig terapèutic** de l'HHF, la majoria de pacients tenen un fenotip asimptomàtic pel qual no requereixen tractament, segons bona part de les guies clíniques. Referent a la cirurgia paratiroidal, en general es recomana evitar-la, ja que el risc de recurrència de l'HPP és gran, excepte si la paratiroidectomia és total. L'afectació anatomopatològica més habitual a l'HHF és la malaltia multiglandular amb hiperplàsia, tot i que hi ha casos descrits d'adenomes paratiroidals (39,178,186,198). Malgrat que les guies recomanen evitar la intervenció quirúrgica en l'HHF, hi ha casos descrits amb millora de la hipercalcèmia després de la cirurgia, sobretot quan es tracta d'adenomes paratiroidals (194,208–211). Per aquest motiu, alguns autors aconsellen valorar la paratiroidectomia en l'HHF tipus 1, tenint en compte les característiques de cada pacient, com ara l'evolució de les calcèmies i calciúries, les proves d'imatge, etc. (178,212). Una altra opció terapèutica que plantejada en els darrers anys són els calcimimètics. És recomanable considerar-los en casos seleccionats d'HHF, com aquells amb símptomes d'hipercalcèmia o afectació d'òrgans diana (68,213,214). L'únic calcimimètic disponible per l'administració oral és el cinacalcet, que actua com a agonista al·lostèric del CaSR, i potencia així la seva resposta al calci, amb la consegüent disminució dels nivells plasmàtics de calci i de PTH. Aquest fàrmac ha demostrat eficàcia en els tres tipus d'HHF (196).

Hiperparatiroidisme neonatal

L'**hiperparatiroidisme primari neonatal greu o NSHPT** representa la forma autosòmica recessiva de l'HHF tipus 1. El causen mutacions amb pèrdua de funció del **gen CASR** que afecten els dos al·lels, sigui en homozigosi o sigui en heterozigosi composta. La majoria són sense sentit o de desfasament i donen lloc a una proteïna truncada, és a dir, a un receptor CaSR no funcional (215). Aquesta malaltia es caracteritza per una hipercalcèmia simptomàtica amb manifestacions òssies d'hiperparatiroidisme, habitualment en els primers sis mesos de vida i pot arribar a ser letal. Generalment, es manifesta en el període postpart, amb una mitjana d'aparició al cap de catorze dies de vida. Pot produir insuficiència respiratòria, problemes de creixement, deshidratació, hipotonia, restrenyiment, deformitats toràciques i múltiples fractures per desmineralització òssia. El NSHPT sol requerir tractament quirúrgic urgent per la hipercalcèmia aguda greu (186,202). La tècnica d'elecció és la paratiroidectomia total i les glàndules paratiroidals acostumen a presentar una hiperplàsia difusa en termes histològics (28,216). Alguns estudis recents de pacients tractats amb cinacalcet suggereixen que aquest fàrmac podria ajudar a endarrerir o fins i tot evitar la intervenció quirúrgica (217). De forma anecdòtica, hi ha casos descrits d'hiperparatiroidisme neonatal en pacients amb mutacions del CASR en heterozigosi. Aquesta variabilitat fenotípica de les mutacions en heterozigosi podria ser deguda a diferents factors com efectes dominants negatius, mutacions *de novo*, patró d'herència paterna, alteració funcional important, etc. Aquests pacients solen presentar nivells de calcèmia inferiors als homozigots i una clínica més lleu (186,196).

D'altra banda, també hi ha casos identificats d'**hiperparatiroidisme neonatal transitori (HPNST)** com a conseqüència de mutacions en el **gen TRPV6** (*transient receptor potential cation channel subfamily V member 6*) amb afectació bial·lèlica. Aquest gen se situa al cromosoma 7q34, conté quinze exons i codifica per un canal de calci selectiu, el TRPV6, que s'expressa a teixits epitelials com la placenta, els intestins, els ronyons, l'epidídim i també en glàndules exocrines com el pàncrees, la pròstata i les glàndules salivals, sudorípares i mamàries (218–220). Té una selectivitat molt alta pel calci i està involucrat en el seu transport transcel·lular a escala intestinal i renal. Aquest canal participa en la neurotransmissió, la contracció muscular i l'exocitosi proporcionant el calci com a segon missatger intracel·lular (221). Els corrents d'aquest canal són inactivats ràpidament davant d'un augment del calci citoplasmàtic, però els mecanismes moleculars que el regulen encara no es coneixen bé (219). Hi ha evidències que apunten que la seva activitat està influenciada per molts

factors hormonals, genètics i fisiològics, com la vitamina D, la calcitonina, les hormones sexuals, etc. Així mateix, aquest canal té un paper indispensable en el manteniment del transport maternofetal de calci i en estats fisiològics com l'embaràs, la lactància i l'exercici físic.

En models animals s'ha demostrat que una pèrdua de funció del gen *TRPV6* provoca hipercalcèmia, baixa DMO, baix pes, disminució de la fertilitat, dermatitis i alopecia (219,220,222). En humans, hi ha casos reportats d'HPNST en nounats amb mutacions amb error de sentit en homozigosi del *TRPV6* (219,223). Aquesta malaltia es caracteritza per una mineralització òssia insuficient a conseqüència d'una alteració en el transport transplacentari de calci. Els nounats afectats presenten elevació de la PTH i de l'activitat fosfatasa alcalina, fractures prenatales, costelles curtes, ossos llargs arquejats i poden patir dificultat respiratòria i alteracions digestives. Curiosament, s'ha vist que el tractament amb calci oral pot normalitzar les alteracions esquelètiques abans dels dos anys de vida en la majoria de casos. D'altra banda, es creu que el canal *TRPV6* també podria jugar un paper en la formació de nefrolitiasis i de pancreatitis crònica, però falten estudis en humans que ho confirmin (220,224).

Un altre gen que s'ha vist implicat en casos aïllats d'**hiperparatiroidisme primari neonatal** els darrers anys és el ***SLC12A1***. Codifica pel cotransportador de sodi-potassi-clor 2 i és responsable de la síndrome de Bartter antenatal tipus 1. Tot i això, el mecanisme fisiopatològic de l'HPP en aquesta síndrome encara no és ben conegut (225,226).

Hiperparatiroidisme familiar aïllat

L'hiperparatiroidisme familiar aïllat (FIHP) és un diagnòstic d'exclusió per a aquells pacients amb HPP i antecedents familiars (AF) d'hiperparatiroidisme, però sense altres antecedents personals ni familiars de síndromes neoplàsiques i sense manifestacions extra-paratiroidals aparents (96,227). Pot ser causat per variants patogèniques en alguns dels gens associats a l'HPPF sindròmic, com ara el *MEN1*, el *CDKN1B* o el *CDC73*. Així, podria representar una manifestació incompleta d'una forma familiar de l'HPP, com ara del *MEN1* o de l'HPT-JT (70,228). Altrament, fins al 15-20% dels pacients amb FIHP presenten variants patogèniques activadores del *GCM2* (*glial cells missing transcription factor 2*), un gen localitzat al cromosoma 6 que codifica per al factor de transcripció GCMb, implicat en el desenvolupament de les glàndules paratiroidals (227,229). Tot i això, la majoria de variants d'aquest gen són freqüents a la població general i hi ha pocs estudis sobre la seva penetrància, l'afectació funcional in vitro i la seva associació amb l'HPP (9). Alguns autors també han classificat com a FIHP pacients amb fenotip d'HPPF i mutacions en el *CASR*, tot i que probablement es podrien englobar dins l'HHF tipus 1 (142). De totes maneres, la major part de casos de FIHP són d'etiologia genètica desconeguda, sigui per afectació de gens desconeguts o de regions no reconegudes amb els mètodes d'estudi convencionals (9,70,144,192,227,230–232). Així, en resum, el FIHP es considera un grup heterogeni de pacients amb: expressions incompletes de mutacions a *MEN1*, *CDC73*, *CDKN1B* o *CASR*; mutacions germinals activadores del *GCM2*; o causes hereditàries d'HPP idiopàtiques (39).

La penetrància exacta de l'hiperparatiroidisme en el FIHP no se sap del cert, ja que és una malaltia difícil d'identificar. En general, és recomanable que aquells individus amb sospita de FIHP se sotmetin a estudi genètic de les causes establertes d'HPPF (39,144). El patró d'herència sol ser AD i s'ha vist que els portadors de variants en el gen *GCM2* tenen major prevalença de malaltia paratiroidal multiglandular, menor taxa de curació en cas de cirurgia i un augment de risc de carcinoma paratiroidal (233,234). Els pacients amb FIHP associat a mutacions de *CDC73* presenten una clínica més greu, en edats més joves i més risc de carcinomes paratiroidals i d'adenomes paratiroidals amb característiques atípiques o quístiques (28,235). No hi ha guies específiques

consensuades del maneig terapèutic del FIHP, i per això se sol recomanar una aproximació terapèutica empírica basada en els estudis d'imatge (28,66). Algun autor proposa la realització d'exploració bilateral cervical amb la visualització de les quatre glàndules, tenint en compte el risc de carcinoma paratiroidal associat sobretot a mutacions dels gens *CDC73* i *GCM2*, i també la prevalença més elevada de MMG (144,234).

Altres gens associats a l'hiperparatiroidisme familiar

Un altre gen que podria estar implicat en casos d'hiperparatiroidisme familiar és el **gen AIP** (*aryl hydrocarbon receptor-interacting protein*). Mutacions germinals d'aquest gen s'han associat a la formació d'adenomes hipofisaris familiars, predominantment somatotropinomes i prolactinomes (236–238). També hi ha casos reportats d'individus amb HPP portadors de variants germinals a *AIP*, per la qual cosa es creu que l'afectació d'aquest gen podria predisposar a la formació d'adenomes paratiroidals. Tot i això, la seva implicació en la patologia paratiroidal encara és qüestionable, ja que algunes de les variants descrites podrien correspondre a polimorfismes o ser de significat incert (238,239).

Per últim, alguns autors proposen que el **gen PTH** podria estar associat també a l'HPPF. Hi ha una mutació sense sentit descrita en el gen *PTH*, Arg83Stop, en un pacient amb hipercalcèmia per un adenoma paratiroidal, que presentava una PTH intacta indetectable en sèrum (mesurada en dos laboratoris diferents). Aquesta mutació s'ha vist que dona lloc a una PTH truncada i, en aquest cas, es va associar a LOH del locus de *PTH* en l'adenoma paratiroidal. Aquests autors apunten, per tant, que mutacions sense sentit del gen *PTH* que provoquen formes de PTH truncada (no mesurable per mètodes estàndards de laboratori) podrien produir fragments de PTH biològicament actius i generar adenomes paratiroidals (240).

1.2.3 Cribratge genètic de l'hiperparatiroidisme familiar

Estudi genètic

Tot i que s'estima que aproximadament un 10% dels pacients amb HPP tenen origen hereditari, fins ara les guies clíniques del maneig i diagnòstic de l'hiperparatiroidisme fan poc èmfasi en l'aplicació dels tests genètics per determinar la seva etiologia. Aquest fet s'explica perquè el coneixement en aquest àmbit encara és escàs, ja que molts dels gens associats a l'HPPF s'han descobert els darrers anys i, per tant, no hi ha molts casos publicats a la literatura mèdica. També cal tenir present que l'accessibilitat als tests genètics no sempre està garantida amb equitat. Tanmateix, cal remarcar que realitzar el cribratge de causes genètiques de l'HPP pot tenir múltiples **avantatges** (4,39,212):

- **Seguiment clínic apropiat:** Ajuda a confirmar un diagnòstic clínic per poder fer un cribratge adequat de tumors o comorbiditats que s'associen a formes sindròmiques de l'HPPF. A més, els pacients portadors de mutacions requereixen seguiment de per vida, a conseqüència d'un risc més elevat de recidiva o d'aparició d'altres tumors associats.
- **Maneig terapèutic adequat:** permet individualitzar el tractament en cada cas, sigui quirúrgic o no, tenint en compte el risc de MMG, de carcinoma o d'altres afectacions. La identificació preoperatòria de l'etiologia de l'HPP permet una planificació més acurada del tractament quirúrgic, ja que algunes formes familiars necessiten, d'entrada, una paratiroidectomia subtotal per minimitzar el risc de recidiva i altres podrien no requerir cirurgia. Per exemple, en casos de mutacions en *CDC73* cal tenir en compte el risc de carcinoma, casos de MEN2

precisen la realització de tiroïdectomia profilàctica i en casos de mutacions a *MEN1* s'ha de valorar fer una exploració cervical bilateral pel risc de MMG.

- **Identificació de familiars de risc:** l'estudi de segregació familiar o cribratge en cascada permet identificar familiars portadors de síndromes potencialment greus i poder així oferir-los un diagnòstic precoç i un seguiment clínic adequat. També és útil de cara a descartar aquells membres de la família que no siguin portadors, fet que disminueix la preocupació i estalvia proves innecessàries.
- **Consell genètic prenatal:** permet oferir un diagnòstic prenatal i/o preimplantacional, aconsellable en portadors de mutacions germinals a *RET*, *MEN1*, *CDKN1B* i *CDC73*. En canvi, respecte a les mutacions a *CASR* només se sol recomanar el diagnòstic prenatal en cas que els dos progenitors en siguin portadors (103,183,235,241,242).

Mètodes d'estudi genètic

Quan un equip mèdic proposa la realització d'un estudi genètic a un pacient cal assegurar que aquest comprèn les seves possibles implicacions i les accepta mitjançant la signatura d'un consentiment informat. Així mateix, és necessària la presència de professionals amb coneixement de l'àmbit de la genètica que puguin interpretar adequadament els resultats i oferir consell pretest i posttest. En general, l'extracció d'ADN es realitza a través de mostres de sang perifèrica (243). La seqüenciació dels gens relacionats amb l'HPPF s'ha de dur a terme en un laboratori acreditat d'acord amb els estàndards nacionals. Es pot fer mitjançant la seqüenciació gènica única o bé estudiar a la vegada múltiples gens, sigui amb la tecnologia de la *Next Generation Sequencing* (NGS), que permet estudiar múltiples gens simultàniament (panell de gens), o bé seguint una estratègia d'estudi de tot l'exoma o el genoma i ús de panells virtuals personalitzats.

A l'hora d'interpretar els resultats cal considerar, a part de les mutacions puntuals, les variacions en nombre de còpies (de l'anglès *copy number variants* o CNV) com les delecions o les duplicacions. Les CNV es poden analitzar mitjançant NGS o a través de la tècnica Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). Cal tenir-les en compte sobretot en l'estudi dels gens *MEN1* i *CDC73*, ja que les grans delecions no són infreqüents (80,155). La classificació de les variants genètiques s'efectua seguint les guies de l'American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). Aquestes es categoritzen en funció de la patogenicitat predita: classe 1 o benigna; classe 2 o probablement benigna; classe 3 o VUS (variant de significat incert); classe 4 o probablement patogènica (LP); i classe 5 o patogènica. Les variants de classe 4 o LP prediuen la malaltia amb > 90% de certesa, així que una variant tant de classe 4 (LP) o classe 5 (patogèniques) es considera per norma un resultat genètic positiu, és a dir, que confirma la sospita clínica. Les variants de classe 1 o 2, en canvi, expressen un resultat genètic negatiu. I, en principi, les variants de classe 3 o VUS s'haurien d'entendre com a resultat no concloent. Tanmateix, cal tenir present que la mateixa variant pot acabar canviant de categoria a LP o patogènica en funció dels estudis de segregació familiar o d'estudis funcionals (244). El fet de no detectar variants que expliquin el fenotip d'un pacient no exclou que puguin existir mutacions en regions que no han estat cobertes segons el mètode usat o en algun gen desconegut fins al moment (212). De fet, diferents autors recomanen que pacients amb alta sospita d'HPPF, però amb resultat genètic no concloent o negatiu se sotmetin a un nou estudi genètic si l'abordatge ha estat amb un panell de gens o bé es faci una reanàlisi de l'estudi si aquest s'ha fet mitjançant exoma un cop s'hagi ampliat el coneixement de l'àrea o hagi millorat la tecnologia dels mètodes d'estudi genètic.

L'anàlisi d'un panell permet estudiar de manera simultània tots els gens implicats en la malaltia, sigui amb la base tècnica de seqüenciació de l'exoma (més usada ja actualment) o amb el NGS. No

obstant això, aquests mètodes augmenten les possibilitats de trobar variants VUS, que poden ser difícils d'interpretar i provocar una ansietat innecessària a pacients i familiars. El mètode genètic òptim depèn dels recursos i protocols de cada centre i de la situació clínica individual. Els estudis de segregació familiar solen fer-se via seqüenciació de Sanger mitjançant l'anàlisi de la posició de la variant familiar detectada en el cas índex. En funció del gen implicat en el cas índex s'aconsella un tipus de cribratge diferent. Per exemple, en el cas de *MEN1* l'opció més recomanable és començar el cribratge quan els pacients tenen cinc anys pel risc de desenvolupar un tumor associat a *MEN1* (69). En canvi, en el cas de l'HHF, pot fer-se el cribratge inicialment amb el calci en plasma i valorar la realització d'estudi genètic si es detecta hipercalcèmia, o bé fer l'estudi genètic d'entrada a tots els familiars de primer grau, tot i que no existeix un consens clar. El consell genètic prenatal està indicat en casos de risc de NSHPT, així com en casos de risc d'heretar mutacions a *RET* o *MEN1* (212,245).

Indicacions de cribratge genètic en l'hiperparatiroidisme

A l'hora de valorar fer un estudi genètic cal tenir present les característiques que solen diferenciar l'HPPF de l'espòradic, que són les que ens faran sospitar d'un origen hereditari. Respecte a les **indicacions de cribratge genètic** i els gens que cal analitzar encara no existeix un consens evident entre les diferents societats científiques. Això provoca que l'estudi genètic no estigui implementat ni estandarditzat en molts centres. A la Taula 3 podem veure les recomanacions de test genètic segons les principals guies, en què s'observa la gran heterogeneïtat entre elles tant per les indicacions com per quins gens estudiar davant la sospita d'HPPF. Una limitació important de la majoria de guies és que moltes defineixen només les recomanacions per a un gen específic, sense contemplar un estudi genètic més complet. Algunes aconsellen indicacions d'estudi genètic, però no especifiquen quins gens cal avaluar en cada cas. De forma general, però, i segons revisions recents, els factors de risc que poden associar-se a una causa genètica de l'HPP i que, per tant, ens han de fer sospitar d'un possible HPPF són (39,202,212,246):

- **Edat jove:** s'associa fermament a les formes familiars d'HPP. Existeix una controvèrsia sobre el llinar d'edat concret a partir del qual caldria sospitar una causa hereditària d'hiperparatiroidisme, però en general s'accepta per sota dels 40-45 anys. Aquesta manca d'unanimitat és deguda a la falta d'estudis prospectius aleatoritzats en aquest àmbit, ja que la majoria són cohorts retrospectives o sèries de casos, amb un baix nivell d'evidència (4,245,247-249).
- **Antecedent familiar d'HPP**
- **Malaltia multiglandular** sigui sincrònica o asincrònica.
- **HPP recurrent o persistent** després d'haver extirpat una glàndula histològicament anormal.
- **Història personal d'altres característiques fenotípiques associades a l'HPPF sindròmic:** presència de tumors pancreàtics, adenomes hipofisiaris, angiofibromes, col·lagenomes o lipomes (associats a mutacions de *MEN1*); tumors de mandíbula, uterins o renals (associats a *CDC73*); carcinoma medul·lar de tiroides, feocromocitoma o líquen cutani amiloïdòtic (relacionat amb *RET*); etc.
- **Anatomia patològica paratiroidal de risc: carcinoma paratiroidal** (especialment associat a mutacions del gen *CDC73*), **tumor paratiroidal atípic o adenoma quístic.**

Taula 3: recomanacions d'estudi genètic per pacients amb hipercalcèmia dependent de PTH segons les diferents guies i societats científiques. AP: antecedents mèdics personals; ESE: European Society of Endocrinology; ASBMR: American Society for Bone and Mineral Research.

Societat científica	Gens que recomanen estudiar	Indicacions d'estudi genètic en HPP	Observacions
Consens canadenc i internacional (249)	Gens HHF: <i>CASR</i> , <i>GNA11</i> , <i>AP2S1</i> Gens resta d'HPPF: <i>MEN1</i> , <i>RET</i> , <i>CDC73</i>	Gens HHF: edat < 30 anys, CCCCR<0,02, AF hipercalcèmia o hipercalcèmia persistent postcirurgia paratiroidal. Gens HPPF (no HHF): edat < 35 anys o tumors relacionats amb HPT-JT, MEN1 o MEN2.	Manquen gens associats a HPPF
Consens de societats científiques (endocrinologia, cirurgia end., òssia i mineral) d'Austràlia i Nova Zelanda (245)	Gens HHF: <i>CASR</i> , <i>GNA11</i> , <i>AP2S1</i> Gens resta d'HPPF: <i>MEN1</i> , <i>RET</i> , <i>CDC73</i> , <i>CDKN1B</i> , <i>GCM2</i> , <i>CASR</i>	Gens HHF: hipercalcèmia asimptomàtica, lleu, en edat jove, no progressiva, PTH normal o mínimament elevada, hipocalciúria (especialment si CCCCR<0,01). Gens HPPF (no HHF): edat jove, MMG, carcinoma paratiroidal (<i>CDC73</i>), AF d'HPP o de tumors relacionats, AP d'altres comorbiditats relacionades amb els gens citats	Recomanen estudiar tots els gens en cas de pacients que compleixin els dos criteris. No defineixen el criteri d'edat, però suggereixen <= 45 anys. Recomanen individualitzar el tipus d'estudi genètic en funció del fenotip de cada pacient
Consens Fourth International Workshop per al diagnòstic de l'HPP asimptomàtic (68)	Gens HHF: <i>CASR</i> , <i>GNA11</i> , <i>AP2S1</i> Gens resta d'HPPF: <i>MEN1</i> , <i>RET</i> , <i>CDC73</i> , <i>CDKN1B</i> , <i>CDKN2B</i> , <i>CDKN2C</i> , <i>CDKN1A</i> , <i>PTH</i>	Gens HHF: CCCCR<0,02 Gens HPPF (no HHF): edat jove, MMG, carcinoma paratiroidal o adenoma paratiroidal atípic, AF d'hipercalcèmia o tumors típics de MEN o de l'HPT-JT	Recomanen analitzar els gens per separat en funció de la sospita fenotípica de cada pacient.
Guia Fifth International Workshop per a l'avaluació i maneig de l'HPP, ASBMR (10)	No especificats	Edat<30 anys, MMG, AF d'hipercalcèmia o de síndromes com MEN1, MEN2A, MEN4 o HPT-JT, presència de carcinoma paratiroidal o tumor paratiroidal atípic	No hi ha recomanacions específiques de quins gens estudiar.
Consens de la European Society of Endocrine Surgeons (66)	Inicialment: <i>MEN1</i> , <i>CASR</i> Si <i>MEN1</i> negatiu: <i>CDC73</i> i <i>CDKN1B</i> Si sospita MEN2: <i>RET</i>	Edat < 40 anys, MMG, AF d'HPP, AP d'endocrinopaties relacionades amb HPPFindròmic, HPP persistent o recurrent postcirurgia paratiroidal.	No especifiquen si realitzar un panell. Recomanen estudiar els gens per separat en funció de cada pacient.
Revisió Endocrine 2022, Austràlia (212)	Gens HHF: <i>CASR</i> , <i>GNA11</i> , <i>AP2S1</i> Gens resta d'HPPF: <i>MEN1</i> , <i>RET</i> , <i>CDC73</i> , <i>CDKN1B</i> , <i>GCM2</i> , <i>CASR</i>	Gens HHF: edat jove, absència de normocalcèmia, hipercalcèmia lleu-moderada amb PTH normal o mínimament elevada, no resposta a la cirurgia paratiroidal, hipocalciúria CCCCR<0,02, fosfatèmia normal, hipermagnesèmia, comorbiditats neuropsiquiàtriques o dificultats d'aprenentatge (associat a HHF tipus 3)	Recomanen panell amb NGS i no seqüenciació individual Sanger.

		Gens HPPF (no HHF): edat jove, MMG, carcinoma paratiroidal, AP de característiques relacionades amb HPPF sindròmic, AF d'HPP i/o de tumors relacionats.	
Revisió <i>Journal of Internal Medicine</i> (4)	<i>MEN1, AP2S1, CASR, GNA11, CDC73, CDKN1B, CDKN1A, CDKN2B, CDKN2C, RET, PTH</i>	Edat <45 anys, MMG, carcinoma paratiroidal o tumor paratiroidal atípic (amb bandes fibroses o quístics), AF d'HPP, característiques suggestives de MEN, HPT-JT o d'HHF, familiar de primer grau d'un portador	Plantegen un algoritme a seguir analitzant cada gen per separat en funció del fenotip.
Guia/revisió <i>Clinical Endocrinology</i> (202)	Panell d'HPPF: <i>MEN1, RET, CDC73, CDKN1B, GCM2, (CASR)</i> Panell d'HHF: <i>AP2S1, CASR, GNA11</i>	Edat<40 anys, característiques fenotípiques d'HPPF sindròmic, AF d'HPP o HHF o d'HPPF, anatomia patològica de risc (carcinoma paratiroidal, tumor paratiroidal atípic, MMG), HPP recurrent postcirurgia, sospita bioquímica d'HHF	Recomanen estudiar panell de gens o gens individuals en funció de la sospita clínica.
Consens i recomanacions del <i>PARAT Working Group, ESE</i> (13)	No especificats	Edat<30 anys i/o MMG	No hi ha recomanacions específiques de quins gens estudiar i en quines indicacions
Revisió <i>Endocrine Reviews</i>, de la <i>Endocrine Society</i> (39)	No especificats	AF d'HPP, MMG, HPP recurrent o persistent postcirurgia, edat≤45 anys, carcinoma paratiroidal, sospita d'HHF (sense especificar), gastrinoma (<i>MEN1</i>), presència de dos o més tumors associats a <i>MEN1</i> (<i>MEN1</i>), presència d'un tumor característic de <i>MEN1</i> i AF de <i>MEN1</i> (<i>MEN1</i>)	No detallen si realitzar un panell de gens o estudiar-los de forma individual
Revisió <i>Front Horm Res</i> (250)	<i>MEN1, AP2S1, CASR, GNA11, CDC73, CDKN1B, CDKN1A, CDKN2B, CDKN2C, RET, PTH</i>	Edat<45 anys, MMG, dues o més característiques de MEN, AF de primer grau portador de mutació en algun dels gens relacionats amb HPPF, carcinoma paratiroidal o tumor paratiroidal atípic	Suggereixen seguir les recomanacions de Thakker et al (2016). (4)
Guia de la <i>American Association of Endocrine Surgeons</i> (251)	No especificats	Edat<40 anys i MMG. Considerar-ho si AF d'HPP o manifestacions suggestives d'HPPF sindròmic (strong recommendation; low-quality)	No hi ha recomanacions específiques de quins gens estudiar.
<i>National Genomic Test Directory 2022 (National Health Service)</i> (246)	No especificats	Gens HHF: hipercalcèmia amb $CCCR < 0,02$ i PTH normal Gens HPPF (no HHF): Edat<50 anys o AF rellevant, MMG i AF rellevant, carcinoma paratiroidal, tumor paratiroidal atípic o quístic, fibroma ossificant de mandíbula o maxil·lar.	Recomanen usar un panell de gens, però no especifiquen quins.
Revisió <i>Journal of Endocrinological Investigation</i> (252)	<i>MEN1, CDC73, CDKN1B, RET, CASR, CDKN2B,</i>	No dona indicacions específiques sinó recomanacions d'estudi genètic en cas de sospita d'HPPF.	Proposen un algoritme específic per cada sospita clínica i començar l'estudi genètic mitjançant l'anàlisi

	<i>CDKN2C, CDKN1A, GNA11, AP2S1, GCM2</i>		individual amb seqüenciació tipus Sanger. Només recomanen panell de gens en cas de FIHP.
--	---	--	--

Com es pot deduir de la Taula 3, existeix una manca d'unanimitat entre les diferents societats científiques quant a quins gens es recomana estudiar i sota quines indicacions clíniques o histològiques en els pacients amb hiperparatiroidisme. Alguns autors diferencien les indicacions de test genètic per descartar hipercalcèmia hipocalciúrica familiar de les indicacions per a la resta de causes d'HPPF, tot i que moltes s'encavalquen (68,202,212,245,249). Diferents revisions suggereixen estudiar un gen o altre en funció del fenotip específic que presenti cada individu (68,245). En altres, s'aconsella seguir un algoritme preestablert o l'ús de panells (4,252). I en moltes, directament, no s'especifica quins gens estudiar ni sota quines indicacions (10,13,246,251). Així mateix, destaca l'escassetat d'estudis o recomanacions publicats en població mediterrània i, concretament, en població espanyola. Totes aquestes situacions van promoure la motivació per fer un estudi en el nostre centre, intentant englobar la major part de gens possiblement implicats en l'HPPF i tenint en compte aquelles característiques que poden fer sospitar-lo.

Rendiment de l'estudi genètic en l'hiperparatiroidisme

La **taxa diagnòstica genètica** varia molt en funció de les indicacions de l'estudi genètic, és a dir, dels criteris de sospita d'HPPF, i de la població estudiada. A la Taula 4 s'exposen els principals estudis observacionals publicats de pacients amb hiperparatiroidisme primari i sospita de causa familiar.

A escala europea, els estudis reportats són escassos. A Itàlia s'han publicat dos estudis d'individus amb sospita d'HPPF, un d'ells inclou set famílies (a qui es van estudiar els gens *MEN1*, *CASR*, *CDC73*) i l'altre, quinze famílies (a qui a part d'aquests tres gens també es van analitzar l'*AIP* i el *CDKN1B*). Els dos assajos van detectar una prevalença de variants del 43% i 20%, respectivament (238,253). En contrast, a Finlàndia, de 29 pacients amb característiques de risc d'HPPF, a qui es va estudiar els gens *MEN1*, *CDC73*, *CASR*, *AIP*, i *CDKN1B*, només es va detectar una variant a *MEN1*, així com a França, on van trobar una sola variant al gen *MEN1* d'un total de 21 pacients amb HPP i edat < 40 anys a qui s'havia analitzat aquest únic gen (prevalença del 3% i el 5% respectivament) (248,254). Cal destacar que la prevalença de variants genètiques en població pediàtrica amb HPP va ser força major (52%) en un estudi francès amb 63 infants (255). Alguns grups que han avaluat el gen *CASR* en pacients amb sospita específica d'HHF reporten prevalences variades (del 4 al 60%) (201,209,256). L'estudi més gran realitzat en l'àmbit continental és el de Mariathasan et al. (2019), al Regne Unit. Es va estudiar un panell amb onze gens (*MEN1*, *CDC73*, *CASR*, *CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN2B*, *CDKN2C*, *RET*, *GCM2*, *GNA11* i *AP2S1*) a 121 pacients amb sospita d'HPPF, i es va detectar una prevalença del 16% de variants patogèniques (257).

En població nord-americana s'han reportat quatre estudis de pacients amb sospita d'HPPF a qui se'ls va dur a terme un test genètic avaluant diferents panells de gens. Les prevalences de mutacions detectades mostren molta variabilitat: 60%, 14%, 3% i 9,3% (192,230,234,258). En població japonesa, es reporta un 30% d'estudi genètic positiu en tretze famílies amb sospita d'HPPF a qui s'avaluen els gens *MEN1*, *CASR*, *CDC73* (259). A Rússia es va identificar un 11% de variants patogèniques o LP en alguns dels gens estudiats mitjançant un panell complet en població jove amb HPP (260). Al continent oceànic destaca un estudi amb 22 individus amb fenotip de FIHP de qui es van estudiar els gens *MEN1*, *CASR*, *CDC73*, i es va trobar un 41% de variants significatives (261).

Per últim, dos estudis retrospectius que engloben pacients amb sospita d'HPPF a qui se'ls havia fet estudi genètic (amb metodologies variades), reporten prevalences del 15 i del 26% de variants LP o patogèniques en algun dels gens estudiats (212).

Globalment, observem com la prevalença de detecció de mutacions en algun dels gens estudiats és molt variable en els diferents estudis (de 3 a 60%). Cal remarcar l'heterogeneïtat marcada entre les diferents investigacions, que avaluen poblacions de diferents àrees geogràfiques, amb característiques de risc d'HPPF diferents i amb mètodes d'estudi genètic molt variables (des d'estudis de gens individuals a panells de gens complets). També s'ha de tenir present que la majoria d'estudis tenen una mostra petita, cosa que fa difícil poder extrapol·lar els resultats a escala general. En el moment de dissenyar el nostre estudi, no hi havia constància d'estudis fets en població espanyola que avaluessin alteracions genètiques en gens relacionats amb l'HPPF ni la seva taxa diagnòstica, i molt pocs dels estudis publicats eren en població de l'àrea mediterrània (vegeu la Taula 4).

Taula 4: estudis publicats fins ara de tests genètics realitzats en pacients amb hiperparatiroidisme primari amb sospita de causa familiar. EUA: Estats Units d'Amèrica.

Estudi	País	Població estudiada	Gens analitzats	Taxa diagnòstica genètica
Simonds et al. (2002) (192)	EUA	36 famílies (106 individus) amb sospita de FIHP	<i>MEN1</i> , <i>CASR</i>	5/36 (14%) variants a <i>CASR</i>
Simonds et al. (2004) (230)	EUA	32 famílies (83 individus) amb sospita de FIHP	<i>MEN1</i> , <i>CASR</i> , <i>CDC73</i>	1/32 (3%) variant a <i>CDC73</i>
Cetani et al. (2006) (253)	Itàlia	Set famílies amb sospita de FIHP (exclusos si fenotip d'HPPF sindròmic)	<i>MEN1</i> , <i>CASR</i> , <i>CDC73</i>	3/7 (43%) variants en <i>MEN1</i>
Mizusawa et al. (2006) (259)	Japó	Tretze famílies amb sospita de FIHP o HPT-JT	<i>MEN1</i> , <i>CASR</i> , <i>CDC73</i>	4/13 (30%) (tres variants a <i>CDC73</i> i una a <i>MEN1</i>)
Vierimaa et al. (2009) (254)	Finlàndia	29 pacients amb sospita d'HPPF	<i>MEN1</i> , <i>CDC73</i> , <i>CASR</i> , <i>AIP</i> i <i>CDKN1B</i>	1/29 (3%) variant a <i>MEN1</i>
Skandarajah et al. (2010) (248)	França	21 pacients amb HPP operats i edat < 40 anys	<i>MEN1</i>	1/21 (5%)
Starker et al. (2012) (258)	EUA/ Suècia	86 pacients amb sospita d'HPPF	<i>MEN1</i> , <i>CASR</i> , <i>CDC73</i>	8/86 (9.3%) variants (quatre a <i>MEN1</i> , tres a <i>CASR</i> , i una a <i>CDC73</i>)
de Sousa et al. (2022) (212)	Austràlia	62 pacients amb sospita d'HPPF (estudi retrospectiu)	<i>MEN1</i> , <i>CDC73</i> , <i>RET</i> , <i>CDKN1B</i> i <i>GCM2</i> (si sospita d'HPPF sindròmic) o <i>CASR</i> , <i>GNA11</i> , <i>AP2S1</i> (si sospita d'HHF)	9/62 (15%) variants LP o P: cinc a <i>CASR</i> , dues a <i>MEN1</i> , una a <i>CDC73</i> i una a <i>GCM2</i>
de Sousa et al. (2022) (212)	Nova Zelanda	68 pacients amb sospita d'HPPF (estudi retrospectiu)	<i>MEN1</i> , <i>CDC73</i> , <i>CDKN1A</i> , <i>CDKN1B</i> , <i>CDKN2B</i> , <i>CDKN2C</i> , <i>RET</i> , <i>CASR</i> , <i>GNA11</i>	18/68 (26%) LP o P: deu a <i>MEN1</i> i vuit a <i>CASR</i>

			(no tots avaluats en tots els pacients)	
Mariathasan et al. (2019) (257)	Regne Unit	121 pacients amb sospita d'HPPF	<i>MEN1, CDC73, CASR, CDKN1A, CDKN1B, CDKN2B, CDKN2C, RET, GCM2, GNA11, AP2S1</i>	19/121 (16%): variants P (onze a <i>CASR</i> , sis a <i>MEN1</i> , una a <i>CDC73</i> i una a <i>AP2S1</i>)
el Lakis et al. (2018) (234)	EUA	205 pacients amb AF d'HPP	<i>MEN1, RET, CDC73, GCM2, CASR</i>	123/205 (60%) variants: 91 a <i>MEN1</i> , catorze a <i>CDC73</i> i divuit a <i>GCM2</i>
Warner et al. (2004) (261)	Austràlia	22 individus amb fenotip de FIHP	<i>MEN1, CASR, CDC73</i>	9/22 (41%) variants: cinc a <i>MEN1</i> i quatre a <i>CASR</i>
Pardi et al. (2017) (238)	Itàlia	Quinze famílies amb sospita d'HPPF	<i>MEN1, CDKN1B, AIP, CDC73, CASR</i>	3/15 (20%) variants: dues a <i>MEN1</i> i una a <i>CDC73</i>
Mamedova et al. (2017) (260)	Rússia	65 pacients amb HPP diagnosticat en < 40 anys (incloent deu casos de <i>MEN1</i> coneguts)	<i>MEN1, CASR, CDC73, CDKN1A, CDKN1B, CDKN1C, CDKN2A, CDKN2C, CDKN2D</i> (panell realitzat als 55 pacients restants)	6/55 (11%) variants LP o P: quatre a <i>CDC73</i> , una a <i>CASR</i> i una a <i>MEN1</i>
el Allali et al. (2021) (255)	França	Estudi retrospectiu amb 63 infants amb HPP	<i>MEN1, CDC73, CASR, CDKN1B, RET, AP2S1</i>	33/63 (52%) variants: quatre a <i>MEN1</i> , cinc a <i>CDC73</i> , una a <i>CDKN1B</i> , una a <i>RET</i> , divuit a <i>CASR</i> , tres a <i>AP2S1</i> i una a <i>SLC12A1</i>
Coppin et al. (2019) (233)	França	713 pacients amb HPP	<i>GCM2</i>	47/713 (6,6%) variants LP o P
García-Castaño et al. (2019) (256)	Espanya	82 famílies amb sospita d'HHF	<i>CASR</i>	26/82 (31%) mutacions inactivadores
Szalat et al. (2017) (201)	Israel	Deu pacients amb sospita d'HHF	<i>CASR</i> , [(<i>AP2S1</i> i <i>GNA11</i>) si <i>CASR</i> negatiu]	6/10 (60%) variants: quatre a <i>CASR</i> i dues a <i>AP2S1</i>
Frank-Raue et al. (2011) (209)	Alemanya	139 pacients amb HPP	<i>CASR</i>	6/139 (4%) variants

2. HIPÒTESI

El cribratge sistemàtic de mutacions en línia germinal de gens associats a l'hiperparatiroidisme en individus amb un fenotip de risc pot donar informació essencial per a un maneig clínic més adient tant de pacients com de possibles familiars afectats. Aquest cribratge pot ser d'utilitat en una població de l'àrea mediterrània de pacients amb hiperparatiroidisme amb característiques de risc que puguin associar un origen hereditari de la malaltia. La taxa diagnòstica genètica d'un panell de gens pot ser rellevant, tenint en compte estudis similars que s'han realitzat fins ara en diferents zones geogràfiques. El coneixement de les variants més prevalents i la caracterització clínica dels subjectes afectats de cada mutació permetrà establir una estratègia racional d'estudi genètic a la pràctica clínica habitual al nostre medi.

3. OBJECTIUS

3.1 Objectiu principal

Seleccionar un panell de gens associats a l'hiperparatiroidisme familiar, optimitzat a partir d'una revisió exhaustiva de la literatura mèdica, per a realitzar un estudi genètic mitjançant la tecnologia *Next Generation Sequencing* a una cohort d'individus amb hiperparatiroidisme i fenotip de risc. Determinar la prevalença de pacients amb hiperparatiroidisme primari i característiques de risc que presenten mutacions en línia germinal en algun dels gens inclosos al panell.

3.2 Objectius secundaris

- Caracteritzar els pacients portadors de variants i convidar els seus familiars de primer grau per a una valoració clínica i genètica, per tal de definir una estratègia racional de cribratge genètic aplicable a la pràctica clínica rutinària en el nostre medi.
- Comparar l'afectació de la malaltia (grau d'hipercalcèmia, afectació renal, afectació òssia, etc.) en subjectes portadors de variants genètiques en línia germinal respecte a aquells que presentin estudi genètic negatiu.

4. COMPENDI DE PUBLICACIONS

4.1 Primera publicació

I. Mazarico-Altisent, I. Capel, N. Baena, M. R. Bella-Cueto, S. Barcons, X. Guirao, L. Albert, A. Cano, R. Pareja, A. Caixàs, M. Rigla. **Novel germline variants of *CDKN1B* and *CDKN2C* identified during screening for familial primary hyperparathyroidism.** *J Endocrinol Invest* (2022) 46(4):829–40. doi: 10.1007/s40618-022-01948-7



Novel germline variants of *CDKN1B* and *CDKN2C* identified during screening for familial primary hyperparathyroidism

I. Mazarico-Altisent¹ · I. Capel¹ · N. Baena² · M. R. Bella-Cueto³ · S. Barcons⁴ · X. Guirao⁴ · L. Albert¹ · A. Cano¹ · R. Pareja¹ · A. Caixàs¹ · M. Rigla¹

Received: 18 March 2022 / Accepted: 22 October 2022
© The Author(s) 2022

Abstract

Purpose *CDKN1B* mutations were established as a cause of multiple endocrine neoplasia 4 (MEN4) syndrome in patients with MEN1 phenotype without a mutation in the *MEN1* gene. In addition, variants in other cyclin-dependent kinase inhibitors (*CDKIs*) were found in some MEN1-like cases without the *MEN1* mutation. We aimed to describe novel germline mutations of these genes in patients with primary hyperparathyroidism (PHPT).

Methods During genetic screening for familial hyperparathyroidism, three novel *CDKIs* germline mutations in three unrelated cases between January 2019 and November 2021 were identified. In this report, we describe clinical features, DNA sequence analysis, and familial segregation studies based on these patients and their relatives. Genome-wide DNA study of loss of heterozygosity (LOH), copy number variation (CNV), and p27/kip immunohistochemistry was performed on tumour samples.

Results DNA screening was performed for atypical parathyroid adenomas in cases 1 and 2 and for cystic parathyroid adenoma and young age at diagnosis of PHPT in case 3. Genetic analysis identified likely pathogenic variants of *CDKN1B* in cases 1 and 2 and a variant of the uncertain significance of *CDKN2C*, with uniparental disomy in the tumour sample, in case 3. Neoplasm screening of probands showed other non-endocrine tumours in case 1 (colon adenoma with dysplasia and atypical lipomas) and case 2 (aberrant T-cell population) and a non-functional pituitary adenoma in case 3.

Conclusion Germline mutations in *CDKIs* should be included in gene panels for genetic testing of primary hyperparathyroidism. New germline variants here described can be added to the current knowledge.

Keywords Parathyroid · Primary hyperparathyroidism · Multiple endocrine neoplasia type 1 · Multiple endocrine neoplasia type 4 · Cyclin dependent kinase inhibitors

Introduction

Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) is a syndrome characterized by the pituitary, parathyroid and enteropancreatic neuroendocrine tumours (NETs). Primary

hyperparathyroidism (PHPT) affects 95% of MEN1 patients and is its most common clinical feature [1, 2]. This syndrome is caused by loss-of-function variants of the *MEN1* tumour-suppressor gene (11q13), which encodes menin, a protein responsible for genome stability, transcription,

✉ I. Mazarico-Altisent
isamazarico@gmail.com

¹ Endocrinology and Nutrition Department, Parc Taulí University Hospital, Institut d'Investigació i Innovació Parc Taulí (I3PT), Medicine Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Parc Taulí 1, 08208 Sabadell, Barcelona, Spain

² Genetic Department, Parc Taulí University Hospital, Institut d'Investigació i Innovació Parc Taulí (I3PT), Medicine Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Parc Taulí 1, 08208 Sabadell, Barcelona, Spain

³ Pathology Department, Parc Taulí University Hospital, Institut d'Investigació i Innovació Parc Taulí (I3PT), Medicine Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Parc Taulí 1, 08208 Sabadell, Barcelona, Spain

⁴ Surgery Department, Parc Taulí University Hospital, Institut d'Investigació i Innovació Parc Taulí (I3PT), Medicine Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Parc Taulí 1, 08208 Sabadell, Barcelona, Spain

and cell division [3–6]. Germline mutations of *MEN1* gene have been found in around 85% to 90% of clinically suspected MEN1 patients [7]. Thus, in a meaningful number of patients with MEN1-like phenotype, around 10%, germinal *MEN1* mutations are not detected [4, 8–10]. This lack of detection could possibly be explained by genetic abnormalities in non-coding regions or whole-gene deletion of *MEN1*, however, large deletions of *MEN1* appear to be uncommon [5, 11–14]. Therefore, other predisposing genes, such as cyclin-dependent kinase inhibitors (*CDKIs*), have been suggested by different authors to play a role in patients with MEN1-like phenotype without the *MEN1* mutation [12, 15, 16] since it is known that menin affects gene transcription of some cell cycle regulators, such as *CDKN1B/p27* and *CDKN2C/p18* [17]. In particular, *CDKN1B* germline pathogenic variants have been reported in some patients with MEN1-like phenotype without a *MEN1* gene mutation, a condition termed MEN4 syndrome (OMIM 610755) [12, 14, 18–20].

PHPT is the most common clinical feature of both MEN1 and MEN4 syndromes. It is known that 10% of cases of PHPT are hereditary due to germline mutations of different genes, a condition called familial PHPT (FHPT) [1]. FHPT involves syndromic forms, such as multiple endocrine neoplasia types 1 to 4 and hyperparathyroidism-jaw tumour syndrome. Besides, FHPT may present as non-syndromic PHPT, which includes familial hypercalcemia hypocalciuric forms, neonatal severe hyperparathyroidism, and others, that are associated with several genes and are all classified as familial isolated hyperparathyroidism [21]. Until now, a consensual systematized genetic diagnosis for FHPT has not been implemented due to a lack of firm evidence about which individuals have to be tested and which mutations should be determined. Even so, most authors agree on the recommendation of testing for germline mutations in individuals with PHPT plus some specific situations: (1) PHPT occurring before the age of 45 years, (2) recurrent or persistent PHPT, (3) multi-gland disease (MGD), (4) atypical parathyroid adenoma (APA), (5) parathyroid carcinoma, (6) existence of other tumours related to syndromic PHPT, and/or (7) being a first-degree relative of a known mutation carrier or having a first-degree relative with PHPT [22, 23]. Germline mutation testing for possible FHPT may include *MEN1*, *CASR*, *CDC73*, *CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN2B*, *CDKN2C*, *RET*, *PTH*, *GNA11*, *AP2S1*, *GCM2*, and *AIP* genes according to recent data [1, 23, 24].

Minimal information concerning MEN1-like patients due to *CDKIs* germline mutations have been reported to date, and this lack of reporting suggests that this type of FHPT probably remains underdiagnosed. This report describes three individuals with a history of PHPT who were evaluated based on a suspicion of FHPT and carried novel germline variants of *CDKIs* genes.

Material and methods

Phenotype

We re-evaluated data from three patients with a history of PHPT in whom we performed genetic screening for suspicion of FHPT. Clinical information about probands and their first-degree relatives (including clinical features, biochemical results, and radiological findings) was obtained from medical records and routine visits in our hospital (Endocrinology and Nutrition Department). Table 1 presents the clinical findings.

Gene panel sequencing and variant interpretation

DNA was extracted from blood and other tissues samples using the Gentra Puregene DNA reagent (Qiagen, Valencia, CA). The customized gene panel of FHPT screening in our centre includes sequence analysis and copy number variation (CNV) analysis of the following genes: *AIP*, *AIRE*, *AP2S1*, *CASR*, *CDC73*, *CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN2B*, *CDKN2C*, *GCM2*, *GNA11*, *MEN1*, *PTH*, *RET*, and *TRPV6*.

In the analysis, the mean sequencing depth was > 150 times, and > 99% of target nucleotides were covered with > 20× sequencing depth for all assays. The target nucleotides included all protein-coding exons of the genes on the panels in addition to 20 base pairs (bp) inside each intron/exon boundary. The panel was also customized by adding oligonucleotides that targeted deep intronic variants (≥ 20 bp from the intron/exon boundary) and non-coding variants (promoter region, 5' or 3' untranslated regions [UTR]), which have been reported as disease causing in association with hyperparathyroidism. Sequence reads of each sample were mapped to the human reference genome (GRCh37/hg19). Burrows–Wheeler Aligner (BWA–MEM) software was used for reading alignment. Duplicate read marking, local realignment around indels, base quality score recalibration, and variant calling were performed using genomic analysis toolkit (GATK) algorithms (Sentieon) for nDNA. Variant data were annotated using a collection of tools (VcfAnno and VEP) with a variety of public variant databases, including but not limited to Genome Aggregation Database control population cohorts (gnomAD), ClinVar, and Human Gene Mutation Database (HGMD). Duplicate read marking, local realignment around indels, base quality score recalibration and variant calling were performed using GATK algorithms [25].

The sequence variant analysis pipeline was validated in a Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA)

Table 1 Clinical characteristics of patients

	Mutation	LOH/UPD	PHPT history			Screening of related tumors after genetic diagnosis			Additional Medical History of Endocrine or Cancer Disorders (or remarkable)
			Ca max (mmol/L)	PTH max (pmol/L)	Histology diagnosis	Pituitary MRI	CT thorax and abdomen	Abnormal lab tests	
Case 1	<i>CDKN1B</i> c.280_281delinsG, p.(Pro94Alafs*25)	No	3.39	4,950	APA	Lack of neurohypophyseal bright signal	Enlarged right adrenal gland Bilateral renal cysts	CgA: 493.9 µg/L	Colon tubulovillous adenoma with low-grade dysplasia Atypical lipomas Obesity T2DM Primary hypothyroidism
Case 2	<i>CDKN1B</i> c.169C>T, p.(Gln57*)	No	3.37	33,963	MGD: 3 glands parathyroid hyperplasia and 1 APA	Normal	No tumours	CgA: 1,947.1 µg/L Gastrin: 132.6 pmol/L Prl: 6,127.2 pmol/L FSH: 106 UI/L LH: 79.4 UI/L T(t): 4.23 nmol/L T(f): 0.01 nmol/L IGF1: 5.85 nmol/L	Subclinical hypothyroidism Obesity Aberrant T-cell population Chronic idiopathic axonal polyneuropathy
Case 3	<i>CDKN2C</i> c.319T>G, p.(Leu107Val)	Yes	2.84	846	MGD: 1 cystic adenoma and 1 parathyroid adenoma	Nonfunctioning cystic microadenoma	No tumours	CgA 110.3 µg/L Prl 1,358.6 pmol/L UFC 225.5 pg/24 h	Uterine leiomyomas Bilateral ovarian cysts

LOH: loss of heterozygosity; UPD: uniparental disomy; RV: reference value; Ca max: higher blood calcium levels before parathyroid surgery (RV: 2.1–2.55); PTH max: serum higher parathyroid hormone before parathyroid surgery (RV: 95–618); APA: atypical parathyroid adenoma; MGD: multiglandular disease; CgA: chromogranin A (RV < 100); T2DM: type 2 diabetes mellitus; Prl: Prolactin (RV 212.6–1,034.5); Gastrin RV 6.2–54.8; UFC: Urinary free cortisol (RV 36–137); FSH: follicle-stimulating hormone (RV: 1.5–12.4); LH: luteinizing hormone (RV: 1.7–8.6); T(t): total testosterone (RV: 6.69–25.6); T(f): free testosterone (RV: 0.02–0.08); IGF1: insulin-like growth factor 1 (RV: 7.54–26.52); MRI: magnetic resonance imaging; CT: computed tomography

and College of American Pathologists (CAP) accredited Blueprint Genetics diagnostic laboratory. The series of selected quality criteria included a variant call quality score, variant genomic location, sequence content, and integrative genomics viewer visual analysis. This algorithm was established based on the outcome of an internal validation performed in the CLIA and CAP-accredited Blueprint Genetics diagnostic laboratory.

CNV analysis was performed bioinformatically from next-generation sequencing (NGS) data using a bioinformatic pipeline; one component is a CNV kit and another one involves in-house developed proprietary technology.

CNVs were confirmed using digital polymerase chain reaction (PCR). The CNV analysis pipeline was validated in the CLIA and CAP-accredited Blueprint Genetics diagnostic laboratory.

Sanger sequencing of the candidate variants was performed on the patient and the family member samples to confirm the presence of the variant and the pattern of inheritance. Variants were classified following the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology (ACMG/AMP) guidelines [26].

Study of loss of heterozygosity (LOH) and CNV in tumour

Tumour tissue samples from formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) were used for this analysis. DNA of tumour samples from patients who had undergone parathyroidectomy was extracted using Qiagen DNA extraction kit (QIAGEN, Valencia CA). Genome-wide DNA study of LOH and CNV was performed using OncoScan CNV Assay (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA). This assay is designed to cover the entire genome with higher resolution in well-known cancer drivers (900 cancer genes). Data analysis was done using the software Chromosome Analysis Suite 4.3 (ChAS 4.3) for CNV and LOH detection.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical study with antip27/kip1 antibody (clone SX53G8, Ventana) was performed on slides obtained from formalin-fixed paraffin-embedded parathyroidectomy tissues using the Ventana Benchmark immunostaining system (Ventana Medical System, Tucson, USA). Endothelial cells were used as positive controls. Immunohistochemistry for p18 was not performed due to the lack of a commercially available monoclonal antip18 antibody.

Results

Case 1

Medical history and clinical presentation

A 47-year-old man was referred to our department for a cervical node. In his personal history, he presented obesity, primary hypothyroidism, and obstructive sleep apnoea syndrome. In addition, he had undergone surgery for two atypical lipomas and had an endoscopic polypectomy of a tubule-villous adenoma with low-grade dysplasia. He had no family history of parathyroid disorders.

On examination, he had no obvious neck masses or goiter. A neck ultrasound scan (US) showed a homogeneously hypoechoic nodule of 3 cm posterior to the thyroid gland, suggesting a parathyroid lesion. Blood tests revealed severe hypercalcemia (3.39 mmol/L; reference value [RV] 2.1–2.55), hypophosphatemia (0.58 mmol/L, RV 0.87–1.45), and elevated parathyroid hormone (PTH) levels (4950 pmol/L, RV 95–618), consistent with PHPT (Table 1). No clinical history of fractures or nephrolithiasis was present. Treatment was initiated with cinacalcet and oral hydration, and he underwent surgical removal of a solitary abnormal parathyroid gland at the age of 48. Intraoperative PTH (ioPTH) monitoring confirmed the excision

of the adenoma as the PTH dropped from 4950 pmol/L (pre-excision) to 618 pmol/L (30' after excision). Histological study evidenced a nodule (size: 4.5 × 3.5 × 2.5 cm; weigh: 15.9 g) with histopathological characteristics consistent with an atypical parathyroid adenoma (APA), such as fibrous bands associated with haemosiderin deposition and mitotic activity (2 mitotic events/10 high-power fields). Proliferation index (Ki67) was 3%.

After surgery, serum calcium nadir was 2.2 mmol/L, and during the next 10 years, it oscillated between 2.07 and 2.56 mmol/L. Ionic serum calcium remained within normal limits until now.

Given the atypical features of adenoma, genetic testing was performed. Sequence analysis using the panel described above identified a heterozygous *frameshift* likely pathogenic variant in *CDKN1B* (NM 004064.4) c.280_281delinsG, p.(Pro94Alafs*25).

Germline genetic analysis and LOH/CNV study in tumour

This variant deletes two base pairs, inserts one base pair in exon 1 (of three total exons) and generates a *frameshift*, leading to a premature stop codon at position 25 in a new reading frame. This setup is predicted to lead to loss of normal protein function, either through protein truncation or nonsense-mediated mRNA decay. This variant is absent in the gnomAD. To our knowledge, this variant has not been described in the medical literature or reported in disease-related variation databases, such as ClinVar or HGMD. Loss of *CDKN1B* function is an established disease mechanism, and other truncating variants in the gene have been described in patients with phenotypes consistent with *CDKN1B*-related disease, which is inherited in an autosomal dominant (AD) manner. This *CDKN1B* variant is classified as likely pathogenic based on the established association between the gene and the patient's phenotype, the variant's absence in control populations, and the variant type (*frameshift*). The genetic analysis of tumour DNA did not show LOH or CNV.

p27/kip1 immunohistochemistry

Immunohistochemical analysis of the excised parathyroid adenoma demonstrated loss of nuclear expression of p27/kip1 in neoplastic cells. This result is consistent with a lower expression of the tumour suppressor protein due to the described pathogenic variant (Fig. 1a).

Clinical evolution after the genetic result

Specific guidelines for MEN4 management are lacking as few cases have been reported until now, however, most authors recommend following MEN1 guidelines in these cases [7, 27]. Thus, we performed a complete radiological

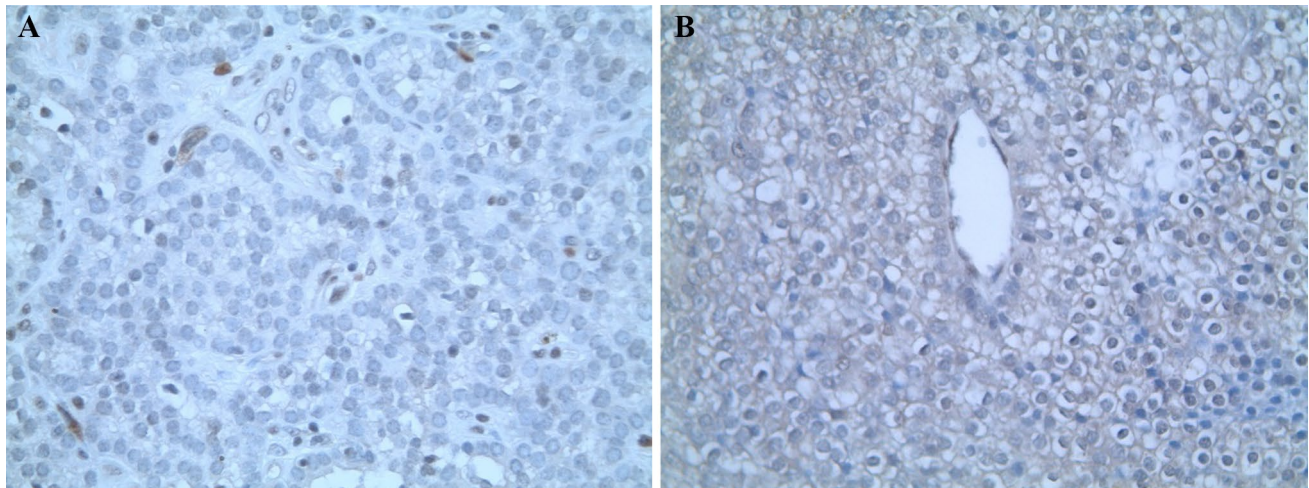


Fig. 1 Immunostaining with p27/kip1 of parathyroid adenomas from cases 1 (a) and 2 (b). Absence of nuclear expression in adenoma cells. $\times 400$

and serological study (Table 1). Lab tests did not show alterations in pituitary hormones, and pituitary magnetic resonance imaging (MRI) manifested a lack of a neurohypophyseal bright signal, which was attributed to a normal physiological occurrence in the absence of any clinical suspicion [28]. A computed tomography (CT) of the chest and abdomen indicated enlarged right adrenal gland and bilateral renal cysts without clinical significance. Urinary free cortisol was normal. Screening for asymptomatic NETs showed a non-specific mild elevated chromogranin A ([CgA] 493.9 $\mu\text{g/L}$, RV < 100) that has almost normalized over time.

Family screening after genetic results

A complete family history was taken after the genetic diagnosis was obtained. No first-degree relatives were still alive. Even so, we were able to analyse a DNA sample from a surgical specimen from the mother (I.2, Fig. 2a), who had died years before from a colon neoplasia. In addition, she presented hypercalcemia on some occasions, which had not been evaluated. She carried the same variant in the *CDKN1B* gene as her son.

Case 2

Medical history and clinical presentation

We report a case of a 57-year-old man with a history of chronic kidney disease (CKD) due to interstitial nephropathy diagnosed at the age of 28, which progressed to end-stage renal disease (ESRD) and was treated with haemodialysis since he was 43. As additional significant medical history, he was diagnosed with chronic idiopathic axonal polyneuropathy, aberrant T-cell population at the age of 46,

obesity, and subclinical hypothyroidism. As the only family history of interest, his mother had had renal colic. He was diagnosed with tertiary hyperparathyroidism six years after presenting with CKD. Lab tests showed corrected calcium of 3.37 mmol/L and PTH of 33,963 pmol/L. A bone mineral density (BMD) scan was not obtained. He had a previous history of symptomatic kidney stones and complicated urinary infections. Thus, the possibility of having a PHPT prior to CKD could not be excluded. Neck US revealed a hypoechoic nodule (1.3 cm in size) posterior to the thyroid gland. Conversely, scintigraphy study with technetium 99 m sestamibi (TcMIBI) did not show high radiotracer uptake. Treatment with cinacalcet was initiated but yielded a poor response, so he finally underwent bilateral neck exploration and total parathyroidectomy without autotransplantation. Histology diagnosis showed MGD due to three hyperplastic parathyroid glands plus one APA (1.7 g weight).

Post-operatively, lab tests showed a nadir PTH of 561 pmol/L and nadir serum-corrected calcium level of 1.75 mmol/L, suggesting post-surgical hypoparathyroidism. Treatment with calcium supplements and calcitriol was initiated, and normal serum levels were recovered.

Considering his young age at diagnosis and the identification of APA and MGD with three hyperplastic parathyroid glands, a screening test of the most likely genetic causes of FHPT was performed. Sequence analysis of DNA obtained from blood identified a heterozygous nonsense variant of *CDKN1B* c.169C>T, p.(Gln57*) (NM 004064.4).

Germline genetic analysis and LOH/CNV study in tumour

This *CDKN1B* variant is classified as likely pathogenic based on the established association between the gene, patient's phenotype, variant's absence in control populations and type

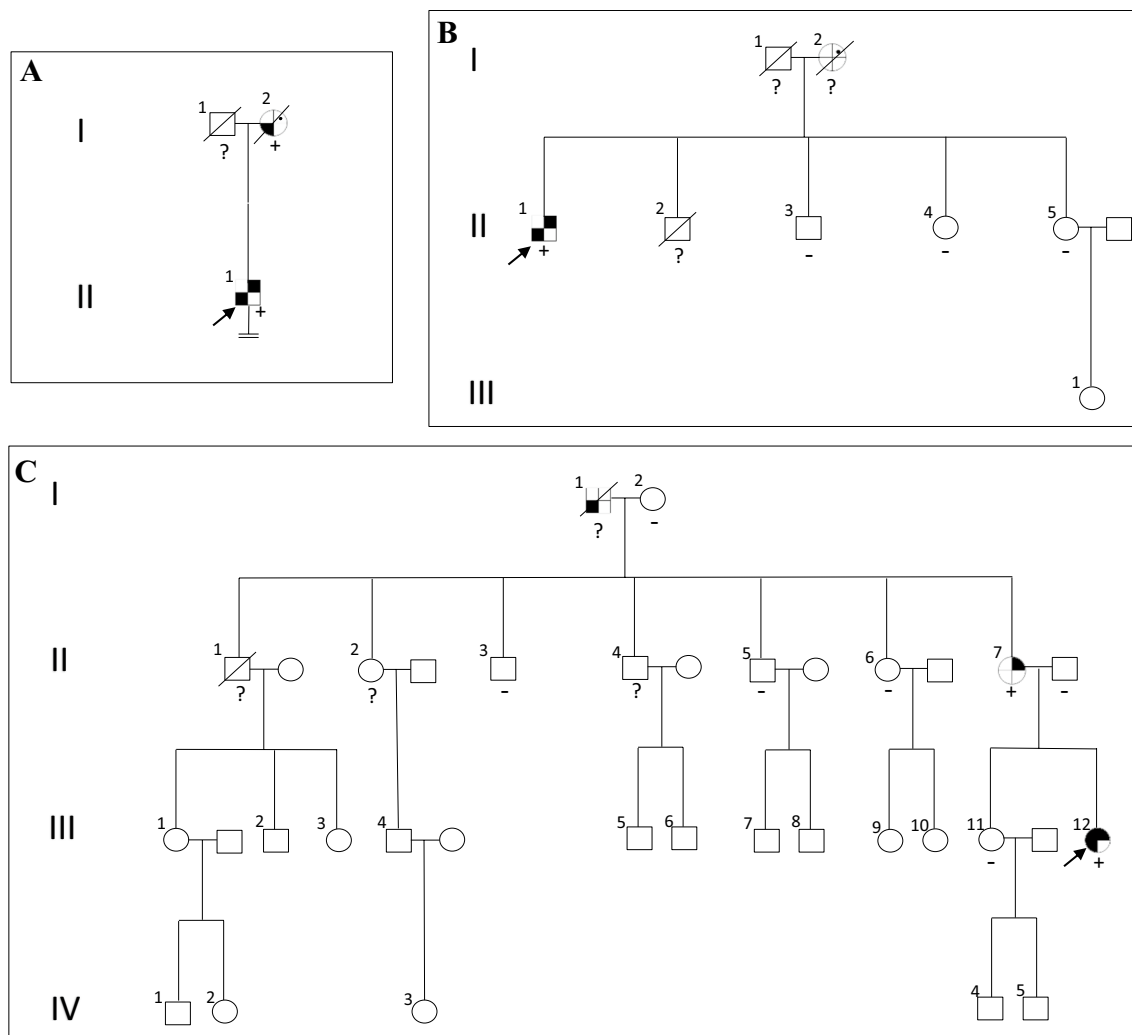


Fig. 2 Pedigree and tumors of probands (with confirmed mutation) and their relatives. **a** Case 1, variant c.280_281delinsG, p.(Pro94Alafs*25) CDKN1B; **b** case 2, variant c.169C>T, p.(Gln57*) CDKN1B; **c** case 3, variant c.319 T>G, p.(Leu107Val) CDKN2C. Generation number is indicated with roman numerals. Arrows indicate index case; circle, female; square, male; double line below descent line, no offspring; empty symbol, unaffected family

member; slashed symbol, deceased; +, mutation positive; −, mutation negative; ?, no mutation test performed; filled upper right quadrant, PHPT; filled upper right spot, history of nephrolithiasis, renal colics or hypercalcemia; filled upper left quadrant, pituitary adenoma; filled lower right quadrant, neuroendocrine tumor; filled lower left quadrant, tumor unspecified

of variant (nonsense). It generates a premature stop codon in exon 1 (of 3 exons) and is predicted to produce a loss of normal protein function, either through protein truncation or nonsense-mediated mRNA decay. This variant was detected in 48% (132 out of 276) NGS reads. As the patient had an aberrant T-cell population, and some pathogenic *CDKN1B* variants have been associated with hematologic malignancy, the identified variant could represent either a germline or somatic variant. Therefore, we performed genetic analyses on other tissues (colon, thyroid, and saliva) [29, 30], and found that all of them showed the presence of this variant; thus, we concluded that c.169C>T was a germline variant. This variant has been reported several times in the Catalogue

Of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC) in more tissues (skin, breast, prostate, haematopoietic, and lymphoid tissues). These data strongly support the pathogenicity of this variant. This variant is absent in gnomAD and, according to our knowledge, it has not been described as a germline variant in the literature or reported in disease-related variation databases. It should be mentioned that although it is a variant that when expressed somatically is associated with a significant risk phenotype, in this case the patient developed a rather mild tumoral phenotype (PHPT due to APA and three hyperplastic parathyroid glands and aberrant T-cell population without clinical affection for the moment). The genetic analysis of tumour DNA did not show LOH or CNV.

p27/kip1 immunohistochemistry

Immunohistochemical analysis of the excised parathyroid glands (three hyperplastic parathyroid glands and one APA) demonstrated loss of staining for p27 in neoplastic cells. This result is consistent with a lower expression of the tumour suppressor protein due to the described pathogenic variant (Fig. 1b).

Clinical evolution after the genetic result

We completed the screening for MEN4-related comorbidities (Table 1). CT scan of the chest and abdomen did not show any abnormalities. Measurement of pancreatic polypeptide (PP) and plasma vasoactive intestinal peptide (VIP) was normal as was a dexamethasone suppression test. Serum CgA (1947.1 µg/L) and serum gastrin (132.6 pmol/L, RV 6.2–54.8) were elevated. Since the proband did not indicate clinical or radiological signs of NETs, these results were attributed to proton pump inhibitor therapy and ESRD [31]. Concerning pituitary hormones, he showed moderated prolactin elevation, hypergonadotropic hypogonadism, and low insulin-like growth factor 1 (IGF1) levels, which could be explained by CKD [32]. Pituitary MRI did not show abnormalities.

Family screening after the genetic result

Family members were referred for genetic counselling. In terms of first-degree alive relatives, he had two living sisters and one brother. All of them had undergone predictive testing, which did not detect the *CDKN1B* c.169C>T p.(Gln57*) variant in tested samples (Fig. 2b). Parental samples were not available.

Case 3

Medical history and clinical presentation

We present a 44-year-old woman that noticed a neck lump when she was 28. She had no significant medical history. No family history of parathyroid known alterations was reported, but it should be noted that her mother had a history of renal colic episodes. Neck US showed an extrathyroidal hypoechoic nodule of 1.1 cm posterior to the right thyroid lobe and a large cystic nodule (3 cm) on the left side. A neck CT scan revealed the same cystic lesion in a left para-traqueal location, measuring a maximum diameter of 3 cm. It remained unclear whether it was of parathyroid or thyroid origin. Scintigraphy using TcMIBI showed avid tracer uptake near the right thyroid lobe, suggesting a single parathyroid lesion. Fine-needle aspiration biopsy of

the cystic nodule showed non-specific cystic content. Lab tests revealed a PHPT pattern with corrected calcium levels of 2.84 mmol/L and PTH of 846 pmol/L. BMD showed normal bone mineralization, and abdominal US excluded renal lithiasis at that moment. Bilateral neck exploration with left cyst excision and right extrathyroidal nodule extraction was performed. The final pathologic diagnosis was MGD due to one parathyroid adenoma (0.1 g weight) and one mainly cystic parathyroid adenoma (3.5 cm diameter, unknown weight due to splitting of the cyst).

After surgery, PTH levels dropped to 409 pmol/L after which she remained asymptomatic and normocalcemic during the post-surgery years. Genetic screening of FHPT forms was performed given the detection of MGD, the existence of a large cystic parathyroid adenoma, and her young age at diagnosis of PHPT. The patient was heterozygous for c.319T>G, p.(Leu107Val) in *CDKN2C* (NM 001262.2).

Germline genetic analysis and LOH/CNV study in tumour

This *CDKN2C* variant was genetically classified as a variant of uncertain significance (VUS) according to the ACMG criteria. This variant affects a conserved amino acid, and it is predicted to be damaging by most in silico tools. Only two missense variants in *CDKN2C* are currently reported in the HGMD: (1) one in association with MEN1 and (2) the other in association with parathyroid adenoma [16, 33]. Agarwal et al. reported a missense germline variant in a family with parathyroid tumours in which a decrease in protein expression as a probable cause of sporadic endocrine tumours was found [16]. The c.319T>G variant in *CDKN2C* has been reported in gnomAD in 9/251,454 alleles with a low allele frequency (3.58×10^{-5}). It should be noted that the gnomAD database excludes individuals known to be affected with the severe paediatric disease in addition to their first-degree relatives [34]. The clinical age-related penetrance in patients with *CDKN2C* variants could be low or limited due to the small number of cases described in the literature. Functional studies would help to a better classification of this variant. Sporadic adenomas have not been extensively investigated for candidate variants in *CDKI* genes and specifically for *CDKN2C*. This gene has been examined in a small sporadic adenomas series and to date, has no known identified variant [34, 35]. In this case, the analysis of LOH and CNV in tumour sample showed a gain of whole chromosome 1 and the genotype for three copies were identical leading to somatic uniparental disomy of chromosome 1 (Fig. 3). The detection of this event may reinforce the pathogenicity of this variant although this result should be viewed with caution.

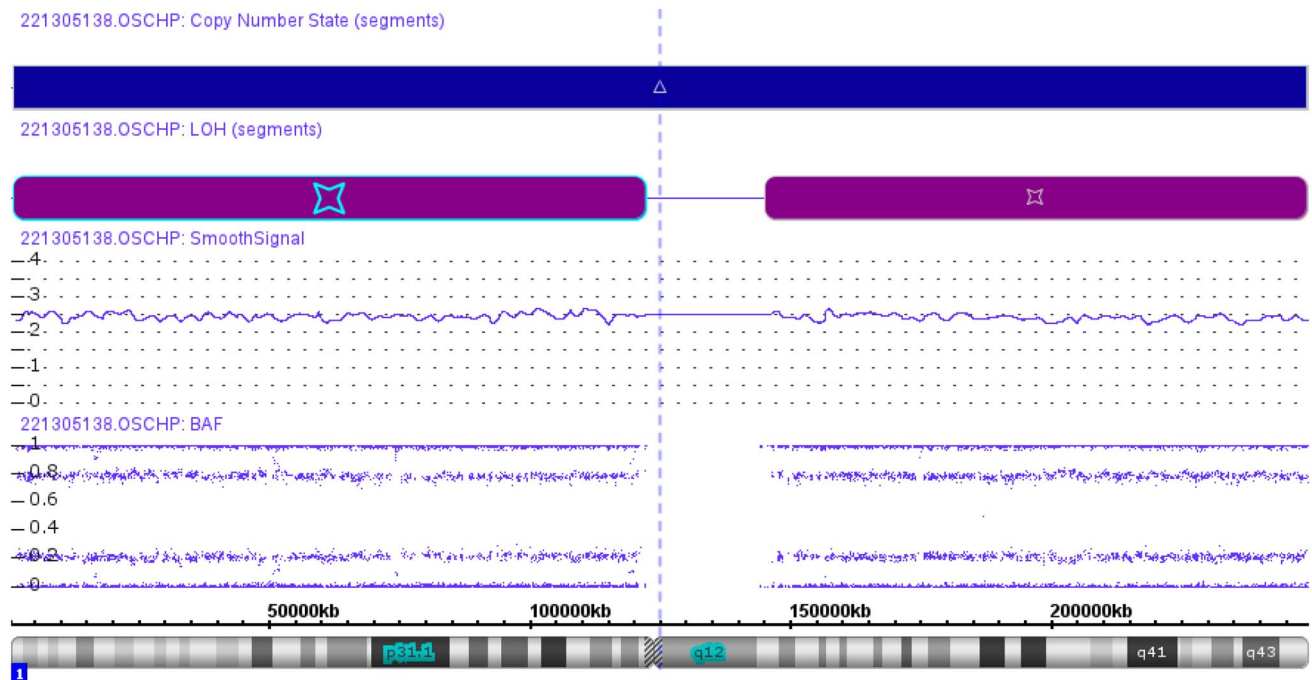


Fig. 3 Genome-wide DNA study of loss of heterozygosity (LOH) and copy number variation (CNV) in case 3. CNV track shows a gain of chromosome 1 and B-allele frequency (BAF) track shows uniparental disomy of whole chromosome 1

Clinical evolution after the genetic result

After finding the *CDKN2C* variant, physical, imaging, and lab exams were performed following MEN1 guidelines (Table 1). Concerning dermatological features, physical examination revealed a preauricular right tag and seborrheic keratosis. A CT scan of the abdomen and chest showed uterine leiomyomas and some ovarian cysts. No adrenal alteration was seen. MRI indicated a nodule (0.6×0.7 cm), suggestive of cystic non-functional pituitary microadenoma, and the only alteration of pituitary lab test was mild elevated prolactin (1358.64 pmol/L, RV 212.6–1034.5) without clinical significance. Urinary free cortisol level was elevated twice (225.5 pg/24 h and 156.9 pg/24 h; RV 36–137), but no clinical features of Cushing syndrome (CS) were detected. In addition, a salivary cortisol and dexamethasone suppression test showed no alterations, so CS diagnosis was not confirmed. Screening for asymptomatic NETs showed only a non-specific mild elevated CgA (110.3 µg/L).

Family screening after the genetic result

First-degree relatives underwent genetic counselling. Proband's mother (II.7, Fig. 2c) carried the variant. She was offered clinical assessment, including biochemical and imaging tests of the pancreas, the pituitary, and the adrenal

glands. Lab tests showed hypercalcemia (2.97 mmol/L) and elevated PTH (2423 pmol/L). US of the neck revealed a hypoechoic nodule (0.5×0.3 cm) posterior to the left thyroid lobe and scintigraphy using TcMIBI showed an increased tracer uptake in the same location, so she was diagnosed with PHPT. Abdominal US confirmed the presence of renal lithiasis. Due to densitometric osteoporosis (lumbar spine 0.637 g/cm² and *T* score −4.69 SD; femoral neck 0.593 g/cm² and *T* score −3.23 SD), alendronate was prescribed. We performed unilateral neck exploration with the removal of a single parathyroid adenoma. PTH levels declined to normal after excision. CT scan of the chest and abdomen did not show abnormalities. Regarding pituitary hormones, lab test showed a low morning serum cortisol level (5.04 µg/dL; RV 6.02–18.4) with low adrenocorticotropin hormone level (4.2 pg/mL; RV 7.2–63.3), pattern suggesting secondary adrenal insufficiency. We performed a 250 µg cosyntropin stimulation test, which showed normal post-stimulation cortisol levels: (1) 30 min – 26.9 µg/dL and (2) 60 min 31.9 µg/dL (RV > 14 µg/dL). No other lab pituitary hormone alterations or radiological abnormalities of the gland were detected.

Other family members (proband's father, sister, grandmother, and great uncles) did not present the variant and showed normal phospho-calcium metabolism lab tests (Fig. 2c).

Discussion

We report three novel *CDKIs* germline variants in three different patients with PHPT identified during the course of screening for FHPT causes: (1) two likely pathogenic variants of *CDKN1B* gene (cases 1 and 2) and (2) one VUS of *CDKN2C* gene (case 3).

As stated above, *CDKIs* germline mutations have been proposed as a cause of MEN1-like syndromes without *MEN1* mutation. This situation is called MEN4 when a *CDKN1B* germline mutation is found. However, the clinical course of patients affected by mutations in *CDKIs* is still poorly understood since few cases have been reported until now. We reviewed medical literature and genetic databases (ClinVar, HGMD) and found that a few more than 100 cases with MEN4, including 52 different variants of *CDKN1B*, have been reported to date [12, 16, 20, 29, 36–54]. As supplementary material, we added a table with the total number of *CDKIs* pathogenic/likely pathogenic/VUS germline variants thus far reported along with the type of parathyroid lesion or other tumours found (if reported) and pathogenicity level of the variants, which was assessed following the ACMG guidelines [26] (see supplementary material Appendix 1). It should be noted that 34 of these *CDKN1B* variants have been reported from a single submitter as criteria provided and 10/55 are classified as VUS. All these facts support that so very little knowledge about the clinical implications of *CDKIs* pathogenic variants is available to date. In addition, four other variants of *CDKN1B* have been reported in patients with medulloblastoma, paraganglioma, acute lymphoblastic leukaemia and familial colorectal cancer [30, 55–57].

Germline mutations in three other *CDKI* genes (*CDKN2B*, *CDKN2C*, and *CDKN1A*) were found in MEN1-like cases without detectable *MEN1* mutations [16]. Afterall, a reliable prevalence of *CDKIs* mutations in MEN1-like patients or patients with PHPT is difficult to estimate as genetic screening of these genes has not been widely established. We report three novel *CDKIs* germline mutations in three different patients with PHPT. The possibility of including these cases within the term MEN4 or MEN1-like states should be assessed.

MEN4–PHPT affects approximately 80–90% of the reported MEN4 cases to date [7, 53]. This finding is in accordance with MEN1 classical presentation [58]. On the contrary, in most MEN4 cases, the clinical course of PHPT seems to be less severe than in patients with MEN1 syndrome and exhibits a female predominance. Only one case of MEN4 presented recurrent PHPT after subtotal parathyroidectomy [39, 53]. All cases that we reported agree with this as all of them showed remission of PHPT after surgery to date (at least nine years follow-up). However,

moderate to severe hypercalcemia was seen in our three cases in contrast to other cases of PHPT associated with *CDKIs* mutations [53] (Table 1). Considering that most of these patients presented remission after surgery, differing from many MEN1 cases, a minimally invasive parathyroid surgery could be contemplated. Regarding endocrine histology, most of the cases of PHPT-related to *CDKIs* mutations described to date were caused by a single parathyroid adenoma [53], except for a few cases of MGD [16, 39]. To our knowledge, we report for the first time two cases of APA and one case of cystic parathyroid adenoma related to *CDKIs* germline mutations (Table 1).

Regarding pituitary neoplasms, up to now, some cases of these tumours were described in patients with MEN4 (43%) [12, 38, 45, 47, 49, 50, 52, 53]. These findings agree with the estimated prevalence of pituitary tumours in patients with MEN1 (40%). Recently, in a large cohort of 211 patients (mostly paediatric) with Cushing disease, five germline *CDKN1B* variants were identified (2.6%) [50]. In addition, three germline *CDKN1B* variants were detected in three paediatric patients with pituitary adenomas, with no other manifestations related to MEN4 [47]. In addition, one case of macroprolactinoma was described in a case with germline *CDKN1A* mutation [16]. Somatotroph, corticotroph, and non-functioning pituitary adenomas have been found to be the most frequent pituitary tumours in MEN4 cases. On the contrary, prolactinomas seem less frequent in MEN4 patients [45, 52]. Non-functioning microadenomas are usual in the general population, and it remains challenging to distinguish between incidentalomas and MEN-related pituitary tumours [53]. In this regard, a non-functioning microadenoma was detected in case 3. The age of onset of pituitary tumours in MEN4 is still unclear due to the few number of cases reported until now.

Concerning NETs, we did not find any radiological image or analytical alteration suggestive of tumour in our cases. That finding fits with the last data about MEN4 cases, which indicates a lower prevalence of NETs than in MEN1 [53].

Other tumours, such as meningiomas, liver haemangiomas, skin tumours, adrenal nodes, colon cancer, breast cancer, and genitourinary neoplasms, have been described in patients with germline mutations of *CDKIs* [12, 16, 20, 36, 38, 53]. We describe a colon adenoma with low-grade dysplasia and atypical lipomas in case 1 and a colon neoplasia in her mother who carried the same variant in *CDKN1B*. In addition, we report a malignant hemopathy (aberrant T-cell population) in a *CDKN1B* carrier (case 2).

In the firsts two cases (cases 1 and 2), genetic analysis of tumour samples showed nor LOH neither CNV for *CDKN1B*, findings that agree with those in the literature. We reviewed recent data of MEN4 published cases describing *CDKN1B* pathogenic variants that have analysed tumour tissue to assess the presence of a possible

LOH. In most of the cases, tumour testing failed to demonstrate a second somatic event in the wildtype allele. Therefore, in contrast to MEN1 syndrome, haploinsufficiency for *CDKN1B* appears to be enough for tumours to occur in MEN4 syndrome [41, 53, 59]. Conversely, in case 3, genetic tumour testing showed uniparental disomy of chromosome 1, including *CDKN2C* gene, which could support a pathogenic role of this variant. Another germline variant of *CDKN2C* with LOH was described in a patient with parathyroid adenoma [33]. In addition, some reports propose the contribution of *CDKN2C* as tumour suppressor gene in different neoplasms [60–63]. However, further studies are required to establish whether *CDKN2C* germline pathogenic variants cause genetic predisposition to FHPT or multiple endocrine neoplasms. In addition, immunohistochemistry testing for p18 (not available in our laboratory) could be of interest in future studies of similar cases to determine the protein expression in tumour tissue.

To summarize, we report two novel likely pathogenic variants of *CDKN1B* gene in patients with suspected familial PHPT. The first one was found in a patient with atypical parathyroid adenoma, atypical lipomas, and a colon tubule-villous adenoma with low-grade dysplasia. His mother, who carried the same variant, died from colon neoplasia and once presented with non-studied hypercalcaemia. The second one found in a patient with PHPT is associated with aberrant T-cell population and other comorbidities, such as obesity, subclinical hypothyroidism, and chronic idiopathic axonal polyneuropathy. In addition, we describe a novel variant in *CDKN2C* gene with uniparental disomy in tumour sample that was classified as uncertain significance in a patient with PHPT and a non-functional pituitary adenoma. Although the case 3 variant was classified as VUS, we would like to highlight its clinical relevance since both the proband and her mother, who carried the same variant, presented PHPT.

As a reflection, we would like to point out that genetic screening of FHPT could be considered in patients with features such as APA or in the presence of other tumours apart from PHPT. Considering all reported cases of MEN1-like patients with *CDK1s* germline mutations with PHPT as the predominant feature, we theorize that patients with mutations in different *CDK1s* apart from *CDKN1B* (such as *CDKN2C*) may be encompassed in the nomenclature of MEN4. However, further studies should be done for a better understanding of this entity, and development of specific guidelines for these patients should be established. New germline variants described in this study can be added to the current knowledge. In conclusion, we can say that germline mutations in *CDK1s* may represent an etiology of FHPT. Therefore, these genes should be included in gene panels for screening this disease.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s40618-022-01948-7>.

Acknowledgements The authors would like to thank the staff of the Endocrinology and Nutrition Department, Pathology Department, Genetic Department, and Surgery Department of our hospital for guidance and suggestions, the Blueprint Genetic laboratory for the clinical support and Elena Aller (Thermo Fisher Scientific) for her help in LOH interpretation.

Funding Open Access Funding provided by Universitat Autònoma de Barcelona. This article did not receive any specific grant from any funding agency in the public, commercial or not-for-profit sector.

Declarations

Conflict of interest The authors declare that there is no conflict of interest that could prejudice the impartiality of the article.

Ethics approval The protocol for the study was approved by the institutional Ethics Committee of Institut d'Investigació i Innovació Parc Taulí I3PT.

Research involving human participants and/or animals All procedures performed were in accordance with the ethical standards of the institution and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments.

Informed consent Written informed consent was obtained from all patients.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

1. Thakker RV (2016) Genetics of parathyroid tumours. *J Intern Med* 280:574–583
2. Trump D, Farren B, Wooding C et al (1996) Clinical studies of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). *Q J Med* 89:653–669. <https://doi.org/10.1093/qjmed/89.9.653>
3. Thakker RV (2010) Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 24:355–370
4. Brandi ML, Gagel RF, Angeli A et al (2001) CONSENSUS guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *JCEM* 86(12):5658–5671. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.12.8070>
5. Lemos MC, Thakker RV (2008) Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): analysis of 1336 mutations reported in the first decade following identification of the gene. *Hum Mutat* 29:22–32. <https://doi.org/10.1002/humu.20605>
6. Marx SJ (2005) Molecular genetics of multiple endocrine neoplasia types 1 and 2. *Nat Rev Cancer* 5:367–375. <https://doi.org/10.1038/nrc1610>

7. Thakker RV, Newey PJ, Walls GV et al (2012) Clinical practice guidelines for multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). *J Clin Endocrinol Metab* 97:2990–3011. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-1230>
8. Namihiro H, Sato M, Matsubara S et al (1999) Mutation MEND gene in a case of familial neoplasia type of germline or somatic multiple. *Endocr J* 46:811–816
9. Pellegata NS (2012) MENX and MEN4. *Clinics* 67:13–18. [https://doi.org/10.6061/clinics/2012\(Sup01\)04](https://doi.org/10.6061/clinics/2012(Sup01)04)
10. Vandeve S, Daly AF, Petrossians P et al (2019) Somatic and germline mutations in the pathogenesis of pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol* 181:R235–R254. <https://doi.org/10.1530/EJE-19-0602>
11. Thakker RV (2014) Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) and type 4 (MEN4). *Mol Cell Endocrinol* 386:2–15
12. Natalia P, Quintanilla-Martinez L, Siggelkow H, Samson E, Bink K, Höfler H, Fend F, Jochen Graw MJA (2006) Germ-line mutations in p27Kip1 cause a multiple endocrine neoplasia syndrome in rats and humans. *Proc Natl Acad Sci* 103:15558–15563. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603877103>
13. Cavaco BM, Domingues R, Bacelar MC et al (2002) Mutational analysis of Portuguese families with multiple endocrine neoplasia type 1 reveals large germline deletions. *Clin Endocrinol (Oxf)* 56:465–473. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2265.2002.01505.x>
14. Owens M, Ellard S, Vaidya B (2008) Analysis of gross deletions in the MEN1 gene in patients with multiple endocrine neoplasia type 1. *Clin Endocrinol (Oxf)* 68:350–354. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2007.03045.x>
15. Lee M, Pellegata NS (2013) Multiple endocrine neoplasia type 4. *Front Horm Res* 41:63–78. <https://doi.org/10.1159/000345670>
16. Agarwal SK, Mateo CM, Marx SJ (2009) Rare germline mutations in cyclin-dependent kinase inhibitor genes in multiple endocrine neoplasia type 1 and related states. *J Clin Endocrinol Metab* 94:1826–1834. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-2083>
17. Scherthaner-Reiter MH, Trivellin G, Stratakis CA (2016) MEN1, MEN4, and carney complex: pathology and molecular genetics. *Neuroendocrinology* 103:18–31. <https://doi.org/10.1159/000371819>
18. Ozawa A, Agarwal SK, Mateo CM et al (2007) The parathyroid/pituitary variant of multiple endocrine neoplasia type 1 usually has causes other than p27Kip1 mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1948–1951. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-2563>
19. Igreja S, Chahal HS, Akker SA et al (2009) Blackwell Publishing Ltd assessment of p27 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) and aryl hydrocarbon receptor-interacting protein (AIP) genes in multiple endocrine neoplasia (MEN1) syndrome patients without any detectable MEN1 gene mutations. *Clin Endocrinol* 70:259–264. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2008.03379.x>
20. Occhi G, Regazzo D, Trivellin G et al (2013) A novel mutation in the upstream open reading frame of the CDKN1B gene causes a MEN4 phenotype. *PLoS Genet*. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003350>
21. Alberto F (2018) Genetics of parathyroids disorders: overview. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 32:781–790
22. Starker LF, Åkerström T, Long WD et al (2012) Frequent germline mutations of the MEN1, CASR, and HRPT2/CDC73 genes in young patients with clinically non-familial primary hyperparathyroidism. *Horm Cancer* 3:44–51. <https://doi.org/10.1007/s12672-011-0100-8>
23. Vierimaa O, Georgitsi M, Lehtonen R et al (2006) Pituitary adenoma predisposition caused by germline mutations in the AIP gene. *Science (80-)* 312:1228–1230. <https://doi.org/10.1126/science.1126100>
24. Mariathasan S, Andrews K, Thompson E et al (2019) Genetic testing for hereditary hyperparathyroidism in a large UK cohort. *Endocr Abstr* 63(OC1):1. <https://doi.org/10.1530/endoabs.63.OC1.1>
25. Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C et al (2013) From fastQ data to high-confidence variant calls: the genome analysis toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinform* 43:11.10.1–11.10.33. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1110s43>
26. Richards S, Aziz N, Bale S et al (2015) Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 17:405–424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
27. McDonnell JE, Gild ML, Clifton-Bligh RJ, Robinson BG (2019) Multiple endocrine neoplasia: an update. *Intern Med J* 49:954–961. <https://doi.org/10.1111/imj.14394>
28. Klyn V, Dekeyser S, Van Eetvelde R et al (2018) Presence of the posterior pituitary bright spot sign on MRI in the general population: a comparison between 1.5 and 3T MRI and between 2D–T1 spin-echo- and 3D–T1 gradient-echo sequences. *Pituitary* 21:379–383. <https://doi.org/10.1007/s11102-018-0885-3>
29. Pappa V, Papageorgiou S, Papageorgiou E et al (2005) A novel p27 gene mutation in a case of unclassified myeloproliferative disorder. *Leuk Res* 29:229–231. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2004.06.007>
30. Takeuchi C, Takeuchi S, Ikezoe T et al (2002) Parathyroid tumor suppressor on 1p: analysis of the p18 cyclin-dependent kinase inhibitor gene as a candidate. *Leukemia* 16:956–958. <https://doi.org/10.1038/sj/leu/2402408>
31. Lundell L, Vieth M, Gibson F et al (2015) Systematic review: the effects of long-term proton pump inhibitor use on serum gastrin levels and gastric histology. *Aliment Pharmacol Ther* 42:649–663. <https://doi.org/10.1111/apt.13324>
32. Meuwese CL, Carrero JJ (2013) Chronic kidney disease and hypothalamic-pituitary axis dysfunction: the chicken or the egg? *Arch Med Res* 44:591–600. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2013.10.009>
33. Costa-Guda J, Soong CP, Parekh VI et al (2013) Germline and somatic mutations in cyclin-dependent kinase inhibitor genes CDKN1A, CDKN2B, and CDKN2C in sporadic parathyroid adenomas. *Horm Cancer* 4:301–307. <https://doi.org/10.1007/s12672-013-0147-9>
34. Tahara H, Smith AP, Gaz RD et al (1997) Parathyroid tumor suppressor on 1p: analysis of the p18 cyclin-dependent kinase inhibitor gene as a candidate. *J Bone Miner Res* 12:1330–1334. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1997.12.9.1330>
35. Tahara H (1996) Loss of chromosome arm 9p DNA and analysis of the ~16 and ~15 Cyclin-dependent kinase inhibitor genes in human parathyroid adenomas*. *JCEM* 81:3663–3667. <https://doi.org/10.32388/zhve0o>
36. Georgitsi M, Raitila A, Karhu A et al (2007) Brief report: germline CDKN1B/p27Kip1 mutation in multiple endocrine neoplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 92:3321–3325. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-2843>
37. Belar O, De La Hoz C, Pérez-Nanclares G et al (2012) Novel mutations in MEN1, CDKN1B and AIP genes in patients with multiple endocrine neoplasia type 1 syndrome in Spain. *Clin Endocrinol (Oxf)* 76:719–724. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2011.04269.x>
38. Molatore S, Marinoni I, Lee M et al (2010) A novel germline CDKN1B mutation causing multiple endocrine tumors: clinical, genetic and functional characterization. *Hum Mutat* 31:1825–1835. <https://doi.org/10.1002/humu.21354>
39. Tonelli F, Giudici F, Giusti F et al (2014) A heterozygous frameshift mutation in exon 1 of cdkn1B gene in a patient affected by MEN4 syndrome. *Eur J Endocrinol*. <https://doi.org/10.1530/EJE-14-0080>
40. Pardi E, Mariotti S, Pellegata NS et al (2015) Functional characterization of a CDKN1B mutation in a Sardinian kindred with

- multiple endocrine neoplasia type 4. *Endocr Connect* 4:1–8. <https://doi.org/10.1530/EC-14-0116>
41. Seabrook A, Wijewardene A, de Sousa S et al (2022) MEN4, the MEN1 mimicker; a case series of 3 phenotypically heterogeneous patients with unique CDKN1B mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 107:2339–2349. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgac162>
 42. Costa-Guda J, Marinoni I, Molatore S et al (2011) Somatic mutation and germline sequence abnormalities in CDKN1B, encoding p27Kip1, in sporadic parathyroid adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 96:E701–E706. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-1338>
 43. Bugalho MJ, Domingues R (2016) Uncommon association of cerebral meningioma, parathyroid adenoma and papillary thyroid carcinoma in a patient harbouring a rare germline variant in the CDKN1B gene. *BMJ Case Rep*. <https://doi.org/10.1136/bcr-2015-213934>
 44. Borsari S, Pardi E, Pellegata NS et al (2017) Loss of p27 expression is associated with MEN1 gene mutations in sporadic parathyroid adenomas. *Endocrine* 55:386–397. <https://doi.org/10.1007/s12020-016-0941-6>
 45. Sambugaro S, Di Ruvo M, Ambrosio MR et al (2015) Early onset acromegaly associated with a novel deletion in CDKN1B 5'UTR region. *Endocrine* 49:58–64. <https://doi.org/10.1007/s12020-015-0540-y>
 46. Malanga D, De Gisi S, Riccardi M et al (2012) Functional characterization of a rare germline mutation in the gene encoding the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 (CDKN1B) in a Spanish patient with multiple endocrine neoplasia-like phenotype. *Eur J Endocrinol* 166:551–560. <https://doi.org/10.1530/EJE-11-0929>
 47. Chasseloup F, Pankratz N, Lane J et al (2020) Germline CDKN1B loss-of-function variants cause pediatric Cushing's disease with or without an MEN4 phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 105:1–23. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa160>
 48. Elston MS, Meyer-rochow GY, Dray M et al (2015) Early onset primary hyperparathyroidism associated with a novel germline mutation in CDKN1B. *Case Rep Endocrinol* 2015:1–4. <https://doi.org/10.1155/2015/510985>
 49. Tichomirowa MA, Lee M, Barlier A et al (2012) Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B(CDKN1B) gene variants in AIP mutation-negative familial isolated pituitary adenoma kindreds. *Endocr Relat Cancer* 19:233–241. <https://doi.org/10.1530/ERC-11-0362>
 50. de LaPiscina IM, Najera NP, Rica I et al (2021) Clinical and genetic characteristics in patients under 30 years with sporadic pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol* 185:485–496. <https://doi.org/10.1530/EJE-21-0075>
 51. Lavezzi E, Brunetti A, Smirardo V et al (2022) Case report: new CDKN1B mutation in multiple endocrine neoplasia type 4 and brief literature review on clinical management. *Front Endocrinol* 13:1–7. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.773143>
 52. Chevalier B, Odou MF, Demonchy J et al (2020) Multiple endocrine neoplasia type 4: novel CDKN1B variant and immune anomalies. *Ann Endocrinol (Paris)* 81:124–125. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2020.04.002>
 53. Frederiksen A, Rossing M, Hermann P et al (2019) Clinical features of multiple endocrine neoplasia type 4: novel pathogenic variant and review of published cases. *J Clin Endocrinol Metab* 104:3637–3646. <https://doi.org/10.1210/jc.2019-00082>
 54. Brock P, Bustamante Alvarez J, Mortazavi A et al (2020) Co-occurrence of multiple endocrine neoplasia type 4 and spinal neurofibromatosis: a case report. *Fam Cancer* 19:189–192. <https://doi.org/10.1007/s10689-019-00152-6>
 55. Esteban-Jurado C, Vila-Casadesús M, Garre P et al (2015) Whole-exome sequencing identifies rare pathogenic variants in new predisposition genes for familial colorectal cancer. *Genet Med* 17:131–142. <https://doi.org/10.1038/gim.2014.89>
 56. Whitworth J, Smith PS, Martin JE et al (2018) Comprehensive cancer-predisposition gene testing in an adult multiple primary tumor series shows a broad range of deleterious variants and atypical tumor phenotypes. *Am J Hum Genet* 103:3–18. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.04.013>
 57. Waszak SM, Northcott PA, Buchhalter I et al (2018) Spectrum and prevalence of genetic predisposition in medulloblastoma: a retrospective genetic study and prospective validation in a clinical trial cohort. *Lancet Oncol* 19:785–798. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30242-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30242-0)
 58. Agarwal SK, Kester MB, Debelenko LV et al (2018) Clinical practice guidelines for multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). *J Clin Endocrinol Metab* 24:1–4. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-1230>
 59. Inoue K, Fry EA (2017) Haploinsufficient tumor suppressor genes. *Adv Med Biol* 118:83–122
 60. Costa-Guda J, Arnold A (2014) Genetic and epigenetic changes in sporadic endocrine tumors: Parathyroid tumors. *Mol Cell Endocrinol* 386:46–54
 61. El Naouf M, Kim A, Yon HY et al (2017) Role of CDKN2C fluorescence in situ hybridization in the management of medullary thyroid carcinoma. *Ann Clin Lab Sci* 47:523–528
 62. Georgitsi M (2010) MEN-4 and other multiple endocrine neoplasias due to cyclin-dependent kinase inhibitors (p27Kip1 and p18INK4C) mutations. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 24:425–437
 63. Kirsch M, Mörz M, Pinzer T et al (2009) Frequent loss of the CDKN2C (p18INK4c) gene product in pituitary adenomas. *Genes Chromosomes Cancer* 48:143–154. <https://doi.org/10.1002/gcc.20621>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

4.2 Segona publicació

Isabel Mazarico-Altisent, Ismael Capel, Neus Baena, Maria Rosa Bella-Cueto, Santi Barcons, Xavier Guirao, Rocío Pareja, Andreea Muntean, Valeria Arsentales, Assumpta Caixàs, Mercedes Rigla. **Genetic testing for familial hyperparathyroidism: clinical-genetic profile in a Mediterranean cohort.** *Front. Endocrinol.* 14:1244361. doi: 10.3389/fendo.2023.1244361



OPEN ACCESS

EDITED BY

Antonino Catalano,
University of Messina, Italy

REVIEWED BY

Anne Barlier,
Ludwig Maximilian University of Munich,
Germany
Ruchi Gaba,
Baylor College of Medicine, United States

*CORRESPONDENCE

Isabel Mazarico-Altisent
✉ isamazarico@gmail.com

RECEIVED 22 June 2023

ACCEPTED 04 September 2023

PUBLISHED 21 September 2023

CITATION

Mazarico-Altisent I, Capel I, Baena N, Bella-Cueto MR, Barcons S, Guirao X, Pareja R, Muntean A, Arsentales V, Caixàs A and Rigla M (2023) Genetic testing for familial hyperparathyroidism: clinical-genetic profile in a Mediterranean cohort. *Front. Endocrinol.* 14:1244361. doi: 10.3389/fendo.2023.1244361

COPYRIGHT

© 2023 Mazarico-Altisent, Capel, Baena, Bella-Cueto, Barcons, Guirao, Pareja, Muntean, Arsentales, Caixàs and Rigla. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](#). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Genetic testing for familial hyperparathyroidism: clinical-genetic profile in a Mediterranean cohort

Isabel Mazarico-Altisent ^{1*}, Ismael Capel¹, Neus Baena², Maria Rosa Bella-Cueto³, Santi Barcons⁴, Xavier Guirao⁴, Rocío Pareja¹, Andreea Muntean¹, Valeria Arsentales¹, Assumpta Caixàs¹ and Mercedes Rigla¹

¹Endocrinology and Nutrition Department, Parc Taulí University Hospital, Institut d'Investigació i Innovació Parc Taulí (I3PT), Medicine Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Sabadell, Barcelona, Spain, ²Genetic Department, Parc Taulí University Hospital, Institut d'Investigació i Innovació Parc Taulí (I3PT), Medicine Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Sabadell, Barcelona, Spain, ³Pathology Department, Parc Taulí University Hospital, Institut d'Investigació i Innovació Parc Taulí (I3PT), Medicine Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Sabadell, Barcelona, Spain, ⁴Surgery Department, Parc Taulí University Hospital, Institut d'Investigació i Innovació Parc Taulí (I3PT), Medicine Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Sabadell, Barcelona, Spain

Background: Approximately 10% of primary hyperparathyroidism cases are hereditary, due to germline mutations in certain genes. Although clinically relevant, a systematized genetic diagnosis is missing due to a lack of firm evidence regarding individuals to test and which genes to evaluate.

Methods: A customized gene panel (*AIP*, *AP2S1*, *CASR*, *CDC73*, *CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN2B*, *CDKN2C*, *GCM2*, *GNA11*, *MEN1*, *PTH*, *RET*, and *TRPV6*) was performed in 40 patients from the Mediterranean area with suspected familial hyperparathyroidism (≤ 45 years of age, family history, high-risk histology, associated tumour, multiglandular disease, or recurrent hyperparathyroidism). We aimed to determine the prevalence of germline variants in these patients, to clinically characterize the probands and their relatives, and to compare disease severity in carriers versus those with a negative genetic test.

Results: Germline variants were observed in 9/40 patients (22.5%): 2 previously unknown pathogenic/likely pathogenic variants of *CDKN1B* (related to MEN4), 1 novel variant of uncertain significance of *CDKN2C*, 4 variants of *CASR* (3 pathogenic/likely pathogenic variants and 1 variant of uncertain significance), and 2 novel variants of uncertain significance of *TRPV6*. Familial segregation studies allowed diagnosis and early treatment of PHPT in first-degree relatives of probands.

Conclusion: The observed prevalence of germline variants in the Mediterranean cohort under study was remarkable and slightly higher than that seen in other

populations. Genetic screening for suspected familial hyperparathyroidism allows the early diagnosis and treatment of PHPT and other related comorbidities. We recommend genetic testing for patients with primary hyperparathyroidism who present with high-risk features.

KEYWORDS

parathyroid, primary hyperparathyroidism, multiple endocrine neoplasia type 1, multiple endocrine neoplasia type 4, cyclin-dependent kinase inhibitors, familial hyperparathyroidism, familial hypocalciuric hypercalcemia

Introduction

Primary hyperparathyroidism (PHPT) is a common endocrine disorder, with an overall incidence of 13–78 per 100,000 person-years in the world (1). Owing to more widespread screening for hypercalcemia, this frequency has risen in recent years (1–3). The prevalence rises with age and typically exhibits a female predominance (1). If left untreated, PHPT can cause hypercalcaemic syndrome, with increased mortality, muscle weakness, nephrocalcinosis, renal stones, osteoporosis, bone fractures, and heart failure among others (1). Up to 10% of all PHPT cases are due to germline variants in recurrent genes (4, 5), a situation known as familial primary hyperparathyroidism (FHPT) (6). This prevalence increases to 15–26% in patients with risk features (7). However, it appears that FHPT is underdiagnosed and underreported in the literature, likely due to the limited number of genetic studies performed in clinical practice and an insufficient understanding of these conditions.

FHPT may occur either alone (without other related tumours) or as part of a syndrome, such as multiple endocrine neoplasia (MEN) types 1, 2A, and 4, and hyperparathyroidism-jaw tumour syndrome. MEN1 is caused by inactivating germline variants of the *MEN1* tumour suppressor gene that produce PHPT, gastro-enteropancreatic neuroendocrine tumours, pituitary adenomas, and other tumours, such as bronchial/thymic carcinoids or lipomas (8). MEN2A is caused by activating variants in the proto-oncogene *RET* and typically presents as medullary thyroid carcinoma, pheochromocytoma, and parathyroid tumours (20–30%) with a lower penetrance (9). Patients with MEN4 express MEN1-like milder phenotypes due to *CDKN1B* germline variants and, less frequently, other non-endocrine neoplasms such as breast cancer, prostate cancer, colon cancer, papillary thyroid carcinoma, angiomyolipoma, and meningioma, although only approximately 100 cases have been reported to date (10, 11). Variants in other cyclin-dependent kinase inhibitors (*CDKIs*), such as *CDKN1A*, *CDKN2B*, and *CDKN2C*, have been described in patients with the MEN1 phenotype or suspected FHPT, despite limited data (11, 12). Recently, germline variants of the *MAX* tumour suppressor gene have been associated with a new entity, MEN5. It is thought to cause pheochromocytomas and paragangliomas and, possibly, parathyroid adenomas and functional pituitary adenomas (13, 14). Hyperparathyroidism-jaw tumour syndrome is caused by germline inactivating variants of the *CDC73* (also called *HRPT2*)

tumour suppressor gene. These mutations can result in aggressive forms of PHPT (parathyroid carcinoma, atypical parathyroid adenoma), fibrous/jaw tumours, and renal and uterine tumours (15, 16).

FHPT may also present as non-syndromic PHPT, which includes familial hypocalciuric hypercalcemia (FHH) forms (caused by variants of *CASR*, *GNA11*, or *AP2S1*), neonatal severe hyperparathyroidism, and other forms caused by several genes classified as familial isolated hyperparathyroidism (FIHP). FIHP is diagnosed by exclusion because the genetic cause is unknown in most cases (17–19). *GCM2* proto-oncogene variants are present in about 18% of these cases, while about 30% involve mutations in *MEN1* or *CDC73* with incomplete expression or loss-of-function variants of the *CASR* gene (1, 4, 20–22). Other genes related to familial hyperparathyroidism are *AIP* (23) and *TRPV6* (24). In recent years, the number of genes potentially involved in parathyroid tumorigenesis is constantly expanding (25).

Most authors propose performing genetic testing in patients with PHPT who present some risk features suspicious of FHPT: diagnosis under 30–45 years, high-risk parathyroid histology (multiglandular disease (MGD), parathyroid carcinoma, atypical adenoma, or cystic adenoma), carrying tumours related to syndromic FHPT, family history of PHPT, or a calcium creatinine clearance ratio (CCCR) <0.02 (7). However, consensual systematized genetic screening for FHPT has not been widely implemented because of the lack of firm evidence on which individuals should be tested and which genes should be evaluated. Few studies on the systematic search for germline variants in patients with suspected FHPT have been conducted, and those that have been done have shown mixed results. In addition, these studies were performed in various clinical scenarios, with heterogeneous genetic testing methodologies and various genes assessed (7, 26, 27). To our knowledge, none of these were carried out among the Spanish population, and only a few involved people living in the Mediterranean area.

Genetic testing is of considerable interest to patients with PHPT of a presumed familial origin. This allows for: 1) Predicting which patients are at risk of developing other neoplasms (ex. neuroendocrine tumours in MEN1 or MEN4). 2) Planning the best management of PHPT for each patient and aid in surgical necessity and planning. 3) Guiding surveillance for other clinical features associated with a given genetic anomaly. 4) Carrying out cascade testing of asymptomatic relatives, which allows for early diagnosis of potentially severe syndromes and

reduces healthcare burden and psychological stress in mutation-negative relatives. 5) Offering optimal genetic counselling if needed via prenatal/preimplantation diagnosis (1, 3, 7, 11, 15).

The aim of this study was to perform genetic screening, at our hospital, of patients with PHPT who presented some risk features, in order to: 1) Determine the prevalence of germline mutations in the analysed genes in our cohort. 2) Clinically characterize carriers of variants and their first-degree relatives. 3) Compare disease severity in carriers of variants with respect to those without a genetic alteration found and compare the prevalence of germline variants in our population with those in other cohorts.

Materials and methods

Clinical data collection

An ambispective observational study was conducted. We collected data from patients diagnosed with PHPT who also exhibited some risk factors for FHPT. The diagnosis of PHPT was established by inappropriately non-suppressed or high parathyroid hormone levels (PTH) (reference value [RV] 12.32–41.99 pmol/L) with normal or elevated albumin-corrected serum calcium levels (RV 2.1–2.55 mmol/L). Patients were included in the study when at least one inclusion criterion was met: 1) Age at onset of PHPT ≤ 45 years. 2) High-risk parathyroid histology (parathyroid carcinoma, atypical parathyroid adenoma, cystic parathyroid adenoma, or biopsy-documented MGD defined as having two or more glands affected by either adenomas or hyperplasia). 3) Recurrent or persistent PHPT (established by presenting corrected serum calcium levels ≥ 2.62 mmol/L three months after parathyroid surgery). 4) Family history of PHPT in at least one first-degree relative. 5) Other tumour/s related to syndromic FHPT (gastro-entero-pancreatic neuroendocrine tumours, pituitary adenoma, jaw tumour, renal or uterine tumour, medullary thyroid carcinoma, breast tumour, malignant hemopathy, or others). Having a known mutation in any of the genes under study,

as well as having a first-degree relative with a known mutation in any of them, were the only exclusion criteria.

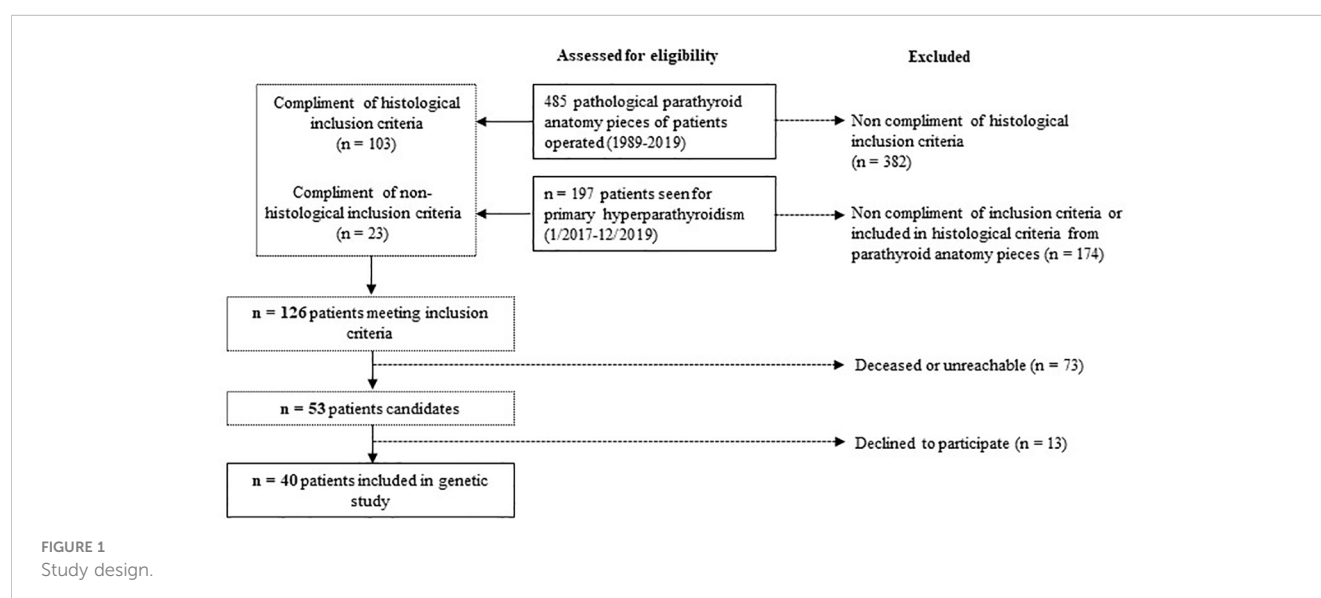
We retrospectively reviewed the medical records, from pathologic data base, of all patients who underwent surgery for hyperparathyroidism between 1989–2019 at the Parc Taulí University Hospital. In total, 103/485 patients met the histological inclusion criteria. We also examined all patients referred to the Endocrinology and Nutrition Department of our hospital for PHPT from January 2017 to December 2019 to include patients with PHPT who had not yet undergone surgery. Of them, 23/197 met inclusion criteria. In total, 126 patients met at least one of the inclusion criteria. Seventy-three patients were deceased or unreachable and 13 declined to participate. In the end, 40 index cases were included. The study design is illustrated in Figure 1.

Patients who met the inclusion criteria and agreed to participate were interviewed to obtain detailed medical and family histories between February and July 2020. Baseline data were recorded for each patient, including age at presentation, sex, initial clinical presentation, preoperative and postoperative biochemical and hormonal findings (PTH, calcium, phosphate, and 25-hydroxy vitamin D levels), and calcium creatinine clearance ratio (CCCR, calculated using a 24-hour urinary calcium collection and one blood sample) at diagnosis when available. We reviewed the preoperative imaging results of the parathyroid glands, type of surgery performed, surgical findings, histopathology, postoperative data, and follow-up outcomes.

Written informed consent was obtained from all patients, and the study was approved by the institutional Ethics Committee of Institut d'Investigació i Innovació Parc Taulí I3PT.

Gene panel sequencing and variant interpretation

DNA was extracted from blood and other tissue samples using the Gentra Puregene DNA reagent (Qiagen, Valencia, CA). Genetic



screening for FHPT was performed using a customized gene panel that included *AIP*, *AP2S1*, *CASR*, *CDC73*, *CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN2B*, *CDKN2C*, *GCM2*, *GNA11*, *MEN1*, *PTH*, *RET*, and *TRPV6*, through both sequence analysis and copy number variation (CNV) analysis. This gene panel was selected based on recent data and previous studies (15, 28, 29).

In the analysis, the mean sequencing depth was > 150 times, and > 99% of the target nucleotides were covered with > 20× sequencing depth for all assays. The target nucleotides included all protein-coding exons of the genes in the panels in addition to 20 base pairs inside each intron/exon boundary. The panel was also customized by adding oligonucleotides that targeted deep intronic variants (≥ 20 base pairs from the intron/exon boundary) and noncoding variants (promoter region and 5′ or 3′ untranslated regions), which were reported to cause disease in association with PHPT. The sequence reads of each sample were mapped to the human reference genome (GRCh37/hg19). The Burrows–Wheeler Aligner software was used for reading alignment. Duplicate read marking, local realignment around indels, base quality score recalibration, and variant calling were performed using the genomic analysis toolkit algorithms (Sentieon) for nDNA. Variant data were annotated using a collection of tools (VcfAnno and VEP) with a variety of public variant databases, including, but not limited to, the Genome Aggregation Database control population cohorts (gnomAD), ClinVar, and the Human Gene Mutation Database (30).

The sequence variant analysis pipeline was validated in the Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) and College of American Pathologists (CAP)-accredited Blueprint Genetics diagnostic laboratory. The series of selected quality criteria included the variant call quality score, variant genomic location, sequence content, and integrative genomics viewer visual analysis. This algorithm was established based on the outcome of internal validation performed in the CLIA and CAP-accredited Blueprint Genetics diagnostic laboratory.

CNV analysis was performed bioinformatically from next-generation sequencing data using a bioinformatics pipeline; one component was a CNV kit and the other involved in-house developed proprietary technology. CNVs were confirmed by digital polymerase chain reaction. The CNV analysis pipeline was validated in the CLIA and CAP-accredited Blueprint Genetics diagnostic laboratories. Sanger sequencing of the candidate variants was performed on the patient and family member samples to confirm the presence of the variant and the pattern of inheritance.

Variants were classified into five categories according to the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology (ACMG/AMP) guidelines (31): benign, likely benign, variant of uncertain significance (VUS), likely pathogenic (LP), and pathogenic (P). We reported all the variants classified as P, LP, or VUS. If any variant was found, genetic counselling of the proband and cascade genetic testing were offered to all at-risk family members. If required, loss of heterozygosity and CNV in tumours and immunohistochemistry studies were performed.

Statistical analysis

Results corresponding to quantitative variables were presented as the mean ± standard deviation. Data associated with qualitative characteristics were reported as percentages. The normality of quantitative variables was assessed using the Shapiro–Wilk normality test. The significance of the difference between two means was assessed using Student’s T-test for normal variables and the Wilcoxon rank sum test for non-normal variables. The significance of the difference between more than two means was assessed using the Kruskal–Wallis test for non-normal variables. The significance of the difference between percentages was assessed using Pearson’s chi-square test. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$. Calculations were performed using R Commander version 4.0.5.

Results

General data

The clinical characteristics of the 40 participants (27 females and 13 males) are displayed in Table 1. The mean age at diagnosis of primary hyperparathyroidism was 51 ± 15.8 years. The circumstances leading to diagnosis of PHPT were diverse: 30% incidental findings of hypercalcemia, 20% symptomatic renal lithiasis, 17.5% palpable cervical nodes, 17.5% neuromuscular symptoms, and other clinical features in the remaining patients. Thirty-two patients (80%) underwent surgery, with mean highest PTH levels of 50.28 (12.32 – 41.99) pmol/L (RV 1.06 – 6.89), mean albumin adjusted serum calcium of 3.03 ± 0.5 mmol/L, and mean nadir phosphate levels of 0.84 ± 0.39 mmol/L. The inclusion criteria were as follows: 15 subjects were under 45 years of age at diagnosis of PHPT; 28 cases met the histology criteria (one parathyroid carcinoma, 11 atypical parathyroid adenomas, six cystic parathyroid adenomas, and five MGD); four patients presented with recurrence of PHPT after surgery; two cases were included because of family history of PHPT; and seven patients presented tumours that could be related to familial syndrome. 32% of the patients met two or more inclusion criteria.

Genetic sequencing of the targeted panel identified five pathogenic/likely pathogenic germline variants in five of the 40 participants (three in *CASR* and two in *CDKN1B*) (12.5%) and four variants of uncertain significance (one in *CDKN2C*, one in *CASR*, and two in *TRPV6*) (10%). There was one frameshift variant, one nonsense variant, and seven missense variants. Table 2 summarizes the genetic and clinical characteristics of patients with germline variants.

CASR variants

Four patients carried heterozygous missense variants of the *CASR* gene (ID15, ID21, ID24, and ID31): two likely pathogenic, one pathogenic, and one VUS. Two of the *CASR* variant carriers had

TABLE 1 Clinical variables of the 40 participants.

Clinical variables of the cohort (n = 40)			
Mean age at diagnosis of hyperparathyroidism (years)	51 ±15.8		
Gender: female/male, n (%)	27 (68%) / 13 (32%)		
Clinical presentation	Incidental finding of hypercalcemia		n = 12 (30%)
	Renal lithiasis		n = 8 (20%)
	Palpable cervical node		n = 7 (17.5%)
	Neuromuscular symptoms		n = 7 (17.5%)
	Other signs or symptoms (osteoporosis, fractures, etc.)		n = 6 (15%)
Patients who underwent surgery, n (%)	n = 32 (80%)		
Mean PTH max pre-surgery (pmol/L)	50.28 (12.32-41.99)		
Mean adjusted Ca max pre-surgery (mmol/L)	3.03 ±0.5		
Mean P min pre-surgery (mmol/L)	0.84 ±0.39		
Inclusion criteria (indication for genetic testing)	Classification of participants into categories according to inclusion criteria		Absolute values*
	Age ≤45 years old	7 (18%)	15 (37.5%)
	Parathyroid carcinoma	0 (0%)	1 (2.5%)
	Atypical parathyroid adenoma	6 (15%)	11 (27.5%)
	Cystic parathyroid adenoma	2 (5%)	6 (15%)
	Multiglandular disease	4 (10%)	10 (25%)
	Recurrent hyperparathyroidism three months after surgery	2 (5%)	4 (10%)
	Family history of primary hyperparathyroidism	2 (5%)	2 (5%)
	Associated-tumor suggestive of familial syndrome **	4 (10%)	7 (17.5%)
	≥2 inclusion criteria	13 (32%)	

Data are expressed as mean ± standard deviation or interquartile range. PTH max: highest serum parathyroid hormone levels (RV 1.06-6.89) before surgical treatment or during follow-up in non-operated patients; Ca: serum calcium levels; P: serum phosphate levels; SD: standard deviation; *Classification including patients with ≥2 inclusion criteria in the corresponding category; **Associated tumors suggestive of familial syndrome: prolactinoma (ID3), GH-producing adenoma (ID5 and ID19), clear cell renal carcinoma (ID14), lymphoblastic lymphoma (ID22), Aberrant T-cell population (ID29), metastatic duodenal neuroendocrine tumour, melanoma, and renal angiomyolipoma (ID33).

CCCR < 0.01, and the others were between 0.01-0.02. Of the four patients, three underwent surgical treatment.

Proband ID15 presented with severe symptomatic hypercalcemia at the time of PHPT diagnosis that required hospital admission. Computed tomography of the neck revealed a partially cystic lesion posterior to the thyroid gland, suggesting cystic parathyroid adenoma. Surgery was performed, and the pathological diagnosis was MGD due to one atypical parathyroid adenoma with cystic cells and one hyperplastic parathyroid gland. After surgery, the patient remained normocalcemic and asymptomatic for four years of follow-up until now. A genetic test revealed c.1172T>G, p.(Phe391Cys) variant of *CASR*, classified as LP, according to ACMG. Biochemical tests detected hypercalcemia plus CCCR 0.01 in one of the two family members who carried the identical germline variant as the proband; conversely, no alterations in calcium or PTH serum levels were found on non-mutation carrier relatives (see family pedigree in Figure 2).

Cases ID24 and ID31 were diagnosed with PHPT in an osteoporosis study (defined by a T score below -2.5 SD). In both cases, the Sestamibi scan findings were consistent with a single parathyroid lesion. Even so, bilateral surgery was performed in both cases due to the observation of multiple enlarged glands during the procedure. Pathology study showed multiglandular disease in both cases (three lipohyperplasia glands in case ID24 and two hyperplasia glands in case ID31) (See Table 2). Densitometric osteoporosis improved after parathyroid excision in both cases, although patient ID24 showed persistent biochemical PHPT after surgery. Cascade genetic testing and blood tests were offered to all first-degree relatives. Biochemical PHPT (characterized by elevated or inadequately normal PTH levels with varying degrees of hypercalcemia) was detected in multiple family members who share the same variants as the probands (Figure 2). They were offered clinical and analytical follow-up, although to date none of them required parathyroid surgery. In the ID31 family, segregation was observed in all but one sibling. Yet, variant c.175G>A,

TABLE 2 Genetic and clinical characteristics of patients displaying germline variants in any of the genes included in the panel.

ID	Age	Sex	Gene	Variant	Variant type	ACMG	ACMG classification	Previously reported (gnomAD / Pubmed)	Ca Pre	Ca Post	PTH Pre	PTH Post	Cr	CCCR	Inclusion criteria*	Pathology	Gland weight (gr)	Identified carriers
18	47	M	<i>CDKN1B</i>	c.280_281delinsG, p.(Pro94Alafs*25)	Frameshift	LP	PVS1 (very strong), PM2 (supporting)	No / No	3.39	2.20	55.24	6.89	1.07	NA	3	APA	15.7	Mother (colon neoplasm)
29	34	M	<i>CDKN1B</i>	c.169C>T, p.(Gln57*)	Nonsense	P	PVS1 (very strong), PM2 (moderate)	No / No	3.37	2.15	379.1	6.25	2.20	0.010	9 (1, 3, 5, 8)	MGD: 3 parathyroid hyperplasia glands and 1 APA	1.7	None
27	28	F	<i>CDKN2C</i>	c.319T>G, p.(Leu107Val)	Missense	VUS	PM2 (moderate)	0.0036%/No	2.84	1.97	9.43	4.55	0.90	0.030	9 (1, 4)	MGD: 1 cystic adenoma and 1 parathyroid adenoma	0.1	Mother (PHPT)
15	77	M	<i>CASR</i>	c.1172T>G, p.(Phe391Cys)	Missense	LP	PM2 (moderate), PP3 (supporting) PP2	No / No	4.12	1.68	212.93	3.39	1.07	0.005	9 (3, 4, 5)	MGD: 1 APA (with cystic cells) and 1 hyperplasia gland	1.33	Son (asymptomatic PHPT)
21	49	M	<i>CASR</i>	c.413C>T, p.(Thr138Met)	Missense	P	PM1 (moderate), PP2 (supporting), PM2 (moderate), PP3 (supporting), PP5 (strong)	No / Yes	3.12	-	15.37	-	0.80	0.004	7	-	NA	Daughter with symptomatic PHPT (not genetic test performed)
24	64	F	<i>CASR</i>	c.2393C>T, p.(Pro798Leu)	Missense	LP	PM1 (moderate), PP2 (supporting), PM2 (moderate), PP3 (supporting), PP5 (strong)	No / Yes	2.80	2.34	13.78	7.74	0.46	0.013	9 (5, 6)	MGD: 3 lipohyperplasia glands	0.28	2 sons and 1 daughter with asymptomatic PHPT
31	75	F	<i>CASR</i>	c.175G>A, p.(Glu59Lys)	Missense	VUS	PM1 (supporting), PM2 (supporting), BP4 (moderate)	No / No	2.45	2.33	12.08	8.69	1.02	0.011	5	MGD: 2 hyperplasia glands	0.08	2 sisters and 1 brother with mild PHPT (normal calcium)
4	41	M	<i>TRPV6</i>	c.1937G>A, p.(Arg646Gln)	Missense	VUS	PM2 (moderate)	0,0032%	3.30	2.43	15.90	3.71	0.91	0.011	1	Parathyroid adenoma	0.4	NA
30	35	F	<i>TRPV6</i>	c.787G>A, p.(Asp263Asn)	Missense	VUS	PM2 (moderate)	0,0415%	2.75	-	15.58	-	0.62	0.010	1	-	-	NA

ID: identification number of each case; RV: reference value; Age: age at diagnosis of primary hyperparathyroidism; F: female; M: male; ACMG: variant classification according to ACMG guidelines; LP: likely pathogenic; P: pathogenic; VUS: variant of uncertain significance; Ca-Pre (mmol/L): corrected serum calcium pre-surgery (RV 2.1-2.55); Ca-Post (mmol/L): corrected serum calcium post-surgery; PTHPre (pmol/L): serum parathyroid hormone pre-surgery (RV 1.06-6.89); PTHPost: serum parathyroid hormone post-surgery; Cr: serum creatinine at diagnosis of primary hyperparathyroidism; CCCR: Calcium creatinine clearance ratio; APA: atypical parathyroid adenoma; MGD: multigland disease; Carriers: family members who carried the same variant and their clinical characteristics; PHPT: primary hyperparathyroidism; NA: not available; * Inclusion criteria (indication for genetic testing): 1: age ≤45 years old; 2: parathyroid carcinoma; 3: atypical parathyroid adenoma; 4: cystic parathyroid adenoma; 5: multiglandular disease; 6: recurrent hyperparathyroidism 3 months after surgery; 7: family history of primary hyperparathyroidism; 8: associated tumour suggestive of familial syndrome; 9: ≥2 inclusion criteria.

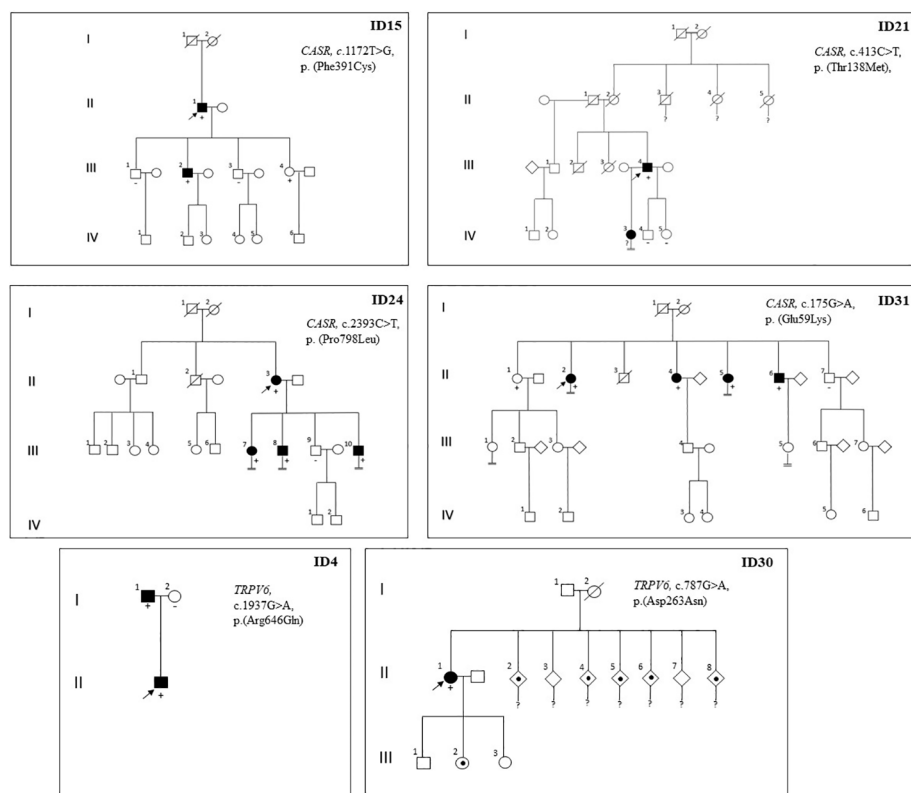


FIGURE 2

Pedigree of probands with detection of germline variant of *CASR* or *TRPV6* genes and their relatives. Family members are indicated by generation (Roman numerals) and individuals (Arabic numerals). Arrows indicate index case; Circle, female; Square, male; Double line below descent line, no offspring; Empty symbol, unaffected family member; Filled symbol, affected family member (inappropriately non-suppressed or high parathyroid hormone levels with normal or elevated serum calcium levels); Filled spot, history of nephrolithiasis or severe vitamin D deficiency; Slashed symbol, deceased; +, mutation carrier; -, non mutation carrier;?, no genetic test performed.

p.(Glu59Lys) was classified as VUS for the time being, according to the ACMG criteria (PM1 (supporting), PM2 (supporting), and BP4 (moderate)). Case ID21 was included in the study because he had one daughter with PHPT. His imaging localization studies were negative, so surgery was not performed, but treatment with cinacalcet was initiated (30 mg once daily) and calcium plasma levels decreased from 3.12 to 2.74 mmol/L (RV 2.1–2.55). The proband's daughter declined to undergo a genetic test.

CDKIs variants

As our group recently reported, three novel *CDKIs* germline variants were identified in three unrelated cases: two likely pathogenic variants of *CDKN1B* and one VUS variant of *CDKN2C* (see Table 2) (11). Patients harbouring *CDKN1B* variants were included in the study because of atypical parathyroid adenomas, plus age under 45 years at diagnosis in case ID29. Case ID27, who carried the *CDKN2C* variant, was included due to having a young age at diagnosis and cystic parathyroid adenoma. Neoplasm screening showed other non-endocrine tumours in the three cases: single colon adenoma with dysplasia and atypical lipomas (defined as lipomatous neoplasms with focal cellular atypia) in case ID18, an aberrant T-cell

population in case ID29, and a non-functional pituitary adenoma in case ID27. Familial segregation analysis of these variants identified the same variant of the *CDKN2C* gene in ID27's mother, who was diagnosed with PHPT with moderate hypercalcemia and osteoporosis due to parathyroid adenoma. She underwent surgery and subsequently achieved normal calcium and PTH levels. Genetic analysis of tumour samples showed uniparental disomy of chromosome 1, including *CDKN2C*, in case ID27. Neither loss of heterozygosity nor CNV for the *CDKN1B* gene was found in cases ID18 and ID29, respectively. Clinical data are comprehensively described in the mentioned paper (11).

TRPV6 variants

We detected two variants of the *TRPV6* gene, classified as VUS, in two unrelated cases that were included in the study by virtue of having a young age at PHPT diagnosis (Table 2). Both probands had a CCCR of 0.01. Case ID4, who had a clinical history of nephrolithiasis, was diagnosed with PHPT at 41 years old. He underwent surgery for a single parathyroid adenoma; after surgery, his PTH and calcium plasma levels remained normal. Familial segregation analysis was performed on his parents (his only living first-degree relatives). His father carried the same genetic variant

and was diagnosed with asymptomatic normocalcemic primary hyperparathyroidism through analytical tests. Case ID30 was diagnosed with PHPT and severe vitamin D deficiency after her newborn developed severe hypocalcaemia due to rickets. Vitamin D treatment was started for both the patient and the newborn. After normalizing vitamin D serum levels, PTH and calcium levels remained elevated in case ID30. Neck ultrasound and Sestamibi scan revealed a nodule suggestive of a parathyroid lesion within the thymus. The proband was advised to undergo surgery, but she failed to follow up, and the family segregation research could not be completed. The only information available about the first-degree relatives is that five of the seven siblings of the index case had a history of nephrolithiasis (see family pedigree in [Figure 2](#)).

Clinical data according to genetic test results

We analysed the clinical and biochemical features of the study participants according to their genetic test results (see [Table 3](#)). The median age at PHPT diagnosis of subjects with a positive genetic test result was not significantly different from that of patients with negative genetic results. Mean PTH and calcium serum levels pre-surgery of patients carrying genetic variants were higher than those with a negative genetic study, but the difference was not statistically significant. Serum phosphate levels were statistically similar between both groups. The only statistically significant difference found between the two groups was the CCCR, which was lower in the group of patients with a positive genetic test (0.01 vs 0.02, $P = 0.0038$).

Discussion

In this study, we provide a well-defined cohort of 40 patients who presented features indicative of hereditary hyperparathyroidism. As far as we know, this is the largest cohort of patients with suspected FHPT reported in Spain where an expanded panel of genes related to FHPT was systematically studied. We identified nine germline

variants (two of *CDKN1B*, one of *CDKN2C*, four of *CASR*, and two of *TRPV6*) in nine participants (22.5%); five pathogenic or likely pathogenic variants (12.5%) and four VUSs (10%). The most common confirmed genetic disorder in our sample was FHH type 1 (due to *CASR* variants), followed by MEN4 (due to *CDKN1B* variants). Notably, seven of these variants have not been previously reported ([Table 2](#)).

The prevalence of germline variants found in our study is consistent with some previous studies conducted in individuals with clinical diagnoses of FHPT and is slightly higher than other cohorts. In the Japanese population, *CDC73*, *MEN1*, and *CASR* were studied in 13 families with suspected FHPT due to variable risk phenotypes, resulting in four variants (30%) ([32](#)). Conversely, only one *MEN1* mutation was found in all the genes studied in a cohort of 29 Finnish patients with suspected FHPT (3%) ([28](#)). Other studies in different susceptible populations were conducted, resulting in a variable prevalence of germline variants: 8/86 (9.3%) in the American cohort ([29](#)), 9/62 (15%) in South Australia ([7](#)), and 18/68 (26%) in New Zealand ([7](#)). One of the largest studies to date identified 19 pathogenic germline variants (11 *CASR*, 6 *MEN1*, 1 *CDC73*, and 1 *AP2S1*) in 121 British patients referred for genetic testing for suspected FHPT (16%) ([33](#)). However, all these results are hardly comparable, as the authors used different risk criteria for FHPT and the genes assessed differed between the studies ([7](#), [21](#), [22](#), [27](#), [33](#), [34](#)).

In our study, the inclusion criteria were based on the established features of inherited tumour susceptibility. The histological diagnosis of the surgical pathology specimens included in this study was based on the outdated WHO criteria. However, it is important to note that the nomenclature has since been updated. The concept parathyroid hyperplasia is no longer generally supported in the context of PHPT as it consists of multiple “clonal” neoplastic proliferations. The 2022 WHO classification approves PHPT-related multiglandular parathyroid disease as germline susceptibility-driven neoplasm. Also, previously referred to as atypical parathyroid adenomas are now recognized as atypical parathyroid tumours ([35](#)). As shown in [Table 3](#), in a comparison of different characteristics of the participants according to the genetic results, the only statistically significant difference was in CCCR.

TABLE 3 Characteristics of patients based on genetic test outcomes.

	Subjects with positive genetic test (n = 5)	Subjects with negative genetic test (n = 35)	P-value
Age at diagnosis (years)	54.2 ± 16	50.8 ± 15	0.6526
Calcium (mmol/L)	3.36 ± 0.49	2.99 ± 0.49	0.0817
PTH (pmol/L)	134.95 ± 159.25	38.18 ± 48.65	0.1582
Mean P min pre-surgery (mmol/L)	0.63 ± 0.19	0.87 ± 0.4	0.1005
Calcium creatinine clearance ratio (CCCR)*	0.0085	0.022	0.0057
More than one inclusion criteria (%)	3/5 (60 %)	10/35 (28.6 %)	0.1605

Data are expressed as mean ± standard deviation. The positive genetic test group included patients with LP or P variants, according to the ACMG criteria. The negative genetic test group included subjects with VUS variants or those without any variants found in the genes studied. *CCCR was analysed with Wilcoxon test being lower in subjects with class LP or P variants when compared to subjects with negative genetic test ($P = 0.005$). When analysing the differences in CCCR between patients who presented with each type of mutation (*CASR*, *CDKN1B*, or non-mutated; Kruskal-Wallis test), a statistically significant difference was observed ($P = 0.02$), mainly at the expense of subjects with mutated *CASR*, in whom the CCCR value was much lower.

There were no statistically significant differences in the mean age of the group carrying LP or P variants compared to that of subjects with a negative genetic study (54.2 vs. 50.8 years, respectively). Calcium and PTH concentrations were somewhat higher in the group of patients with a positive genetic test but without statistically significant differences from the group with a negative test.

Interestingly, subjects carrying LP or P variants had a lower CCCR than those with a negative genetic study (Wilcoxon test, $P = 0.057$). When we analysed the differences in CCCR between patients who presented with each type of mutation (*CASR*, *CDKN1B*, or non-mutated; Kruskal-Wallis test), a statistically significant difference was observed ($P = 0.02$) but mainly at the expense of subjects with mutated *CASR*, in whom the CCCR value was much lower (see Table 3). Of note, a CCCR of <0.01 is generally considered a well-planned screening method of FHH. However, this cut-off is of limited clinical value due to reduced diagnostic sensitivity (only captures ~65% of FHH type 1 patients) and reduced specificity (~18% of surgically confirmed PHPT cases have CCCR <0.01). Also, CCCR is not validated for diagnosing FHH in patients with renal impairment, vitamin D insufficiency, or pregnancy (36).

Apart from CCCR, we did not find a trait that was clearly more frequent in patients in whom we found germline variants. Although the differences were not statistically significant, the group of patients carrying a genetic variant had a greater tendency to present more than one inclusion criterion, i.e., various risk factors (60% vs. 28.6% in patients with a negative genetic study). This suggests that having more than one risk characteristic may increase the possibility of positive genetic screening. However, it should be noted that our sample was small and that this is a descriptive study, so it is difficult to draw firm conclusions. Studies with a larger number of patients would be necessary to corroborate this hypothesis.

As mentioned above, four subjects were diagnosed with FHH type 1 due to *CASR* variants. Variants c.413C>T, p.(Thr138Met) and c.2393C>T, p.(Pro798Leu) were earlier reported in patients with a diagnosis of FHH (37, 38). Instead, variants c.1172T>G, p.(Phe391Cys) and c.175G>A, p.(Glu59Lys) were not previously described. Among the three patients who underwent surgery, one achieved a cure, while the remaining two did not, which is typically observed in cases of FHH. However, both of these cases showed improvement in osteoporosis following the surgery. This supports the notion that parathyroid surgery might be beneficial and even curative in some cases of FHH. Of note, the c.175G>A, p.(Glu59Lys) variant was not documented in gnomAD, a reference population database. Therefore, this variant was classified as a VUS according to ACMG criteria (Table 2). Even so, we believed it was appropriate to report this variant since the clinical features of the index case and most of the carrier relatives were consistent with FHH type 1. As noted in previous publications, FHH is a rare autosomal dominant disorder with low or variable penetrance, which could be the reason for the incomplete segregation of the disease in the ID31 family (39).

Historically, FHH and PHPT have been classified as distinct conditions owing to some differences, such as lower urinary calcium excretion (typically CCCR ≤ 0.01), generally a more benign clinical

course, and the controversial role of parathyroid surgery in FHH patients, as parathyroid hyperplasia of more than one gland is present in the majority of cases. However, recent research has shown that FHH can be classified as a subtype of FHPT because they share a similar pathophysiology. The *CASR* gene is known to play a role in parathyroid growth; therefore, we suppose that some variants may promote both hyperplasia and parathyroid adenoma formation (33). There are several reported cases of parathyroid adenoma in patients with FHH (33, 40, 41). To our knowledge, we report for the first time a case of atypical parathyroid tumour in a patient with FHH type 1 (ID15). In FHH type 1, *CASR* hypoactivity leads to increased renal calcium reabsorption and increased PTH production, which can result in hypercalcemia with inappropriately normal or elevated PTH. Although traditionally considered rare, 40% of FHH cases could present with atypical features like renal and bone damage, hypercalciuria, severe hypercalcemia, CCCR >0.02 , or parathyroid adenoma (42). In agreement with this, of the four *CASR* variant carriers we reported, one had severe hypercalcemia requiring hospitalization (ID15) and three had bone damage (osteoporosis). The presence of osteoporosis more strongly suggests the acquisition of autonomy of one or more parathyroid glands.

A prevalence of 7.5% (3/40) of variants in *CDKIs* was found in our group. Two novel likely pathogenic *CDKN1B* variants were found in patients with atypical parathyroid adenomas (Table 2). *CDKN1B* mutations are responsible for MEN4 syndrome, which causes a MEN1-like phenotype with other related tumours (11, 43). Additionally, a novel variant of the *CDKN2C* gene with uniparental disomy was classified as VUS in a patient with PHPT and a non-functional pituitary adenoma. To our knowledge, *CDKIs* variants have not been reported in patients with atypical or cystic adenomas. As variants in *CDKIs* have been shown to be a potential cause of FHPT, which may also give rise to other tumours, we suggest that these genes should be added to the FHPT study gene panels. Despite the potential significance of germline variants of these genes, the reported incidence among affected patients is limited (11, 43). Further research is required to determine the actual prevalence of these mutations and the extent of their phenotypic impact.

We report two variants of uncertain significance in *TRPV6* in two patients with PHPT diagnosed before the age of 45 years (ID4 and ID30). *TRPV6* encodes the TRPV6 channel, which plays a vital role in intestinal and renal calcium absorption. TRPV6 protein is expressed in many epithelial tissues, including the intestine, kidney, placenta, epididymis, and exocrine glands such as the pancreas, prostate, salivary glands, sweat, and mammary glands. Transient severe neonatal hyperparathyroidism has been reported in patients with missense variants of *TRPV6*, inherited in an autosomal recessive manner. The disease is characterized by transplacental maternal-foetal calcium transport interference, causing a foetal calcium deficit, resulting in neonatal hyperparathyroidism and insufficient bone mineralization (44, 45).

Variants in the *TRPV6* gene have also been associated with nephrolithiasis and chronic pancreatitis when inherited in an autosomal recessive manner. However, most studies investigating the genotypic and phenotypic effects of *TRPV6* were conducted in mice (45, 46). In the present study, two cases (ID4 and ID30) were

diagnosed with primary hyperparathyroidism in young adulthood and carried a single *TRPV6* variant. To our knowledge, there have been no reports of adults with dominant inheritance of *TRPV6* involvement that presented with PHPT. Thus, we report these variants to expand the understanding of this gene. However, their clinical significance remains unclear and should be interpreted with caution. Further research is necessary to determine the clinical implications of *TRPV6* variants inherited in a dominant manner. A potential strategy could be to perform whole exome sequencing (WES) or whole genome sequencing (WGS) to study patients with inconclusive genetic test results. This approach may help to uncover a second variant that was not detected by a gene panel and may reveal novel genes associated with FHPT.

We did not find any variants in the remaining genes included in the panel. One point of note is the absence of *MEN1* in the studied cohort. The average percentage of *MEN1* pathogenic variants in families with clinical FIHP is around 18% (26). This absence in our cohort could be attributed to the exclusion of individuals previously known to carry *MEN1* mutations. In our hospital, *MEN1* gene analysis is frequently performed in clinical practice rather than in other genes (47). It should be noted that previous studies associated atypical parathyroid tumours with mutations in *CDC73* (48). In contrast, variants in *CDC73* were not found in 11 patients with these tumours included in our cohort.

This study has several limitations. The exclusion of cases of FHPT with known mutations in any of the studied genes might have distorted the actual prevalence of germline variants in the at-risk population, which could be higher than reported. Also, there may be a selection bias as: some patients may not express risk features because a variable clinical expressivity and/or different penetrance of the characteristics associated with each of the various syndromic forms of PHPT at the time of PHPT diagnosis, etc (49). Another limitation was the small number of participants, which made it difficult to extract statistically significant results applicable to the population. It should be noted that four of the variants found in our cohort were classified as VUS, so their clinical relevance should be interpreted with caution. However, this classification system is not absolute and is dependent on the accuracy of the available evidence at the time of assessment (50). In addition, we did not conduct functional analysis; therefore, we could not confirm whether the variants caused the characteristics observed in the patients, particularly in the case of those classified as VUS. On the other hand, the genetic testing we conducted was limited to gene panel sequencing.

In summary, we found a remarkable prevalence of genetic variants among the genes studied in the at-risk population. This is consistent with the hypothesis that FPHP is probably an underdiagnosed entity owing to non-standardized genetic screening. In our cohort, genetic testing allowed the early diagnosis and treatment of PHPT and other related comorbidities of probands and their first-degree relatives. We suggest genetic testing in patients with PHPT who present any of the risk characteristics considered in the inclusion criteria of our study. WES strategy is replacing gene panel studies in clinical laboratories. Thus, we propose a filtering procedure using the aforementioned

customized gene panel updated as a first-tier virtual panel for patients with suspected FHPT.

Data availability statement

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found in the article/supplementary material.

Ethics statement

Written informed consent was obtained from all patients, and the study was approved by the institutional Ethics Committee of Institut d'Investigació i Innovació Parc Taulí I3PT. The studies were conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements. The participants provided their written informed consent to participate in this study. Written informed consent was obtained from the individual(s) for the publication of any potentially identifiable images or data included in this article.

Author contributions

IC and IM-A designed the study, analysed and interpreted the data, and wrote, reviewed, and edited the manuscript. NB performed and interpreted genetic data and wrote and edited the manuscript. MB-C, SB, XG, and RP participated in editing the manuscript. AC and MR provided scientific guidance. All authors approved the final version of the manuscript to be published.

Funding

The study was financed with research funds from the Endocrinology and Nutrition Department, Parc Taulí University Hospital, Institut d'Investigació i Innovació Parc Taulí (I3PT), Sabadell, Barcelona, Spain.

Acknowledgments

The authors thank the staff of our hospital for suggestions and guidance and the Blueprint Genetic laboratory for the clinical support. Great appreciation goes to all our study participants for the time they devoted.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated

organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

References

- Minisola S, Arnold A, Belaya Z, Brandi ML, Clarke B, Hannan FM, et al. Epidemiology, pathophysiology and genetics of primary hyperparathyroidism. *J Bone Mineral Res* (2022) 37(11):2315–29. doi: 10.1002/jbmr.4665
- Bilezikian JP. Primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* (2018) 103(11):3993–4004. doi: 10.1210/je.2018-01225
- Capel I, Mazarico-Altisent I, Baena N. Genetic study in primary hyperparathyroidism: Which patients and which genes to study? *Endocrinol Diabetes Nutr* (2022) 69(4):237–9. doi: 10.1016/j.endien.2022.02.020
- Blau JE, Simonds WF. Familial hyperparathyroidism. *Front Endocrinol (Lausanne)* (2021) 12(February):1–14. doi: 10.3389/fendo.2021.623667
- Bilezikian JP, Brandi ML, Eastell R, Silverberg SJ, Udelsman R, Marcocci C, et al. Guidelines for the management of asymptomatic primary hyperparathyroidism: Summary statement from the fourth international workshop. *J Clin Endocrinol Metab* (2014) 99(10):3561–9. doi: 10.1210/jc.2014-1413
- Thakker RV, Bouloux P, Wooding C, Chotai K, Broad PM, Spurr NK, et al. Association of parathyroid tumors in multiple endocrine neoplasia type 1 with loss of alleles on chromosome 11. *N Engl J Med* (1989) 321(4):218–24. doi: 10.1056/NEJM198907273210403
- de Sousa SMC, Carroll RW, Henderson A, Burgess J, Clifton-Bligh RJ. A contemporary clinical approach to genetic testing for heritable hyperparathyroidism syndromes. *Endocrine* (2022) 75:23–32. doi: 10.1007/s12020-021-02927-3
- Thakker R v, Newey PJ, Walls G v, Bilezikian J, Dralle H, Ebeling PR, et al. Clinical practice guidelines for multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). *J Clin Endocrinol Metab* (2012) 97(9):2990–3011. doi: 10.1210/jc.2012-1230
- American Thyroid Association Guidelines Task Force 1, Kloos RT, Eng C, Evans DB, Francis GL, Gagel RF, et al. Medullary thyroid cancer: management guidelines of the American Thyroid Association. *Thyroid* (2009) 19(6):565–612. doi: 10.1089/thy.2008.0403
- Frederiksen A, Rossing M, Hermann P, Ejerdsted C, Thakker R v, Frost M. Clinical features of multiple endocrine neoplasia type 4: Novel pathogenic variant and review of published cases. *J Clin Endocrinol Metab* (2019) 104(9):3637–46. doi: 10.1210/jc.2019-00082
- Mazarico-Altisent I, Capel I, Baena N, Bella-Cueto MR, Barcons S, Guirao X, et al. Novel germline variants of CDKN1B and CDKN2C identified during screening for familial primary hyperparathyroidism. *J Endocrinol Invest* (2022) 46(4):829–40. doi: 10.1007/s40618-022-01948-7
- Agarwal SK, Mateo CM, Marx SJ. Rare germline mutations in cyclin-dependent kinase inhibitor genes in multiple endocrine neoplasia type 1 and related states. *J Clin Endocrinol Metab* (2009) 94(5):1826–34. doi: 10.1210/jc.2008-2083
- Nosé V, Gill A, Teijeiro JMC, Perren A, Erickson L. Overview of the 2022 WHO classification of familial endocrine tumor syndromes. *Endocrine Pathol* (2022) 33:197–227. doi: 10.1007/s12022-022-09705-5
- Seabrook AJ, Harris JE, Velosa SB, Kim E, McInerney-Leo AM, Dwight T, et al. Multiple endocrine tumors associated with germline MAX mutations: Multiple endocrine neoplasia type 5? *J Clin Endocrinol Metab* (2021) 106(4):1163–82. doi: 10.1210/clinem/dgaa957
- Thakker RV. Genetics of parathyroid tumours. *J Intern Med* (2016) 280(6):574–83. doi: 10.1111/joim.12523
- Simonds WF, James-Newton LA, Agarwal SK, Yang B, Skarulis MC, Hendy GN, et al. Familial isolated hyperparathyroidism: A case series and a narrative review of 36 kindreds. *Medicine* (2002) 81(1):1–26. doi: 10.1097/00005792-200201000-00001
- Simonds WF, Robbins CM, Agarwal SK, Hendy GN, Carpten JD, Marx SJ. Familial isolated hyperparathyroidism is rarely caused by germline mutation in HRPT2, the gene for the hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* (2004) 89(1):96–102. doi: 10.1210/jc.2003-030675
- Pontikides N, Karras S, Kaprara A, Anagnostis P, Mintzioti G, Goulis DG, et al. Genetic basis of familial isolated hyperparathyroidism: A case series and a narrative review of the literature. *J Bone Miner Metab* (2014) 32(4):351–66. doi: 10.1007/s00774-013-0551-9
- Guan B, Welch JM, Sapp JC, Ling H, Li Y, Johnston JJ, et al. GCM2-activating mutations in familial isolated hyperparathyroidism. *Am J Hum Genet* (2016) 99(5):1034–44. doi: 10.1016/j.ajhg.2016.08.018
- Marx SJ, Goltzman D. Evolution of our understanding of the hyperparathyroid syndromes: A historical perspective. *J Bone Mineral Res John Wiley Sons Inc.*; (2019) 34:22–37. doi: 10.1002/jbmr.3650
- el Lakis M, Nockel P, Gaitanidis A, Guan B, Agarwal S, Welch J, et al. Probability of positive genetic testing results in patients with family history of primary hyperparathyroidism. *J Am Coll Surg* (2018) 226(5):933–8. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2018.01.007
- Warner J, Epstein M, Sweet A, Singh D, Burgess J, Stranks S, et al. Genetic testing in familial isolated hyperparathyroidism: Unexpected results and their implications. *J Med Genet* (2004) 41(3):155–60. doi: 10.1136/jmg.2003.016725
- Pardi E, Marcocci C, Borsari S, Saponaro F, Torregrossa L, Tancredi M, et al. Aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) mutations occur rarely in sporadic parathyroid adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* (2013) 98(7):2800–10. doi: 10.1210/jc.2012-4029
- Suzuki Y, Sawada H, Tokumasu T, Suzuki S, Ninomiya S. Novel TRPV6 mutations in the spectrum of transient neonatal hyperparathyroidism. *J Physiol Sci* (2020) 70(1):33. doi: 10.1186/s12576-020-00761-2
- Jha S, Simonds WF. Molecular and Clinical Spectrum of Primary Hyperparathyroidism The symptoms of PHPT can be non-specific, potentially delaying the diagnosis. *Jha: Endocr Rev*. 24:bnad009. doi: 10.1210/endoev/bnad009
- Cetani F, Pardi E, Ambrogini E, Lemmi M, Borsari S, Cianferotti L, et al. Genetic analyses in familial isolated hyperparathyroidism: Implication for clinical assessment and surgical management. *Clin Endocrinol (Oxf)*. (2006) 64(2):146–52. doi: 10.1111/j.1365-2265.2006.02438.x
- Pardi E, Borsari S, Saponaro F, Bogazzi F, Urbani C, Mariotti S, et al. Mutational and large deletion study of genes implicated in hereditary forms of primary hyperparathyroidism and correlation with clinical features. *PLoS One* (2017) 12(10):e0186485. doi: 10.1371/journal.pone.0186485
- Vierimaa O, Villablanca A, Alimov A, Georgitsi M, Raitila A, Vahteristo P, et al. Mutation analysis of MEN1, HRPT2, CASR, CDKN1B, and AIP genes in primary hyperparathyroidism patients with features of genetic predisposition. *J Endocrinol Invest* (2009) 32:512–8. doi: 10.3275/6107
- Starker LF, Åkerström T, Long WD, Delgado-Verdugo A, Donovan P, Udelsman R, et al. Frequent germ-line mutations of the MEN1, CASR, and HRPT2/CDC73 genes in young patients with clinically non-familial primary hyperparathyroidism. *Horm Cancer*. (2012) 3(1–2):44–51. doi: 10.1007/s12672-011-0100-8
- Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, Poplin R, del Angel G, Levy-Moonshine A, et al. From fastQ data to high-confidence variant calls: The genome analysis toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinf* (2013) 43(1110):1–33. doi: 10.1002/0471250953.bi1110s43
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* (2015) 17(5):405–24. doi: 10.1038/gim.2015.30
- Mizusawa N, Uchino S, Iwata T, Tsuyuguchi M, Suzuki Y, Mizukoshi T, et al. Genetic analyses in patients with familial isolated hyperparathyroidism and hyperparathyroidism-jaw tumour syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. (2006) 65(1):9–16. doi: 10.1111/j.1365-2265.2006.02534.x
- Mariathanas S, Andrews K, Thompson E, Armstrong R, Park SM, Casey R. Genetic testing for hereditary hyperparathyroidism in a large UK cohort. *Endocrine Abstracts* (2019) 93(4):409–18. doi: 10.1530/endoabs.63.OC1.1
- el Allali Y, Hermetet C, Bacchetta J, Amouroux C, Rothenbuhler A, Porquet-Bordes V, et al. Presenting features and molecular genetics of primary hyperparathyroidism in the paediatric population. *Eur J Endocrinol* (2021) 184(2):347–55. doi: 10.1530/EJE-20-1119
- Erickson LA, Mete O, Juhlin CC, Perren A, Gill AJ. Overview of the 2022 WHO classification of parathyroid tumors. *Endocrine Pathol* (2022) 33:64–89. doi: 10.1007/s12022-022-09709-1
- Eastell R, Brandi ML, Costa AG, D'Amour P, Shoback DM, Thakker RV. Diagnosis of asymptomatic primary hyperparathyroidism: Proceedings of the fourth international workshop. *J Clin Endocrinol Metab* (2014) 99(10):3570–9. doi: 10.1210/jc.2014-1414
- Chou YHW, Pollak MR, Brandi ML, Toss G, Arnqvist H, Atkinson AB, et al. Mutations in the human ca^{2+} -sensing-receptor gene that cause familial hypocalciuric hypercalcemia. *Am J Hum Genet* (1995) 56(5):1075–9.
- Hannan FM, Nesbit MA, Zhang C, Cranston T, Curley AJ, Harding B, et al. Identification of 70 calcium-sensing receptor mutations in hyper- and hypocalcaemic patients: Evidence for clustering of extracellular domain mutations at calcium-binding sites. *Hum Mol Genet* (2012) 21(12):2768–78. doi: 10.1093/hmg/dd105
- Rotundo G, Turco EM, Ruotolo G, Torrente I, Candido O, Lopez G, et al. Generation of an induced pluripotent stem cell line CSSi015-A (9553), carrying a point mutation c.2915C > T in the human calcium sensing receptor (CasR) gene. *Stem Cell Res* (2023) 67:103023. doi: 10.1016/j.scr.2023.103023

40. Burski K, Torjussen B, Paulsen AQ, Boman H, Bollerslev J. *Parathyroid adenoma in a subject with familial hypocalciuric hypercalcemia: Coincidence or causality?* (2002). Available at: <https://academic.oup.com/jcem/article/87/3/1015/2846641>.
41. Elizabeth Forde H, Hill AD, Smith D. *Parathyroid adenoma in a patient with familial hypocalciuric hypercalcaemia* (2014). Available at: <http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions>.
42. Mouly C, Vargas-Poussou R, Lienhardt A, Silve C, Hureaux M, Magdelaine C, et al. Clinical characteristics of familial hypocalciuric hypercalcaemia type 1: A multicentre study of 77 adult patients. *Clin Endocrinol (Oxf)*. (2020) 93(3):248–60. doi: 10.1111/cen.14211
43. Thakker RV. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) and type 4 (MEN4). *Mol Cell Endocrinology*. (2014) 386:2–15. doi: 10.1016/j.mce.2013.08.002
44. Suzuki Y, Chitayat D, Sawada H, Deardorff MA, McLaughlin HM, Begtrup A, et al. TRPV6 variants interfere with maternal-fetal calcium transport through the placenta and cause transient neonatal hyperparathyroidism. *Am J Hum Genet [Internet]*. (2018) 102(6):1104–14. doi: 10.1016/j.ajhg.2018.04.006
45. Nett V, Erhardt N, Wyatt A, Wissenbach U. BBA - General Subjects Human TRPV6-pathies caused by gene mutations. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* (2021) 1865 (6):129873. doi: 10.1016/j.bbagen.2021.129873
46. Khattar V, Wang L, Peng JB. Calcium selective channel TRPV6: Structure, function, and implications in health and disease. *Gene* (2022) 817:146192. doi: 10.1016/j.gene.2022.146192
47. Lagarde A, Mougél G, Coppin L, Haissaguerre M, Le Collen L, Mohamed A, et al. Systematic detection of mosaicism by using digital NGS reveals three new MEN1 mosaicisms. *Endocr Connect* (2022) 11(11):e220093. doi: 10.1530/EC-22-0093
48. Cetani F, Marcocci C, Torregrossa L, Pardi E. Atypical parathyroid adenomas: Challenging lesions in the differential diagnosis of endocrine tumors. *Endocrine-Related Cancer* (2019) 26:R441–64. doi: 10.1530/ERC-19-0135
49. Alberto F. Genetics of parathyroids disorders: Overview. *Best Pract Research: Clin Endocrinol Metab* (2018) 32:781–90. doi: 10.1016/j.beem.2018.09.011
50. Newey PJ. Hereditary primary hyperparathyroidism. *Endocrinol Metab Clinics North America* (2021) 50:663–81. doi: 10.1016/j.eccl.2021.08.003

5. RESUM GLOBAL DELS RESULTATS

A la primera publicació del nostre projecte s'exposen els casos de tres pacients que presenten variants en línia germinal, prèviament no descrites a la literatura, en dos gens de la família d'inhibidors de quinasa dependents de ciclina o *CDKIs*. Als tres individus, que no tenien cap relació entre ells, se'ls havia fet un cribratge genètic per sospita d'hiperparatiroidisme familiar, atès que presentaven un HPP amb alguna característica de risc. Es va obtenir informació clínica tant d'ells com dels seus familiars de primer grau mitjançant l'anamnesi i la revisió de la història clínica hospitalària. A banda de l'estudi genètic de variants en línia germinal de gens relacionats amb l'HPPF, també es va fer un estudi de pèrdua d'heterozigosi (LOH) i de CNV en teixit tumoral així com una anàlisi immunohistoquímica (vegeu la Taula 5).

Taula 5: característiques clíniques dels casos índex. V: classificació de les variants segons les guies ACMG; LOH/UPD: pèrdua d'heterozigosi/disomia uniparental; Ca màx: calcèmia màxima prequirúrgica (Rang de normalitat o RN 8,4-10,2 mg/dL¹); PTH màx: parathormona màxima en plasma prequirúrgica (RN 10-65 pg/mL); HP: histologia paratiroidal; TC-TA: tomografia computeritzada toracoabdominal; CgA: cromogranina A (RN < 100 µg/L); Prl: prolactina (RN 4,04-15,2 ng/mL); gastr: gastrina (RN 13-115 pg/mL); CLU: cortisol lliure urinari (RN 36-137 pg/24h), FSH: hormona estimulant del fol·licle (RN: 1.5-12.4 UI/L); LH: hormona luteïnitzant (RN: 1.7-8.6 UI/L); T(t): testosterona total (RN: 1,93-7,4 ng/mL); T(f): testosterona lliure (RN: 6,1-25,7 pg/mL); IGF1: factor de creixement semblant a la insulina 1 (RN: 58-204 ng/mL).

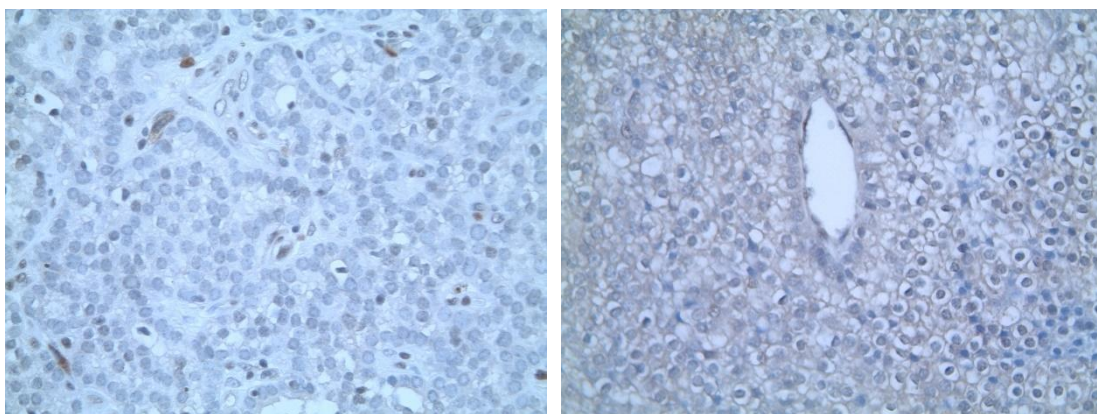
	Variant	V	LOH/ UPD	Història de l'HPP			Cribratge de tumors associats un cop fet el diagnòstic genètic			Altres antecedents patològics
				Ca màx	PTH màx	HP	RM hipofi- siària	TC- TA	Alteracions analítiques	
Cas 1 (ID18)	<i>CDKN1B</i> c.280_281d elinsG, p.(Pro94Al afs*25)	LP	No	13,6	520	TPA	Manca de senyal de la neurohip òfisi	Hiperpl àsia supraren al Quists renals bilaterals	CgA: 493,9 µg/L	Adenoma tubulo-vellós de còlon amb displàsia de baix grau Lipomes atípics Obesitat DM2 Hipotiroidisme primari
Cas 2 (ID29)	<i>CDKN1B</i> c.169C>T, p.(Gln57*)	P	No	13,5	3574	MMG: tres glàndul es amb hiperpl àsia i un TPA	Normal	Normal	CgA: 1947,1 µg/L Gastr: 278,2 pg/mL Prl: 138 ng/mL FSH: 106 UI/L LH: 79,4 UI/L T(t): 1,22 ng/mL T(f): 3,1 pg/mL IGF1: 45 ng/mL	Hipotiroidisme subclínic Obesitat Població de cèl·lules T aberrant Polineuropati a axonal crònica idiopàtica
Cas 3 (ID27)	<i>CDKN2C</i> c.319T>G, p.(Leu107 Val)	VUS	Sí	11,4	89	MMG: dos adeno mes paratir oidals (un d'ells quístic)	Microade noma quístic	Normal	CgA 110,3 µg/L Prl 36 ng/mL CLU 225,5 pg/24h	Leiomiomes uterins Quists ovàrics bilaterals

¹ En les dues publicacions es van utilitzar les unitats del Sistema Internacional per tots els paràmetres analítics inclosos. En el manuscrit de la tesi, però, s'han conservat les unitats convencionals, que són les proporcionades originàriament pel laboratori del nostre centre hospitalari.

El **primer cas** era un home de 47 anys amb hiperparatiroidisme primari que va ser diagnosticat arran d'haver-se notat un nòdul cervical, orientat com a lesió d'origen paratiroidal mitjançant l'ecografia cervical. Com a antecedents patològics presentava obesitat, síndrome d'apnea obstructiva de la son, hipotiroidisme primari, lipomes atípics i un adenoma tubulovellós de còlon amb displàsia de baix grau. Atès el grau d'hipercalcèmia, que va arribar a 13,6 mg/dL (rang de normalitat o RN 8,4-10,2), i l'edat del pacient, es va realitzar una paratiroidectomia de la glàndula afectada, amb resolució de la hipercalcèmia i descens dels nivells de PTH (de 520,5 a 65 pg/mL, RN 10-65)². La histologia va ser compatible amb un tumor paratiroidal atípic de 15,9 grams i de mida 4.5 × 3.5 × 2.5 cm.

Tenint en compte la histologia paratiroidal de risc, es va realitzar un estudi genètic dels gens relacionats amb l'HPPE, que va identificar una variant LP a *CDKN1B* (NM_004064.4) c.280_281delinsG, p.(Pro94Alafs*25), prèviament no descrita a la literatura. Es tracta d'una variant en línia germinal, en heterozigosi, de desfasament que prediu una pèrdua del funcionament normal de la proteïna p27. L'anàlisi de l'ADN tumoral no va mostrar LOH ni CNV i l'estudi immunohistoquímic de la peça quirúrgica paratiroidal va mostrar una pèrdua d'expressió nuclear de la p27 a les cèl·lules neoplàsiques (vegeu la Figura 2). Així, vam diagnosticar el pacient de síndrome de MEN4 i vam fer les proves pertinents per descartar altres afectacions associades a la malaltia. Tan sols es van fer troballes inespecífiques i, *a priori*, sense relació amb l'afectació genètica mencionada, com una hiperplàsia suprarenal dreta, uns quists renals bilaterals i una elevació inespecífica i puntual dels nivells de cromogranina A sense altres anomalies de laboratori associades. Vam oferir consell genètic al pacient i estudi de segregació familiar, però no presentava familiars de primer grau vius (vegeu la Figura 3). A mode anecdòtic, es va poder fer un estudi genètic de l'ADN de la seva mare, que havia mort anys enrere degut a una neoplàsia de còlon, i es va veure que era portadora de la mateixa variant a *CDKN1B* que el seu fill. Desconeixem si presentava alguna comorbiditat associada a MEN4, però mitjançant la història clínica vam poder comprovar que havia patit d'hipercalcèmia en alguna ocasió.

Figura 2: estudi immunohistoquímic amb p27/kip1 dels adenomes paratiroidals dels casos 1 (esquerra) i 2 (dreta). Absència d'expressió nuclear a les cèl·lules paratiroidals. 400x



El **segon cas** reportat era un home de 57 anys amb malaltia renal crònica terminal en tractament amb hemodiàlisi causada per una nefropatia intersticial. Com a altres comorbiditats, presentava una

² La primera publicació inclou una errata en la conversió de les unitats de la PTH de pg/mL a pmol/L. A la *Table 1*, els valors de la columna de PTH max s'haurien de canviar per 55.24, 379.1 i 9.43, respectivament.

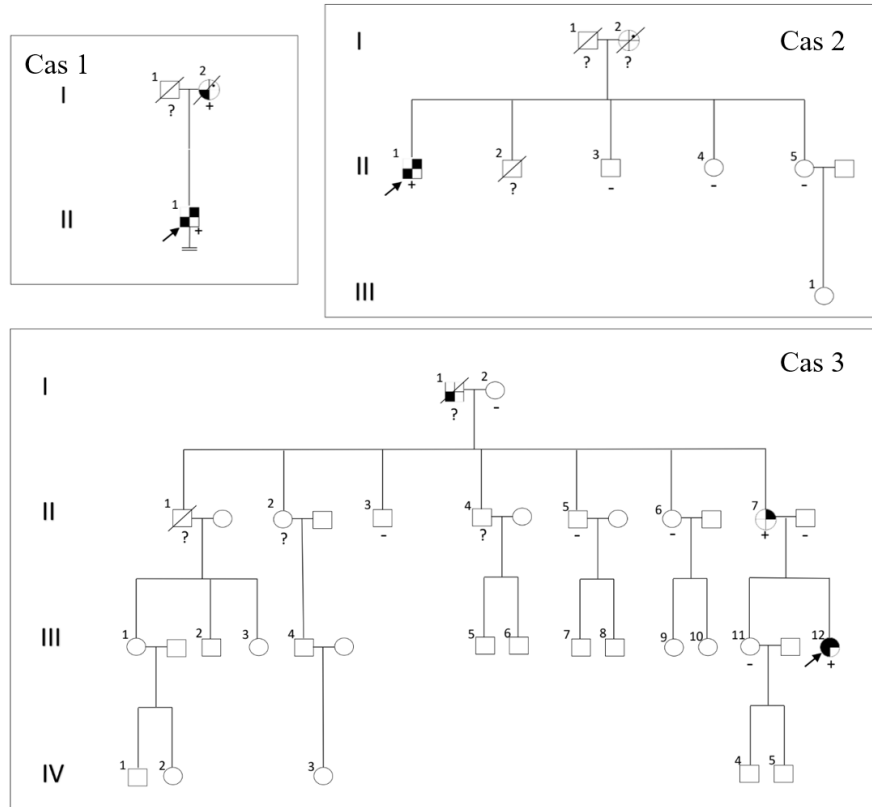
polineuropatia axonal crònica idiopàtica, una població de cèl·lules T aberrant, una obesitat de grau 2 i un hipotiroidisme subclínic. Va ser diagnosticat d'hiperparatiroidisme, en principi terciari, sis anys després d'haver-se detectat la malaltia renal crònica. Tanmateix, segons la història clínica, havia patit en diverses ocasions de nefrolitiasis i d'infeccions urinàries complicades, i per això no es podia descartar un origen primari de l'hiperparatiroidisme que no hagués estat diagnosticat fins que la funció renal hagués estat deteriorada. Mitjançant l'ecografia cervical es va identificar un nòdul hipoeoic que no s'observava amb la gammagrafia amb Tc99-sestamibi. Així, es va decidir fer una exploració cervical bilateral i completar una paratiroidectomia total. Un cop operat, hi va haver una normalització dels nivells de calci plasmàtic. L'anatomia patològica va mostrar tres glàndules amb hiperplàsia³ i una quarta compatible amb un tumor paratiroidal atípic d'1,7 grams.

Pel fet d'haver estat diagnosticat d'hiperparatiroidisme en edat jove i per presentar malaltia multiglandular, així com un TPA, es va fer un estudi genètic per sospita d'HPPF. Aquest va identificar una variant a *CDKN1B* (NM_004064.4), c.169C>T, p.(Gln57*), anteriorment no reportada a la literatura mèdica. Aquesta variant és de tipus sense sentit i prediu una pèrdua de funció de la proteïna P27. En un principi, va ser classificada com a LP, però posteriorment s'ha reclassificat a patògena segons les guies ACMG. L'estudi genètic inicial es va realitzar per mitjà d'ADN obtingut de sang perifèrica, però, tenint en compte que el pacient presentava una població de cèl·lules T aberrant, i algunes variants en *CDKN1B* s'han associat a hemopaties malignes, es va repetir l'anàlisi genètica amb ADN obtingut de diferents teixits del pacient (còlon, tiroides i saliva). D'aquesta manera es va poder confirmar l'origen germinal de la mutació. L'estudi de l'ADN en teixit tumoral paratiroidal no va evidenciar LOH ni CNV. I, en l'àmbit immunohistoquímic, les cèl·lules paratiroidals del TPA presentaven una manca de tinció nuclear amb p27 (vegeu la Figura 2).

Atès el quadre clínic del pacient i el resultat genètic obtingut, vam establir el diagnòstic de síndrome de MEN4. Seguint les recomanacions suggerides per a aquesta patologia, vam fer un cribratge per descartar altres possibles neoplàsies associades a la malaltia. En aquest cas, el pacient va presentar nivells de cromogranina A i de gastrina elevats, però sense clínica suggestiva de gastrinoma i amb proves d'imatge negatives, motiu pel qual aquests resultats es van orientar com a secundaris al tractament amb inhibidors de la bomba de protons i a la malaltia renal avançada. També vam observar uns nivells elevats de prolactina, una somatomedina disminuïda i un patró d'hipogonadisme hipergonadotrop, situacions que vam atribuir a la presència d'una insuficiència renal crònica avançada, si tenim en compte que la ressonància hipofisiària no mostrava alteracions. L'estudi genètic dels familiars va excloure que dos germans del cas índex fossin portadors de la mateixa variant, fet que no permetia descartar que la mutació del pacient fos *de novo* (vegeu la Figura 3).

³ Com s'ha comentat a la introducció, el terme 'hiperplàsia' per fer referència a la MMG causant d'un hiperparatiroidisme primari està ja en desús. Tanmateix, en aquest manuscrit i en les publicacions que hi inclou s'ha seguit utilitzant, ja que els estudis histològics van ser anteriors a la data del canvi de terminologia (32).

Figura 3: arbre genealògic dels casos índex. La generació s'indica amb números romans i els individus de cadascuna amb numeració aràbiga; Les fletxes indiquen els casos índex de cada família; cercle: dona; quadrat: home; doble línia sota un individu: absència de descendència; símbol tatxat: èxitus; +: portador de la mutació; -: estudi genètic negatiu; ?: estudi genètic no realitzat; símbol buit: individu asimptomàtic; quadrant superior dret marcat: hiperparatiroidisme; punt superior dret: antecedent de nefrolitiasi, de còlic renal o d'hipercalcèmia; quadrant superior esquerre ple: adenoma hipofisiari; quadrant inferior dret ple: tumor neuroendocrí; quadrant inferior esquerre ple: altres tumors.

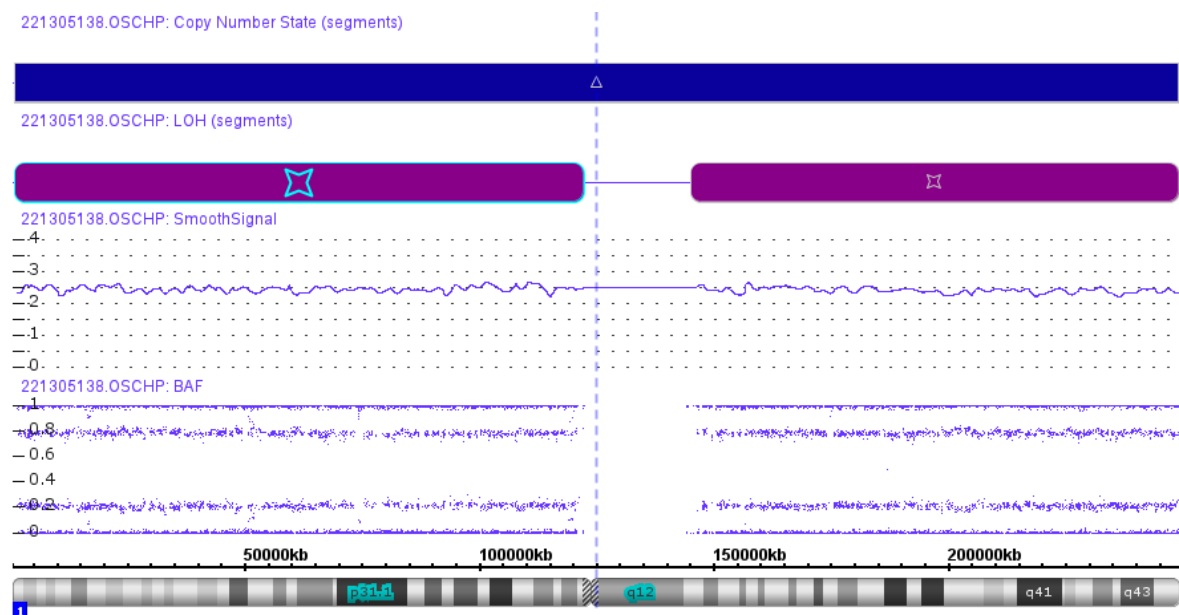


El **tercer cas** clínic corresponia a una pacient de 44 anys amb HPP diagnosticat quan tenia 28 anys arran de notar-se un bony cervical. Els estudis d'imatge van mostrar un nòdul d'1,1 cm posterior al lòbul tiroidal dret, suggestiu de ser paratiroidal, i un nòdul quístic de 3 cm al costat esquerre amb contingut quístic inespecífic. L'anàlisi de sang va detectar una hipercalcèmia amb elevació de la PTH, així que es va decidir fer un tractament quirúrgic. Es va realitzar una exploració cervical bilateral i es van extreure dues glàndules, ambdues compatibles amb adenomes paratiroidals, un d'ells de tipus quístic. Després d'anys de seguiment, no hi va haver recidiva de l'hiperparatiroidisme. Pel fet de presentar una histologia paratiroidal de risc i una edat jove al diagnòstic de l'hiperparatiroidisme, es va realitzar un estudi genètic. La pacient era portadora d'una variant en línia germinal en heterozigosi al gen *CDKN2C* (NM_001262.2), c.319T>G, p.(Leu107Val), que va ser classificada com a VUS segons el criteri de les guies ACMG. Els estudis de LOH i CNV del teixit tumoral paratiroidal remès a patologia van mostrar un guany de cromosoma 1 sencer i una disomia uniparental somàtica del cromosoma 1, fet que podria reforçar la patogenicitat de la variant (vegeu la Figura 4).

Considerant la troballa d'una variant de significat incert en un gen de la família de les *CDKIs*, es van realitzar proves de laboratori i d'imatge a la pacient per tal de descartar altres possibles lesions

tumorals associades. Es va detectar un microadenoma hipofisiari quístic no funcionant, uns quists ovàrics i també leiomiomes uterins. Així mateix, vam oferir consell genètic a la pacient, però no tenia fills ni desig gestacional. A la seva mare, però, que presentava antecedents de còlics nefrítics, se li va detectar la mateixa variant en línia germinal a *CDKN2C* i un patró bioquímic compatible amb HPP, que prèviament no havia estat diagnosticat. A més, es va diagnosticar d'osteoporosi, per la qual cosa es va decidir tractament quirúrgic de l'hiperparatiroidisme. Es va extreure l'única glàndula paratiroidal afectada, que va ser compatible amb un adenoma paratiroidal. La pacient va presentar criteris de curació postcirurgia. El cribratge genètic d'altres membres de la família va ser negatiu (vegeu la Figura 3).

Figura 4: estudi de variacions en nombre de còpies i pèrdua d'heterozigosi del cas 3. L'estudi de CNV detecta un guany del cromosoma 1 i l'estudi de freqüència al·lèlica-B mostra una disomia uniparental del cromosoma 1 sencer.



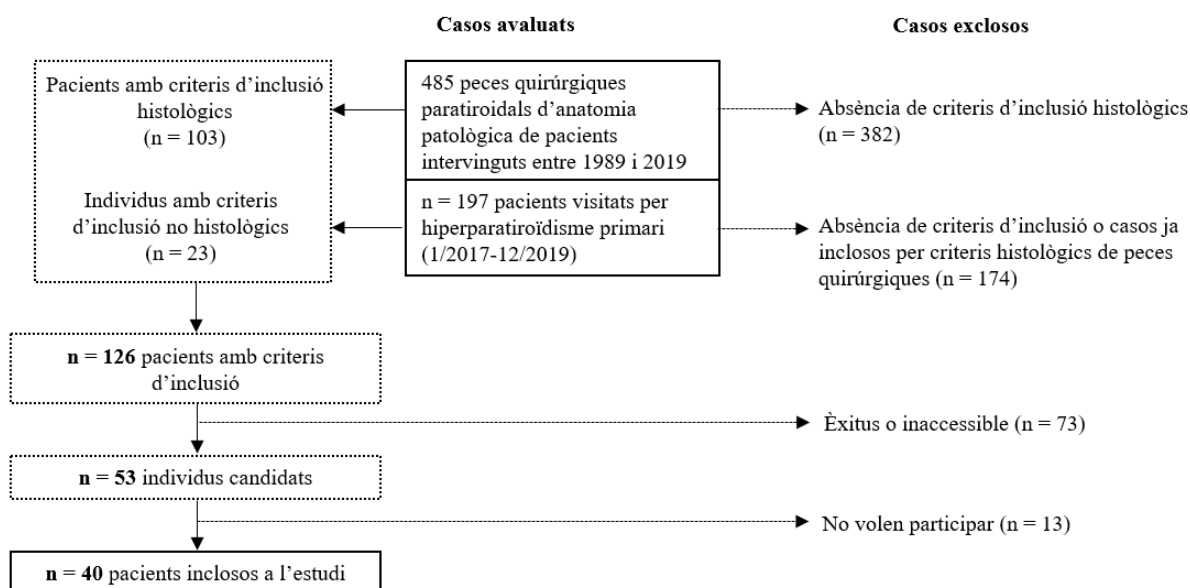
El segon article publicat fa referència a l'estudi principal de la tesi. Es tracta d'un estudi observacional ambispectiu que tenia per objectiu la realització d'un cribratge genètic, mitjançant un panell de gens relacionats amb l'HPPF (*AIP*, *AP2S1*, *CASR*, *CDC73*, *CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN2B*, *CDKN2C*, *GCM2*, *GNA11*, *MEN1*, *PTH*, *RET* i *TRPV6*), a una cohort de pacients amb hiperparatiroidisme primari visitats al nostre centre hospitalari que presentessin alguna característica de risc que orientés a un origen hereditari de la malaltia. El diagnòstic d'HPP s'establia per nivells de PTH sèrica elevats o inadequadament normals per a calcèmies normals o elevades. Els **criteris d'inclusió** a l'estudi van ser:

- 1) Edat al diagnòstic de l'HPP menor o igual a 45 anys.
- 2) Histologia paratiroidal de risc (carcinoma, tumor atípic, adenoma quístic o malaltia multiglandular).
- 3) HPP persistent o recurrent postcirurgia (definit per una hipercalcèmia $\geq 10,5$ mg/dL tres mesos després de la cirurgia paratiroidal).
- 4) Antecedents familiars d'HPP en almenys un familiar de primer grau.
- 5) Presentar algun tumor associat a algun tipus d'HPPF sindròmic (TGEP, adenomes hipofisiaris, tumors mandibulars o maxil·lars, tumors renals o uterins, CMT, neoplàsia de mama, hemopatia maligna o altres).

Com a únic **criteri d'exclusió** es va considerar el fet de ser portador d'alguna mutació ja coneguda en qualsevol dels gens inclosos en el panell de l'estudi o tenir un familiar de primer grau que en presentés.

Per a reclutar els pacients es van usar informes d'anatomia patològica de pacients operats d'hiperparatiroidisme en el nostre centre hospitalari (Hospital Universitari Parc Taulí) entre l'any 1989 i el 2019. A la Figura 5 es pot observar el disseny de l'estudi. D'un total de 485 peces quirúrgiques paratiroidals, 103 complien algun criteri d'inclusió histològic. Al seu torn, també vam revisar les històries clíniques de tots els pacients visitats sota el diagnòstic d'hiperparatiroidisme primari entre gener del 2017 i desembre del 2019, per tal de poder incorporar a l'estudi aquells pacients amb HPP no operats que poguessin complir algun altre criteri d'inclusió. 23/197 complien algun criteri no histològic. Finalment, d'un total de 126 pacients candidats per criteris d'inclusió, 40 van accedir a participar en l'estudi. Per obtenir les dades clíniques de cadascun dels participants es van usar informes clínics i es va realitzar una entrevista presencial, on s'explicava i firmava el consentiment informat i també s'extreia una mostra sanguínia per a l'estudi genètic.

Figura 5: disseny de l'estudi.



Resultats generals

A la Taula 6 s'exposen les característiques clíniques dels participants. La cohort exhibia un predomini de dones i una mitjana d'edat al diagnòstic d'HPP de 51 ± 15.8 anys. Els motius inicials de consulta mèdica pels que cada persona havia acabat diagnosticada d'hiperparatiroidisme eren diversos: un 30% per troballa incidental d'una hipercalcèmia, un 20% per nefrolitiasi simptomàtica, un 17,5% per algun nòdul cervical palpable, un altre 17,5% per símptomes neuromusculars i la resta per altres signes o símptomes (osteoporosi, fractures òssies, etc.). La majoria dels individus reclutats havien estat sotmesos a una cirurgia paratiroidal (80%). Dels pacients operats, els nivells de PTH sèrica màxima prequirúrgics eren de 161 pg/mL (81-3575)⁴, la calcèmia màxima d'11,3 mg/dL (9,5-17,4) i la fosfatèmia mínima de 2,3 mg/dL (1,3-8) (RN 2,7-4,5).

La classificació dels participants segons quin o quins criteris d'inclusió complien va ser la següent: quinze individus amb una edat < de 45 anys en el moment del diagnòstic de l'HPP, 28 casos presentaven criteris histològics de risc (un carcinoma paratiroidal, onze tumors paratiroidals atípics, sis adenomes paratiroidals quístics i cinc casos amb malaltia multiglandular), quatre individus havien tingut una recurrència de l'hiperparatiroidisme després de la cirurgia, dos pacients tenien antecedents familiars d'HPP i set casos presentaven algun tumor que pogués estar associat amb un HPPF sindròmic. Un terç dels participants complia dos o més criteris d'inclusió. En valors absoluts, és a dir, incloent aquells pacients que complien més d'un criteri d'inclusió a les categories corresponents, es va observar que el criteri predominant era l'edat, seguit de criteris histològics com el tumor paratiroidal atípic i la malaltia multiglandular (vegeu la Taula 6).

Taula 6: variables clíniques dels 40 participants de la cohort. Les dades de laboratori s'expressen amb la mediana i el rang total (valors mínim i màxim). PTH màx: nivells plasmàtics de

⁴ Els valors de PTH màxima, de calcèmia màxima i de fosfatèmia mínima s'expressen amb mediana i rang total (valors mínim i màxim).

parathormona màxims abans de la cirurgia o durant el seguiment clínic en els pacients no operats; P mín: fosfatèmia mínima; *Classificació dels participants segons els criteris d'inclusió, integrant els pacients que complien dos o més criteris dins les categories corresponents. **Pacients que presentaven algun tumor associat suggestiu d'un HPPF sindròmic, amb el seu número identificatiu de participant entre parèntesis: un prolactinoma (ID3), un adenoma hipofisiari productor de GH (ID5 i ID19), un carcinoma renal de cèl·lules clares (ID14), un limfoma limfoblàstic (ID22), una població de cèl·lules T aberrant (ID29), un tumor neuroendocrí duodenal metastàtic, un melanoma i un angiomiolipoma renal (ID33).

Variables clíniques dels participants (n = 40)		
Edat mitjana al diagnòstic de l'hiperparatiroidisme (anys)	51 ± 15,8	
Sexe: dona/home, n (%)	27 (68%) / 13 (32%)	
Presentació clínica de l'hiperparatiroidisme	Trobada incidental d'una hipercalcèmia	n = 12 (30%)
	Litiasi renal	n = 8 (20%)
	Palpació d'un bony cervical	n = 7 (17,5%)
	Síntomes neuromusculars	n = 7 (17,5%)
	Altres signes/síntomes (osteoporosis, fractures, etc.)	n = 6 (15%)
Pacients intervinguts quirúrgicament, n (%)	n = 32 (80%)	
PTH màx precirurgia (pg/mL)	161 (81-3575)	
Calci màx ajustat precirurgia (mg/dL)	11,3 (9,5-17,4)	
P mín precirurgia (mg/dL)	2,3 (1,3-8)	
Criteris d'inclusió (indicació de test genètic)	Classificació dels participants segons els criteris d'inclusió	Valors absoluts*
	Edat ≤ 45 anys	7 (18%) 15 (37,5%)
	Carcinoma paratiroidal	0 (0%) 1 (2,5%)
	Tumor paratiroidal atípic	6 (15%) 11 (27,5%)
	Adenoma paratiroidal quístic	2 (5%) 6 (15%)
	Malaltia multiglandular	4 (10%) 10 (25%)
	Hiperparatiroidisme recurrent tres mesos després de la cirurgia	2 (5%) 4 (10%)
	Antecedents familiars d'HPP	2 (5%) 2 (5%)
	Presència d'altres tumors suggestius d'un HPPF sindròmic**	4 (10%) 7 (17,5%)
	Dos o més criteris d'inclusió	13 (32%)

Dels 40 pacients sotmesos a l'estudi, l'anàlisi genètica va identificar un total de nou variants en nou individus diferents (9/40, 22,5%). D'aquestes, cinc van ser classificades com a patogèniques o probablement patogèniques (tres a *CASR* i dos a *CDKN1B*) i quatre, de significat incert o de classe 3 (una a *CDKN2C*, una a *CASR* i una a *TRPV6*). Quant al tipus de variants, una va ser de desfasament, una altra sense sentit i la resta amb error de sentit. A la Taula 7 s'exposen les característiques clíniques i genètiques dels individus portadors d'alguna de les variants identificades a l'estudi.

Taula 7: característiques clíniques i genètiques dels participants portadors de variants germinals en algun dels gens estudiats mitjançant el panell. ID: número d'identificació de cada participant de la cohort; **edat:** anys amb què es va fer el diagnòstic de l'HPP; **D:** dona; **H:** home; **Ca Pre/Post (mg/dL):** calci plasmàtic corregit per albúmina pre i postquirúrgic (RN 8,4-10,2); **PTH Pre/Post (pg/mL):** nivells de PTH pre i postquirúrgic (RN 10-65); **Cr:** creatinina sèrica en el moment del diagnòstic de l'hiperparatiroidisme (RN 0,5-0,9 mg/dL); **NA:** no avaluat; ***Criteris d'inclusió per a l'estudi genètic:** 1) edat ≤ 45 anys; 2) carcinoma paratiroidal; 3) tumor paratiroidal atípic; 4) adenoma quístic; 5) malaltia multiglandular; 6) hiperparatiroidisme recurrent tres mesos postcirurgia; 7) antecedents familiars d'HPP; 8) tumor associat suggestiu d'HPPF sindròmic; 9) dos o més criteris d'inclusió.

ID	Edat	Sexe	Gen	Variant	Tipus de variant	V	Classificació de l'ACMG	Prèviament reportada (gnomAD / Pubmed)	Ca Pre/Post	PTH Pre/Post	Cr	CCCR	Criteris d'inclusió*	Histologia	Pes tumoral (g)	Familiars portadors de la variant identificats
18	47	H	CDKN1B	c.280_281delinsG, p.(Pro94Alafs*25)	Frameshift	LP	PVS1 (molt fort) PM2 (suggestiu)	No / No	13,6 / 8,8	520 / 65	1,07	NA	3	TPA	15,7	Mare (neoplàsia de colon)
29	34	H	CDKN1B	c.169C>T, p.(Gln57*)	Nonsense	P	PVS1 (molt fort) PM2 (moderat)	No / No	13,5 / 8,6	3575 / 59	2,20	0,010	9 (1, 3, 5, 8)	MMG: tres glàndules amb hiperplàsia i un TPA	1,7	Cap
27	28	D	CDKN2C	c.319T>G, p.(Leu107Val)	Missense	VUS	PM2 (moderat)	0.0036% / No	11,4 / 7,9	89 / 43	0,90	0,030	9 (1, 4)	MMG: dos adenomes (un d'ells quístic)	0,1	Mare (HPP)
15	77	H	CASR	c.1172T>G, p.(Phe391Cys)	Missense	LP	PM2 (moderat) PP3 (suggestiu) PP2	No / No	16,5 / 6,7	2008 / 32	1,07	0,005	9 (3, 4, 5)	MMG: un TPA (amb cèl·lules quístiques) i una glàndula hiperplàsica	1,33	Fill (HPP assintomàtic)
21	49	H	CASR	c.413C>T, p.(Thr138Met)	Missense	P	PM1 (moderat), PP2 (suggestiu), PM2 (moderat), PP3 (suggestiu), PP5 (fort)	No / Sí	12,5 / -	145 / -	0,80	0,004	7	-	NA	Filla (HPP simptomàtic, però estudi genètic no realitzat)
24	64	D	CASR	c.2393C>T, p.(Pro798Leu)	Missense	LP	PM1 (moderat), PP2 (suggestiu), PM2 (moderat), PP3 (suggestiu), PP5 (fort)	No / Sí	11,2 / 9,4	130 / 73	0,46	0,013	9 (5, 6)	MMG: tres glàndules amb lipohiperplàsia	0,28	Tres fills (HPP assintomàtic)
31	75	D	CASR	c.175G>A, p.(Glu59Lys)	Missense	VUS	PM1 (suggestiu), PM2 (suggestiu), BP4 (moderat)	No / No	9,8 / 9,3	114 / 82	1,02	0,011	5	MMG: dues glàndules amb hiperplàsia	0,08	Tres germans (HPP normocalcèmic)
4	41	H	TRPV6	c.1937G>A, p.(Arg646Gln)	Missense	VUS	PM2 (moderat)	0,0032% / No	13,2 / 9,7	150 / 35	0,91	0,011	1	Adenoma	0,4	Pare (HPP lleu)
30	35	D	TRPV6	c.787G>A, p.(Asp263Asn)	Missense	VUS	PM2 (moderat)	0,0415% / No	11,02 / -	147 / -	0,62	0,010	1	-	-	NA

Variants a CASR

Es van identificar quatre portadors de variants amb error de sentit en heterozigosi en el gen *CASR* (dues LP, una patogènica i una VUS), així que se'ls va diagnosticar d'hipercalcèmia hipocalciúrica familiar tipus 1. Dues d'aquestes variants havien estat reportades prèviament a la literatura (les trobades en els casos ID21 i ID24) i les altres no havien estat descrites amb anterioritat. D'aquests quatre pacients, tres havien estat sotmesos a cirurgia paratiroidal mitjançant una exploració bilateral. La CCCR era menor a 0,01 en dos d'ells i entre 0,01 i 0,02 en els altres dos casos (vegeu la Taula 7). El **cas ID15** havia estat diagnosticat d'hiperparatiroidisme quan tenia 77 anys arran d'una hipercalcèmia greu que va requerir ingrés hospitalari i, sota la sospita d'un adenoma paratiroidal quístic per imatge, es va intervenir quirúrgicament. L'anatomia patològica va ser compatible amb una MMG a expenses d'un TPA amb cèl·lules quístiques i una glàndula paratiroidal amb hiperplàsia. Un cop operat, el pacient es va mantenir asimptomàtic, normocalcèmic i amb uns nivells de PTH dins el rang de la normalitat fins a la data actual, és a dir, curat de l'hiperparatiroidisme. Després de la detecció de la variant LP c.1172T>G, p.(Phe391Cys) a *CASR* (NM_000388.3), es va fer l'estudi genètic als seus familiars de primer grau. Dos fills del pacient eren portadors de la mateixa variant i un d'ells presentava hipercalcèmia (vegeu la Figura 6).

Els **casos ID24 i ID31** havien estat diagnosticats d'un HPP arran de l'estudi per presentar osteoporosi (definida per una T-score < -2,5). Les dues pacients havien estat reclutades per a l'estudi per presentar una MMG, a més de recurrència de la malaltia en el cas ID24. El cas ID31 havia presentat, a més, una fractura de Colles. En ambdós casos les proves de localització van observar una única lesió paratiroidal. No obstant això, ambdues pacients van ser sotmeses a una exploració cervical bilateral i a una paratiroidectomia subtotal, ja que durant la cirurgia es va observar més d'una glàndula paratiroidal augmentada de mida. El diagnòstic histològic va ser de MMG en tots dos casos: tres glàndules amb lipohiperplàsia en el cas ID24 i dues glàndules amb hiperplàsia en el cas ID31. Durant el seguiment postcirurgia, el cas ID24 va presentar una persistència de criteris bioquímics d'HPP, a diferència de la pacient ID31, que va normalitzar els valors de PTH amb el temps (58 pg/mL a l'any de la cirurgia). Tanmateix, la densitometria òssia va presentar una millora en totes dues pacients un cop operades: un augment del 8,2% i de l'1,9% de la DMO a columna lumbar i a fèmur proximal, respectivament, en el cas ID31, i un augment del 12,2%, del 5% i del 6,7% a columna lumbar, fèmur proximal i radi en el cas ID24. Quan es van detectar les variants c.2393C>T, p.(Pro798Leu) i c.175G>A, p.(Glu59Lys) a *CASR* (NM_000388.3) als casos ID24 i ID31, respectivament, es va oferir assessorament genètic i la realització de l'estudi genètic i el seguiment clínic als seus familiars de primer grau. Diferents membres de les dues famílies van resultar ser portadors de les variants a *CASR* i també presentar diferents graus d'hiperparatiroidisme analíticament. D'aquesta manera, es va observar com les dues variants segregaven amb la malaltia en ambdues famílies, respectivament (a excepció de l'individu II-1 de la família de la ID31) (vegeu la Figura 6).

El **cas ID21** va participar en l'estudi per tenir l'antecedent d'una filla amb HPP. Ell presentava, a més de criteris bioquímics d'HPP, osteoporosi i antecedents personals de còlics nefrítics. L'estudi va detectar una variant patogènica a *CASR* (NM_000388.3), c.413C>T, p.(Thr138Met), per la qual cosa es va orientar el pacient com a HHF tipus 1. La CCCR era menor a 0,01. Les proves de localització cervicals no van mostrar cap glàndula augmentada de mida. Així, es va optar per un tractament mèdic amb cinacalcet. D'aquesta manera els nivells de calcèmia van millorar de 12,5 a 11 mg/dL. No es va poder fer l'estudi genètic de la filla per manca de col·laboració.

Variants a *CDKIs*

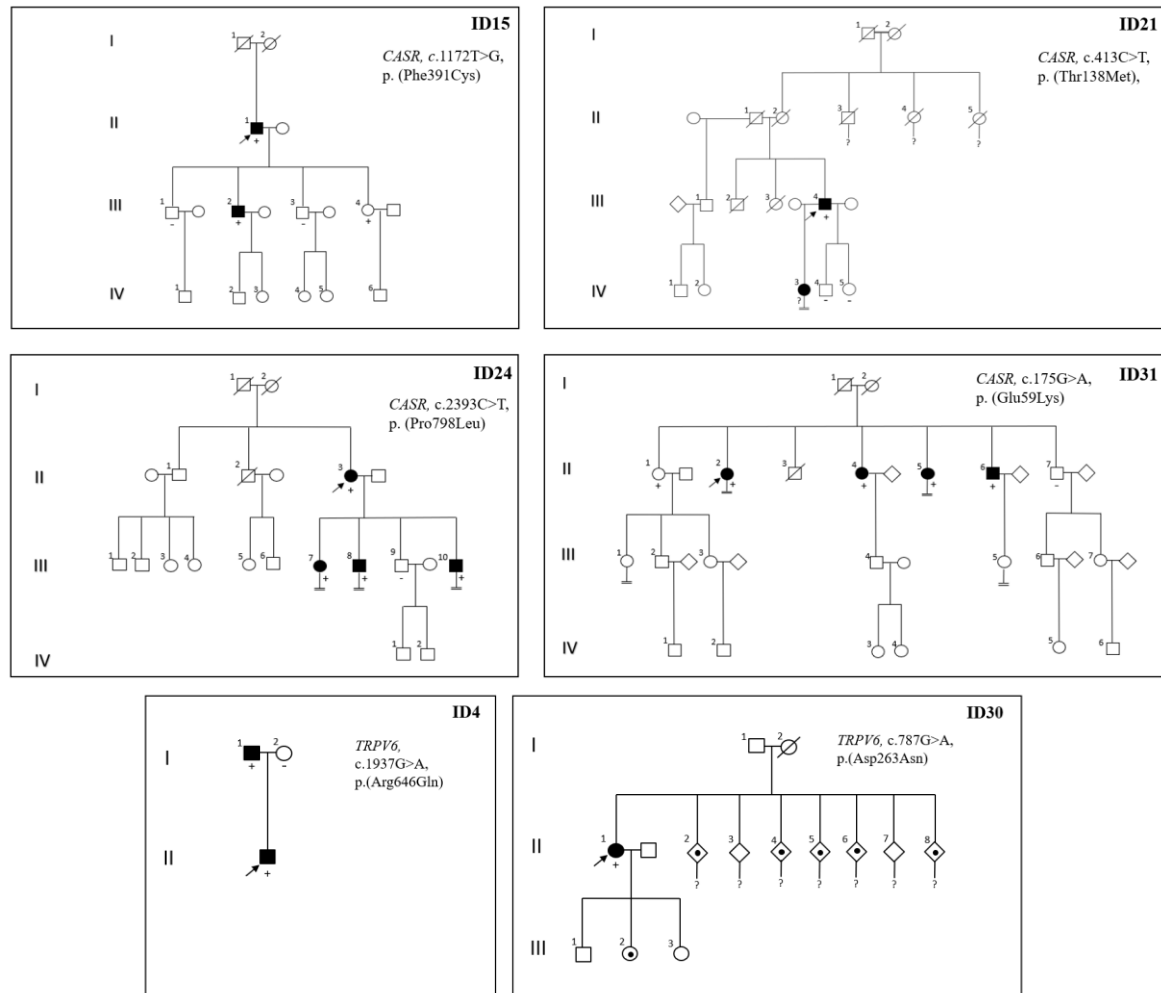
A l'estudi es van detectar tres variants en línia germinal en dos gens de la família de *CDKIs* en tres individus: una variant classificada com a VUS a *CDKN2C* (**cas ID27**) i dues com a probablement patogèniques a *CDKN1B* (**individus ID18 i ID29**) (vegeu la Taula 7). Els criteris d'inclusió a l'estudi d'aquests tres pacients van ser histològics. L>ID18 havia tingut un tumor paratiroidal atípic i els casos ID29 i ID27 presentaven una malaltia multiglandular a expenses d'un TPA i de glàndules hiperplàsiques en el primer i d'adenomes múltiples en el segon (un d'ells amb característiques quístiques). De forma addicional, els darrers dos casos complien el criteri d'edat menor a 45 anys al diagnòstic de l'HPP. Aquests tres casos van ser explicats extensament al primer article, que es va centrar de forma específica en l'afectació clinicopatològica deguda a alteracions en els gens inhibidors de quinasa dependents de ciclina (vegeu la Taula 5 i la Figura 3).

Variants a *TRPV6*

Per últim, vam detectar dues variants en línia germinal i en heterozigosi al gen *TRPV6*, prèviament no descrites a la literatura i classificades com a VUS, en dos individus diferents (casos ID4 i ID30). Els dos pacients havien estat inclosos a l'estudi per presentar un HPP diagnosticat en edat jove (als 41 i 35 anys, respectivament). El **cas ID4** havia estat diagnosticat d'HPP causat per un únic adenoma i presentava antecedents de nefrolitiasis. Un cop resecat el tumor, els nivells de la calcèmia i la PTH en plasma van tornar a la normalitat. L'estudi genètic dels seus familiars va permetre detectar la mateixa variant, c.1937G>A, p.(Arg646Gln) a *TRPV6* (NM_018646.5), en el seu pare i l'estudi analític d'aquest va ser compatible amb un hiperparatiroidisme primari normocalcèmic (vegeu la Figura 6).

El **cas ID30** era una noia que havia estat diagnosticada d'un HPP i d'un dèficit important de vitamina D als 31 anys arran de parir un nadó amb raquitisme i una hipocalcèmia greu. Es va administrar tractament amb vitamina D a la mare i al nounat i, tot i normalitzar-ne els nivells, la pacient va continuar amb valors elevats de PTH i de calci plasmàtics. Es van dur a terme proves de localització que descrivien un nòdul suggestiu d'adenoma paratiroidal inferior dret. Es va recomanar la realització d'un tractament quirúrgic, però es va perdre el seguiment de la pacient, així que no es va poder operar. L'estudi genètic va evidenciar una variant de significat incert a *TRPV6* (NM_018646.5), c.787G>A, p.(Asp263Asn), prèviament no descrita a la literatura. La pacient presentava antecedents familiars de nefrolitiasis en cinc de set germans, però no es va poder fer l'estudi genètic als seus familiars atesa la pèrdua del seguiment.

Figura 6: arbres genealògics dels pacients portadors de variants als gens *CASR* o *TRPV6*. Símbol buit: individu asimptomàtic; símbol ple: familiar afectat d'hiperparatiroidisme (nivells de PTH elevats o inadequadament normals amb calcèmia normal o elevada); símbol amb un punt negre: antecedents de nefrolitiasis o de dèficit de vitamina D greu.



Característiques segons el resultat de l'estudi genètic

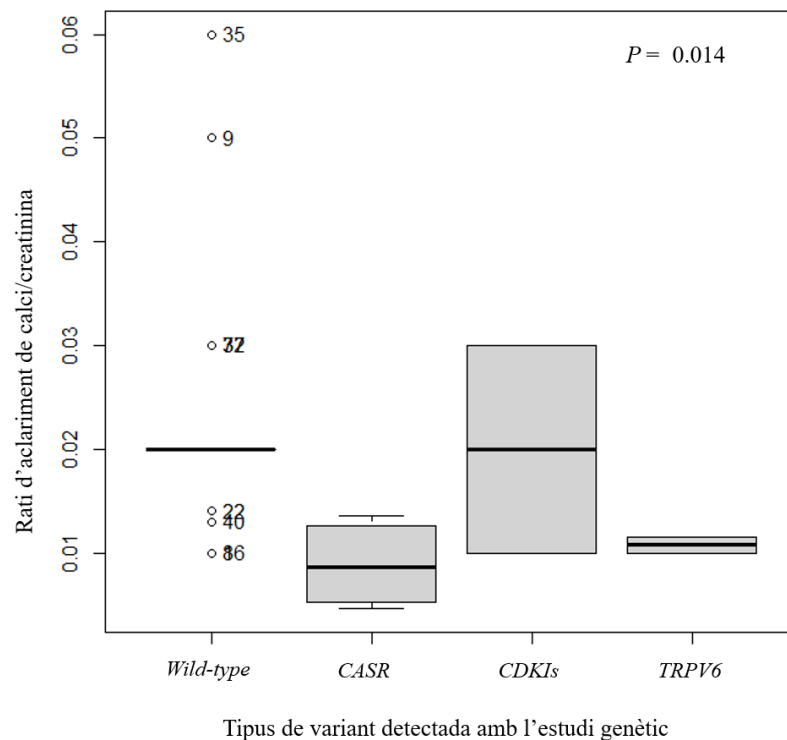
Un cop realitzat l'estudi genètic, es van comparar les variables clíniques i analítiques dels participants en funció de si eren portadors d'alguna variant en els gens estudiats o no. A la Taula 8 s'exposen els valors de les diferents característiques en funció del resultat de l'estudi genètic. A la part esquerra de la taula es considera com a resultat genètic estrictament positiu aquells casos amb variants P i LP (classes 4 i 5) i, en canvi, a la part dreta s'hi inclouen també les variants de significat incert (classe 3) dins el grup de casos amb resultat genètic positiu.

Taula 8: característiques clíniques dels participants segons el resultat del test genètic. Les dades s'expressen amb mitjana $\pm$ desviació estàndard.

	Estudi genètic positiu (variants LP i P) (n = 5)	Estudi genètic negatiu (n = 35)	P	Estudi genètic positiu (incloent-hi les VUS) (n = 9)	Test genètic negatiu (n = 31)	P
Edat al diagnòstic (anys)	54,2 $\pm$ 16	50,8 $\pm$ 15	0,6526	50 $\pm$ 18	51,5 $\pm$ 15,5	0,8157
Calcèmia màxima (mg/dL)	13,5 $\pm$ 1,96	12 $\pm$ 1,96	0,0817	12,5 $\pm$ 2	11,1 $\pm$ 2	0,399
PTH plasmàtica (pg/mL)	1273 $\pm$ 1502	360 $\pm$ 459	0,1582	763 $\pm$ 1222	390 $\pm$ 480	0,8459
Fosfatèmia precirurgia (mg/dL)	1,95 $\pm$ 0,58	2,7 $\pm$ 1,24	0,1005	2,3 $\pm$ 0,7	2,7 $\pm$ 1,3	0,4421
Ràtio d'aclariment de calci/creatinina (CCCR)	0,0085	0,022	0,0057	0,0107	0,02	0,0038
≥ 2 criteris d'inclusió (%)	3/5 (60%)	10/35 (28,6%)	0,1605	4/9 (44,4%)	9/31 (29,03%)	0,38

L'edat mitjana dels participants en el diagnòstic de l'HPP, així com els valors de la fosfatèmia mínima, no van mostrar diferències entre els dos grups. Els valors analítics mitjans de la PTH i de la calcèmia màximes prequirúrgics eren majors en el grup de pacients amb un resultat genètic positiu (tant incloent-hi els casos amb variants VUS com sense ells) respecte del negatiu, però les diferències no van ser estadísticament significatives. Així mateix, a la darrera fila de la Taula 8 s'observa que el fet de tenir dos o més criteris d'inclusió, és a dir, més d'un factor de risc d'HPPF, va ser més freqüent en el grup dels pacients portadors d'alguna variant (60% vs. 28,6% i 44,4% vs. 29,03%), tanmateix, sense diferències estadísticament significatives. En canvi, el valor de la CCCR mitjà, que es va analitzar amb el test de Wilcoxon, va ser menor en el grup de pacients amb un resultat genètic positiu en comparació amb els pacients amb resultat negatiu, amb significació estadística ($P = 0,0057$ i $P = 0,0038$). Mitjançant la prova de Kruskal-Wallis, es va comparar la ràtio CCCR mitjana entre els grups de pacients segons el tipus de mutació detectada (cap, a *CASR*, a algun gen *CDKIs* o a *TRPV6*) (vegeu la Figura 7). D'aquesta manera es va observar que els valors de la CCCR eren menors en tots els grups amb mutacions respecte dels pacients amb un estudi genètic negatiu, però principalment a expenses del grup de pacients amb variants a *CASR*. Els pacients diagnosticats d'HHF tipus 1 (portadors de variants a *CASR*) eren els que tenien els valors de CCCR més baixos, de forma estadísticament significativa ($P = 0,014$).

Figura 7: test de Kruskal-Wallis. Representació de la ràtio d'aclariment calci/creatinina pels diferents grups segons la variant genètica evidenciada. Estudi de la significació de les diferències de les mitjanes mitjançant el test de Kruskal-Wallis.



Altres resultats destacables derivats de l'ús del panell a la pràctica clínica

Arran de l'ús del panell de gens usat en l'estudi i, posteriorment, dut a la pràctica clínica del nostre centre hospitalari, vam detectar algunes variants dels gens *CASR* i *CDC73* en pacients amb sospita clínica d'un hiperparatiroidisme familiar. En destaquem la detecció d'una família que va ser diagnosticada de la síndrome d'hiperparatiroidisme lligat a tumor mandibular. La sospita inicial d'HPPF va ser en una noia de 23 anys amb hiperparatiroidisme que tenia dues germanes amb HPP. Una d'elles va presentar una hipercalcèmia greu que va requerir ingrés a la unitat de crítics per un bloqueig auriculoventricular. Les tres es van sotmetre a cirurgia paratiroidal per l'hiperparatiroidisme. Una d'elles va presentar una MMG deguda a adenomes múltiples, així com pòlips uterins i una altra germana va ser diagnosticada d'un tumor paratiroidal atípic. La mare havia estat operada feia anys d'un tumor maxil·lar i presentava antecedents de còlics nefrítics, però no havia estat diagnosticada d'HPP. Es va realitzar l'estudi genètic mitjançant el panell de gens mencionat al segon article i es va detectar la variant c.110del, p.(Lys37Argfs*72) a *CDC73*, classificada com a probablement patogènica i, fins aquell moment, no descrita a la literatura mèdica. La mare i les tres filles van ser portadores de la mateixa variant. La resta dels germans estan pendents de l'estudi genètic en el moment actual. Aquesta nova variant (i les característiques i evolució clínica de la família portadora) es va reportar en format de pòster al Congrés Europeu d'Endocrinologia, organitzat per la *The European Society of Endocrinology* (ESE) el maig de 2024 (262).

6. RESUM GLOBAL DE LA DISCUSSIÓ DELS RESULTATS OBTINGUTS

L'hiperparatiroidisme familiar (HPPF) es considera una malaltia infradiagnosticada que podria explicar més del 10% dels casos de l'hiperparatiroidisme primari (HPP). Existeix una manca de consens sobre qui s'hauria de sotmetre a l'estudi genètic i quins gens caldria analitzar en cada cas. Això ve afavorit per un desconeixement generalitzat d'algunes de les causes d'HPPF, considerades poc freqüents, per un baix nombre d'estudis genètics realitzats a la pràctica clínica en molts centres i per una absència d'unanimitat en les guies sobre el maneig d'aquesta entitat. No obstant això, el fet de diagnosticar una causa genètica de l'HPP pot tenir implicacions importants tant pel pacient com per a la seva família (39). La hipòtesi del nostre treball postulava que el cribratge genètic de variants en línia germinal de gens relacionats amb l'HPPF en pacients amb característiques de risc podia ser important de cara al maneig clínic de portadors i familiars. Concretament, que podia ser útil en població de l'àrea mediterrània i possiblement amb una taxa diagnòstica genètica rellevant. Endemés, es calculava que si es trobaven variants en els gens estudiats, això permetria millorar l'estratègia clínica i terapèutica a seguir en la pràctica clínica habitual en el nostre medi.

Per consegüent, en aquest projecte de tesi es va voler determinar la prevalença de l'HPPF en una cohort d'individus amb hiperparatiroidisme i fenotip de risc, mitjançant l'estudi de mutacions en línia germinal d'un panell de gens ampli dissenyat específicament per a l'estudi. Els estudis publicats fins al moment en les diferents àrees geogràfiques mostraven una prevalença molt variable de l'HPPF. Aquest fet possiblement era propiciat per l'heterogeneïtat en els gens avaluats i en la mostra de pacients avaluada a cada estudi i dificulta poder extrapolar els resultats de forma general (212). Així, ens vam plantejar estimar la prevalença d'aquesta entitat en el nostre medi, així com dels gens més freqüentment afectats. Fins a l'actualitat no s'havia fet cap estudi d'aquestes característiques en població espanyola. En població mediterrània sí que existia alguna cohort publicada de pacients amb fenotip de risc d'HPPF, però aquests estudis es basaven en una mostra petita d'individus i amb tests genètics menys complets, molts d'ells avaluant un sol gen i no un panell ampli (201,233,238,248,253,255,256).

En la cohort que vam estudiar de 40 pacients caucàsics, residents a Espanya, amb hiperparatiroidisme primari i almenys alguna característica de risc, es va trobar una prevalença de variants en línia germinal del 22,5% (9/40). Alguns estudis reportats mostraven prevalences concordants amb la que va detectar el nostre grup. Per exemple, en població japonesa es van estudiar tretze famílies amb sospita d'hiperparatiroidisme familiar per tenir una anatomia patològica de risc (tumors paratiroidals atípics, malaltia multiglandular, carcinomes paratiroidals o adenomes quístics) i/o per antecedents familiars d'HPP. De les tretze famílies, tres van presentar mutacions germinals a *CDC73* i una d'elles una variant amb error de sentit a *MEN1*, és a dir, van detectar una taxa diagnòstica genètica del 30%, sense especificar el tipus de variant segons les guies ACMG (259). L'estudi de Mariathasan et al (2019), realitzat al Regne Unit, era un dels més grans, amb una mostra de 121 pacients amb sospita d'HPPF a qui se'ls va realitzar un estudi genètic amb un panell d'onze gens. Van detectar una prevalença del 16% de variants patogèniques en algun dels gens avaluats (onze a *CASR*, sis a *MEN1*, una a *CDC73* i una a *AP2S1*) (257). Així mateix, alguns estudis que havien avaluat diferents gens relacionats amb l'HPPF en individus amb sospita, en poblacions de diferents àrees geogràfiques, reportaven prevalences similars a la detectada en el nostre grup (192,212,238).

Altres investigacions fetes en diferents territoris, en pacients amb fenotip de risc d'HPPF, i amb estudis genètics heterogenis, tenien una taxa de diagnòstic genètic força inferior a la del nostre estudi (209,230,233,248,254,258,260). Per contra, de forma menys freqüent, alguns autors havien publicat una taxa de detecció de mutacions en línia germinal força més elevada. Tanmateix, cal destacar que cap d'aquests analitzava un panell ampli de gens en població adulta, a diferència del nostre estudi,

en què s'analitzaven catorze gens possiblement implicats en l'HPPF (201,253,256,261). Cal destacar que el grup d'El Allali et al. (2021) va trobar una prevalença del 52% de variants en línia germinal mitjançant un estudi genètic que avaluava sis possibles gens relacionats amb l'HPPF, en una població de 63 infants, a França. Això fa pensar que probablement la taxa de detecció genètica sigui més elevada en població pediàtrica que en població adulta (255).

Els criteris d'inclusió del nostre estudi es van basar en les característiques considerades sospitoses d'un HPPF. Quan es van comparar els pacients que havien tingut un test genètic positiu amb els que no presentaven cap variant en els gens estudiats, es va observar que els primers tenien tendència a presentar més d'un criteri d'inclusió, així com nivells de calcèmia i de PTH plasmàtica més alts, però la diferència no era estadísticament significativa. L'única característica que va ser significativament diferent entre els dos grups va ser la ràtio CCCR (test de Wilcoxon, $P = 0,0057$), bàsicament a expenses dels individus portadors de variants a *CASR*, que la tenien inferior, fet habitual en l'HHF (263). Curiosament, no hi va haver diferències entre l'edat mitjana dels pacients portadors de variants respecte als que tenien un estudi genètic negatiu. Aquest escenari coincideix amb l'estudi de Mariathasan et al. (2019), en què l'edat i el fet de presentar una malaltia multiglandular no van mostrar valor predictiu com a factors de risc individuals d'origen hereditari de l'hiperparatiroidisme. En canvi, la CCCR sí que va ser significativament menor en el grup de pacients amb variants patogèniques a *CASR* ($P = 0,0001$). A diferència del nostre estudi, la presència d'antecedents familiars d'HPP va ser predictiu d'un origen hereditari de la malaltia ($P = 0,0002$) (257). En un estudi nord-americà, el fet de tenir antecedents familiars d'HPP també va ser clarament predictiu d'un origen hereditari de l'hiperparatiroidisme (234). 123 de 205 (60%) individus amb antecedents familiars d'hiperparatiroidisme van presentar alguna mutació en línia germinal en els gens estudiats (91 a *MEN1*, catorze a *CDC73* i divuit a *GCM2*). En aquest cas, l'edat, el sexe masculí i el fet de presentar una malaltia multiglandular també van ser factors independents associats a un resultat genètic positiu.

D'altra banda, sembla lògic pensar que tenir més d'una característica sospitosa d'HPPF pot incrementar la possibilitat de tenir un resultat genètic positiu. En el nostre estudi, tot i no manifestar una diferència estadísticament significativa, el grup de portadors de variants sí que tenien més tendència a presentar dos o més criteris d'inclusió, és a dir, més d'un factor de risc d'HPPF (60% versus 28,6% i 44,4% versus 29% incloent-hi les VUS) respecte al grup de pacients amb estudi genètic negatiu. El fet de no haver arribat a trobar diferències estadísticament significatives en la nostra cohort podria explicar-se per una mostra de pacients relativament petita ($n = 40$). A més, com que es tracta d'un estudi descriptiu dificulta el fet de poder extreure conclusions fermes i demana realitzar noves investigacions amb mostres més grans de pacients per corroborar aquesta hipòtesi.

En la nostra cohort, el *CASR* va ser el gen afectat amb més freqüència. S'hi van detectar quatre variants diferents. D'aquesta manera, vam poder diagnosticar d'hipercalcèmia hipocalciúrica familiar a quatre participants de diferents famílies. Dues d'aquestes variants no havien estat prèviament descrites a la literatura. Dels quatre pacients, tres havien estat sotmesos a cirurgia paratiroidal i, d'aquests, només un havia aconseguit la curació de l'HPP. Tanmateix, destaquem que els dos individus que no van aconseguir una curació bioquímica de l'HPP amb la cirurgia van presentar una millora en les xifres de la DMO un cop operats. Aquesta situació corrobora que la cirurgia paratiroidal podria ser beneficiosa en casos seleccionats amb HHF i fins i tot curativa en alguns escenaris. De les quatre variants que vam detectar, la c.175G>A, p.(Glu59Lys) va ser classificada com a VUS segons les guies ACMG. Tot i això, vam creure adequat reportar-la, atès que les característiques clíniques del cas índex i de la majoria dels seus familiars portadors eren suggestives d'HHF tipus 1. L'HHF és una malaltia, considerada rara, d'herència AD, però amb penetrància variable, fet que podria explicar la segregació de les variants a *CASR* a la família de

l'ID31. De totes maneres, com s'ha comentat amb anterioritat, les variants de significat incert o de classe 3 tenen la possibilitat de canviar a P o LP en un futur davant d'un possible avenç del coneixement científic.

Durant la realització del projecte vam adonar-nos que tradicionalment la hipercalcèmia hipocalciúrica familiar s'ha considerat una entitat diferent de l'HPP, malgrat ser patologies molt similars. Els arguments que defensen aquesta distinció entre les dues malalties són: les diferències en la taxa de curació postquirúrgica, la ràtio CCCR i les complicacions renals i òssies (menys habituals a l'HHF) (202,249). Tanmateix, cada vegada més autors consideren que l'HHF és un subtipus d'hiperparatiroidisme familiar (4,252). Generalment, l'afectació òssia, la renal, la hipercalcèmia greu i la presència d'adenomes paratiroidals es consideren trets atípics o poc habituals de l'HHF. No obstant això, aquests trets podrien ser més freqüents del que es pensava (178). De fet, alguns estudis demostren que les característiques clíniques i bioquímiques de l'HHF poden ser sobreposades a l'HPP, i per tant es tractaria d'entitats indistingibles excepte per l'anàlisi genètica (13,184). En aquesta línia, remarcuem que en la nostra cohort, dels quatre casos índex portadors de mutacions inactivadores a *CASR*, i que, per tant, vam classificar com a HHF tipus 1, tres presentaven afectació òssia en forma d'osteoporosi i un d'ells havia presentat una hipercalcèmia greu que va requerir ingrés hospitalari. De forma addicional, i pel que hem pogut esbrinar amb la revisió de la literatura, vam reportar per primera vegada un tumor paratiroidal atípic en un pacient amb HHF tipus 1.

L'afectació histològica paratiroidal de l'HHF sol ser multiglandular en forma d'hiperplàsia, però també s'han descrit adenomes paratiroidals en pacients portadors de mutacions compatibles amb HHF (208,264). No obstant això, el paper del CaSR en la formació d'adenomes i en la patogènesi de l'HPP és controvertit. Alguns autors han demostrat una disminució de l'expressió d'aquest receptor en adenomes paratiroidals (265,266). Per contra, no s'han detectat mutacions somàtiques inactivadores del *CASR* en adenomes paratiroidals esporàdics (267,268). En algun estudi, s'ha vist que ratolins *CASR knockout*⁵ presenten una hipertròfia paratiroidal i que l'activació del CaSR té un efecte inhibitori en la proliferació paratiroidal a través de la via MAPK (269). Així, en casos d'inactivació del CaSR, s'estimularia la proliferació paratiroidal per manca de l'efecte inhibitori, fet que podria explicar la formació d'adenomes a l'HHF (270,271).

Alguns autors que, davant la presència d'adenomes paratiroidals en pacients amb HHF, parlen de "coexistència d'HPP i HHF", en lloc de considerar-ho un fenotip compatible amb HHF. A més, en alguna publicació classifiquen com a FIHP alguns fenotips associats a certes mutacions inactivadores del *CASR*, en lloc de denominar-los HHF (68,178,186,198,212,227). Fins i tot s'ha descrit una síndrome anomenada hiperparatiroidisme moderat autosòmic dominant (ADHM) (OMIM +601199) en una família sueca amb vint membres que presentaven un fenotip compatible amb HHF i/o HPP: hipercalcèmia, hipercalcúria, PTH inadequadament elevada, hipermagnesèmia i nefrolitiasis. Aquesta família presentava adenomes paratiroidals i també MMG i, genèticament, patien d'una mutació germinal atípica inactivadora en el domini intracitoplasmàtic del *CASR* (193,272). Des del nostre punt de vista, l'afectació paratiroidal, sigui en forma d'adenomes o d'hiperplàsia, en pacients amb mutacions inactivadores del gen *CASR* podria classificar-se dins del mateix terme: 'hipercalcèmia hipocalciúrica familiar tipus 1', i es tractaria d'un subtipus d'hiperparatiroidisme hereditari.

La primera publicació de la tesi es va centrar en les tres variants que vam detectar en els gens de la família dels inhibidors de quinasa dependents de ciclina (*CDKIs*), dues a *CDKN1B* i una al gen

⁵ El terme *knockout* fa referència a un model que consisteix a suprimir o inactivar l'expressió d'un gen específic d'un organisme, que substitueix el gen original per una versió modificada del mateix.

CDKN2C. Cap de les tres havia estat prèviament descrita a la literatura. Vam fer una revisió exhaustiva de bases de dades mèdiques, com Pubmed (MEDLINE), i genètiques, com ClinVar i HGMD (Human Gene Mutation Database), constatant que fins aquell moment s'havien reportat poc més de 100 casos en tot el món amb la síndrome de MEN4 i un total de 58 variants en línia germinal del *CDKN1B*. Vam fer un recull de totes les variants germinals conegudes fins aquell moment classificades com a VUS/LP/P dels gens *CDKIs* (*CDKN2A*, *CDKN2B*, *CDKN2C*, *CDKN2D*, *CDKN1A*, *CDKN1B* i *CDKN1C*), juntament amb el tipus de lesió paratiroidal associada a cada mutació i altres característiques fenotípiques dels portadors. Aquesta taula es va incorporar al primer article com a material suplementari (vegeu l'Annex 2). Es pot veure com del total de 62 variants en línia germinal reportades fins aquell moment en gens *CDKIs*, 10 havien estat classificades com a VUS, segons les guies ACMG, i 34 havien estat publicades per un únic autor. Això constata que el coneixement de la patologia associada a mutacions en aquests gens encara era incipient. I, per tant, complicava conèixer amb exactitud la prevalença de pacients amb patrons de *MEN1-like* (i sense alteracions en el gen *MEN1*) deguts a mutacions a *CDKN1B* o en altres gens de la mateixa família i la penetrància fenotípica que podien associar.

Com hem comentat amb anterioritat, es considera diagnòstic de síndrome de MEN4 el fet de tenir un patró clínic similar a la síndrome de MEN1 (*MEN1-like*) i ser portador d'una variant germinal al gen *CDKN1B*. Amb els casos publicats fins al moment, s'ha vist que l'hiperparatiroidisme n'és la característica més freqüent (amb una penetrància aproximada del 90%) i que aquesta sol tenir un curs més lleu que en els pacients amb síndrome de MEN1 (115). De tots els casos reportats de MEN4 a la literatura, només dos havien presentat recurrència de l'hiperparatiroidisme i tan sols s'havia detectat MMG en el 14% (114,128). De forma concordant, els tres pacients del nostre estudi a qui vam detectar variants als gens *CDKIs* van presentar curació bioquímica de l'hiperparatiroidisme una vegada operats. Per contra, tots ells havien presentat nivells d'hipercalcèmia moderada-greu deguda a l'hiperparatiroidisme, fet menys habitual en portadors de mutacions a *CDKIs*.

L'edat diagnòstica de l'HPP en aquests tres casos (ID18, ID34 i ID28) va ser als 47, 34 i 28 anys, respectivament. De forma genèrica, l'edat mitjana d'aparició de l'HPP en la MEN4 és als 56 anys, segons els casos reportats fins a l'actualitat. En canvi, en la síndrome MEN1 l'HPP sol tenir una aparició més precoç, als 25 anys de mitjana. A nivell histològic, el tumor paratiroidal més freqüentment reportat a MEN4 és l'adenoma paratiroidal (114). En canvi, els tres casos portadors de variants a *CDKIs* de la nostra cohort presentaven dos tumors paratiroidals atípics i un adenoma paratiroidal quístic, amb més d'una glàndula afectada en dos dels individus (MMG). Fins al moment actual, no hem trobat casos reportats a la literatura d'aquests tipus tumorals en pacients amb MEN4 ni en portadors de variants germinals en altres gens *CDKIs*, i per aquest motiu ens van semblar unes troballes interessants i destacables, de cara a ampliar el coneixement en aquest àmbit.

Adicionalment, la síndrome MEN4 s'ha associat a la presència de tumors hipofisiaris, TGEP i altres tumors com meningiomes, hemangiomes hepàtics, tumors cutanis, neoplàsies genitourinàries, nòduls suprarenals, càncer de mama i càncer de còlon (81,106,113–116,118). Atesa la manca de guies específiques de MEN4, en els tres pacients de la nostra cohort vam seguir les recomanacions de seguiment de les guies per a pacients amb MEN1. Durant el cribratge d'altres neoplàsies, es va detectar un microadenoma hipofisiari no funcionant en la pacient portadora de la variant a *CDKN2C*. Per contra, en els dos pacients portadors de *CDKN1B* no es va detectar cap alteració hipofisiària. Això concorda amb els casos publicats fins ara de MEN4, ja que els tumors hipofisiaris solen ser més petits i menys freqüents que en MEN1 (prevalença de 14-44%). En el cas de les variants germinals a *CDKN2C*, fins ara no s'havien associat a tumors hipofisiaris. Curiosament, sí que existia un cas publicat d'una família amb una variant germinal a *CDKN1A* que associava prolactinomes (118). Tot i això, es fa difícil afirmar si el tumor hipofisiari detectat en el nostre estudi era degut a la

variant a *CDKN2C* o no, considerant que aquest tipus de neoplàsies són força comunes a la població general.

Durant el seguiment dels participants portadors de mutacions a *CDKIs*, no vam detectar alteracions analítiques ni radiològiques suggestives de la presència d'algun TGEp en cap dels tres. Segons la literatura publicada, la prevalença estimada de TGEp en MEN4 és menor que en MEN1 (19-25%) (114). En canvi, vam detectar altres tumors que podrien estar associats a la presència de les variants a *CDKN1B*: un adenoma de còlon amb displàsia de baix grau i lipomes atípics en el cas ID18 i una població de cèl·lules T aberrant en el cas ID29. Tot i això, cal tenir en compte que fins ara hi ha molt pocs casos publicats amb aquesta síndrome. Així, es requeririen estudis amb més casos per poder extreure conclusions fermes sobre la penetrància tumoral, la prevalença i el maneig terapèutic més adequat en pacients portadors de variants germinals a gens *CDKIs*.

En els dos casos portadors de variants a *CDKN1B*, l'estudi genètic de les mostres tumorals no va demostrar ni LOH ni CNV del gen en qüestió. Això s'ajusta a l'evidència actual, ja que la majoria de casos de MEN4 publicats no presenten un segon esdeveniment somàtic als teixits tumorals. A diferència del que passa en la síndrome de MEN1, es considera que l'haploinsuficiència de *CDKN1B* bastaria per a la tumorigènesi en la síndrome de MEN4 (115,130,273). També es va poder fer estudi immunohistoquímic amb p27/kip1 en els teixits tumorals paratiroidals dels dos pacients i tots dos van presentar una absència d'expressió nuclear d'aquesta proteïna. Aquest resultat és consistent amb una disminució de l'expressió de la proteïna p27 deguda a les variants germinals detectades a *CDKN1B*.

Contràriament, l'anàlisi genètica de la mostra tumoral del cas ID27 (portadora de la variant a *CDKN2C*) va mostrar una disomia uniparental del cromosoma 1, on es localitza aquest gen. Aquest fet podria anar a favor d'un rol patogènic de la variant, que havia estat classificada com a VUS. Fins llavors, a la literatura només es coneixia un altre cas de variant germinal a *CDKN2C* amb pèrdua d'heterozigosi en un pacient amb un adenoma paratiroidal (274). Aquest gen s'havia valorat com a possible supressor tumoral atès que podria estar implicat en la formació de diferents neoplàsies, com ara el mieloma múltiple, el carcinoma medul·lar de tiroides, neoplàsia de mama, etc. (145,275–277). Tanmateix, calen més estudis per establir si variants germinals a *CDKN2C* predisposen a l'HPPF i/o a neoplàsies endocrines múltiples. Seria interessant per a futurs estudis de casos similars determinar l'expressió proteica de p18, codificada per *CDKN2C*, als teixits tumorals. En la pacient del nostre estudi no es va poder fer aquesta anàlisi immunohistoquímica per manca de disponibilitat del reactiu al laboratori del nostre centre.

Comparativament amb altres estudis, la prevalença que vam trobar de variants en gens *CDKIs* en la nostra cohort (3/40 o 7,5%) va ser molt més alta. Aquestes diferències de prevalences podrien ser afavorides per divergències ètniques i geogràfiques en les poblacions estudiades o pel nombre de gens analitzats en cada estudi, entre d'altres. El 2024 es va publicar un estudi observacional retrospectiu multicèntric en població francesa, en què es van revisar 5.600 pacients amb clínica de *MEN1-like* i, d'aquests, només 22 presentaven variants a *CDKN1B*, quatre de classe 4/5 i divuit de classe 3 (en total, una prevalença del 0,4%) (143). Aquesta diferència de prevalences podria explicar-se per diferents motius. Per una banda, el nostre estudi té una mostra reduïda (n = 40), fet que fa difícil poder-ne generalitzar els resultats. A més, les poblacions estudiades són diferents, tant geogràficament com fenotípicament. Els criteris d'inclusió del nostre estudi comprenien l'HPP amb alguna característica de risc. En canvi, a l'estudi francès, s'hi incloïen només els pacients amb sospita específica de MEN1. Per torna, l'estudi francès era retrospectiu, per la qual cosa no contemplava un seguiment posterior als resultats genètics i, a més, el maneig clínic que s'havia fet de cadascun dels individus era heterogeni, ja que provenien de diferents centres. De la mateixa manera, altres estudis

fets en diferents àrees geogràfiques que avaluaven els gens *CDKIs* en població amb sospita d'HPPF no van detectar-ne cap variant en línia germinal (212,238,254,257,260).

Per ara, no existeixen guies específiques per al maneig dels pacients amb MEN4, així que se sol aconsellar seguir les recomanacions clíniques habituals per als pacients amb MEN1. En la síndrome de MEN1 es contempla un inici del cribratge de l'HPP als vuit anys i una cirurgia paratiroidal agressiva (paratiroidectomia subtotal amb timectomia profilàctica). Després d'haver revisat els casos publicats fins ara a escala mundial de MEN4, així com tenint en compte els tres casos detectats en el nostre estudi, ens plantegem que la cirurgia paratiroidal recomanada pels pacients amb MEN4 podria ser menys invasiva que en MEN1, atès el menor risc de MMG i de recurrència postquirúrgica. Ja ho suggerien diferents autors en revisions recents d'aquesta entitat (114,143). Quant al cribratge de tumors hipofisaris, de TGEP i d'altres neoplàsies, l'escassetat de casos publicats fins a l'actualitat fa difícil proposar-ne un maneig diferent del recomanat en la síndrome MEN1. Malgrat la impressió que els tumors hipofisaris i els TGEP puguin ser menys freqüents i sovint menys agressius en MEN4 que en MEN1, calen més estudis per poder estipular si se'n podria iniciar el cribratge a una edat més elevada.

En termes globals, s'accepta que la síndrome de MEN4 comprèn aquells individus portadors de mutacions en el gen *CDKN1B* que tinguin un fenotip similar a MEN1, sense tenir en compte la resta de gens de la família de *CDKIs* (110). De forma destacable, però, s'havien reportat alguns casos d'individus amb fenotip *MEN1-like* que presentaven mutacions en altres gens de la mateixa família (*CDKN2C*, *CDKN2B* i *CDKN1A*). Concretament, dos pacients portadors de mutacions patogèniques a *CDKN2B* (gen que codifica per la proteïna p15) presentaven clínica d'hiperparatiroidisme primari amb afectació multiglandular. Un d'ells també tenia un meningioma, un hemangioma hepàtic i un schwannoma cutani, i l'altre pacient associava una neoplàsia prostàtica, una massa suprarenal i una síndrome de Zollinger-Ellison, per la qual cosa es podria dir que els fenotips eren similars a MEN1. Pel que fa a variants germinals en el gen *CDKN2C* es coneix un altre cas, a part de la pacient detectada en el nostre estudi, amb un HPP, una neoplàsia de mama i antecedents familiars d'hiperparatiroidisme. Així mateix, s'ha reportat una família portadora d'una variant germinal al gen *CDKN1A* amb clínica d'HPP i prolactinomes (118).

Les dues famílies d'inhibidors de quinasa dependents de ciclina (tant la INK4/ARF, que conté *CDKN2A/p16*, *CDKN2B/p15*, *CDKN2C/p18* i *CDKN2D/p19* com la Cip/Kip, formada per *CDKN1A/p21*, *CDKN1B/p27* i *CDKN1C/p57*) juguen un paper en la regulació del cicle cel·lular. Les INK4 i les Cip/Kip inhibeixen les quinases dependents de ciclina (CDK), i així provoquen una inhibició del cicle cel·lular. La pèrdua de funció d'aquests inhibidors comporta un augment de l'activitat CDK, amb un alliberament de factors de transcripció i un augment de la proliferació cel·lular, fet que podria causar la formació tumoral (144,278). Tenint present que mutacions en tres altres gens de la família de *CDKIs* (codificants de p15, p18 i p21) s'han associat a fenotips similars a MEN1, ens plantegem si aquests pacients també podrien englobar-se dins de la mateixa terminologia de MEN4. Tot i això, atès el baix nombre de casos reportats fins ara, cal fer més estudis per definir bé la patogènia associada a aquestes mutacions i el fenotip que poden induir. Considerant les característiques dels pacients de la nostra cohort, proposem valorar l'estudi genètic d'aquesta família de gens *CDKIs* en tot pacient amb HPP que presenti un fenotip sospitós (detallat als criteris d'inclusió de la nostra cohort), especialment si es detecta una histologia paratiroidal de risc (malaltia multiglandular, TPA o amb adenomes paratiroidals quístics). També caldria contemplar, sempre que es pugui i segons els recursos de cada centre, la realització d'un estudi immunohistoquímic i d'anàlisis genètiques de les mostres tumorals en pacients portadors de variants germinals a *CDKIs*, per tal d'ampliar el coneixement d'aquesta patologia.

D'altra banda, de les nou variants que es van detectar en la nostra cohort, dues van ser del gen *TRPV6*. Aquest gen codifica per la proteïna TRPV6, que s'expressa en múltiples teixits i fa la funció de canal iònic. Juga un paper important en l'absorció del calci en l'àmbit renal i intestinal. Diverses variants d'aquest gen s'han associat a l'hiperparatiroidisme neonatal greu transitori quan s'hereten de forma recessiva (218). També s'han descrit casos de nefrolitiasi i pancreatitis crònica associats a l'afectació en homozigosi o en heterozigosi composta d'aquest gen, principalment en models de ratolins (220,224). Els dos pacients de la nostra cohort a qui vam detectar variants a *TRPV6* havien estat diagnosticats d'hiperparatiroidisme amb menys de 45 anys. Pel que hem pogut investigar, fins a l'actualitat no hi ha casos publicats en humans d'hiperparatiroidisme familiar causat per mutacions a *TRPV6* amb un patró d'herència dominant. És a dir, de moment no s'ha demostrat que la presència d'una variant en heterozigosi a *TRPV6* pugui donar lloc a l'hiperparatiroidisme.

De tota manera, ens va cridar l'atenció que una de les variants segregava amb un possible hiperparatiroidisme familiar: el pare del cas índex era portador de la mateixa variant a *TRPV6* i presentava un patró bioquímic d'hiperparatiroidisme (ID4). Quant a l'altre cas índex, ens va semblar curiós que cinc dels seus set germans tenien antecedents de nefrolitiasis (ID30). Tanmateix, no podem saber si la segona variant segregava amb la malaltia o no, ja que es va perdre el seguiment de la pacient i no es van poder estudiar els seus familiars. Cal remarcar que la significació clínica d'aquestes mutacions no està clara, no només pel fet de presentar una sola còpia del gen alterada, sinó perquè ambdues van ser classificades de significat incert. Tot i això, vam trobar interessant reportar aquestes dues variants de cara a ampliar el coneixement del gen i les seves possibles implicacions fenotípiques. Una possible estratègia en aquests pacients amb resultats genètics poc concloents seria realitzar una seqüenciació de l'exoma sencer. Això podria ajudar a detectar, si n'hi hagués, una segona variant que pogués explicar el possible hiperparatiroidisme familiar, així com estudiar altres possibles gens associats a la clínica paratiroidal.

Per altra banda, a la nostra cohort no vam trobar cap altra variant de la resta dels gens estudiats mitjançant el panell (*AIP*, *AP2S1*, *CDC73*, *CDKN1A*, *CDKN2B*, *GCM2*, *GNA11*, *MEN1*, *PTH* i *RET*). Concretament, ens va cridar l'atenció el fet de no detectar cap variant a *MEN1*, ja que la majoria d'estudis publicats de pacients amb sospita d'HPPF havien detectat variants en aquest gen (212,238,253,255,257–261). Creiem que això s'explica perquè un dels criteris d'exclusió del nostre estudi era el fet de ser portador d'alguna variant en els gens inclosos en el panell, entre ells *MEN1*. A més, l'estudi genètic de *MEN1* en el nostre centre feia anys que es duia a terme de forma rutinària davant la sospita de síndrome de MEN1. En canvi, la majoria de gens inclosos al panell no se solien analitzar de forma assídua a la pràctica clínica.

També ens va semblar curiós que no vam detectar cap variant al gen *CDC73* entre els onze pacients que vam incloure a la nostra cohort per haver tingut tumors paratiroidals atípics. Això contrasta amb altres estudis en què s'han trobat prevalences de fins al 36% de mutacions inactivadores germinals del gen *CDC73* en sèries de pacients amb tumors paratiroidals atípics (44). Cal subratllar que, quan ja havíem finalitzat el projecte de la tesi, un cop ja havíem implementat el panell de gens a la pràctica clínica del nostre centre, vam detectar una família amb quatre membres portadores d'una mutació a *CDC73*, c.110del,p.(Lys37Argfs*72). De les quatre pacients, a qui vam diagnosticar de síndrome de HPT-JT, una presentava un TPA (262).

A tall de resum, aquest projecte ha permès detectar nou variants en quatre gens diferents en pacients amb fenotip de risc d'HPPF. Així doncs, el rendiment d'aquest panell en població mediterrània ha estat força significatiu, amb una prevalença del 22,5% de variants en línia germinal (o del 12,5% si s'exclouen les variants de classe 3). Cal destacar que, pel que hem pogut esbrinar, set eren mutacions desconegudes fins al moment. Això posa de manifest la importància dels tests genètics en aquesta

patologia. Fins a la realització d'aquest projecte, en la pràctica clínica del nostre centre no es feia de forma rutinària aquest panell tan complet. Així mateix, pel fet de ser una patologia poc coneguda i haver-hi una manca de guies clíniques, creiem que molts altres centres tampoc tenen protocol·litzat l'estudi genètic en casos de sospita d'hiperparatiroidisme familiar. Tot plegat fa pensar que l'HPPF probablement és una patologia infradiagnosticada. Augmentar el coneixement d'aquestes malalties, en general poc freqüents, com ara la síndrome de MEN4, pot ajudar a millorar-ne el maneig. De fet, gràcies a la implementació d'aquest panell a la pràctica clínica habitual del nostre centre, mesos després d'haver finalitzat l'estudi observacional de la tesi, en pacients amb sospita d'HPPF s'han pogut detectar altres mutacions. Concretament, s'ha diagnosticat síndrome d'HPT-JT la família abans mencionada i també altres famílies amb hipercalcèmia hipocalciúrica familiar tipus 1 (portadores de variants al gen *CASR*).

Entre els punts forts del nostre estudi s'inclou l'ampli panell de gens que vam poder estudiar en una cohort de pacients amb fenotip de risc d'hiperparatiroidisme primari. Fins on hem sabut, aquest és el primer estudi en població espanyola, i un dels primers en població mediterrània, que analitza un ventall tan complet de gens relacionats amb l'hiperparatiroidisme familiar. A més, cal remarcar que un cop detectades les variants en els diferents gens, vam poder oferir als casos índex i als seus familiars de primer grau un seguiment clinicoterapèutic individualitzat i exhaustiu per un equip multidisciplinari al nostre centre. Així mateix, vam informar del resultat la resta de participants amb estudi genètic negatiu i d'aquesta manera vam minimitzar l'angoixa i en vam adequar el seguiment. Finalment, remarcuem que vam poder reservar mostres d'ADN de la majoria dels participants, sempre de forma consentida, de cara a futurs estudis, un fet que és important sobretot per a aquells pacients amb un resultat genètic negatiu i, per tant, una possible afectació genètica d'algun gen desconegut fins al moment.

Dins les limitacions d'aquest projecte de tesi cal apuntar que el fet d'haver exclòs aquells pacients que tinguessin alguna mutació ja detectada en algun dels gens inclosos en el panell podria haver alterat la prevalença estimada de variants en la població de risc. És possible que sense aquest criteri d'exclusió la prevalença de variants en línia germinal hagués estat superior. Una altra limitació de l'estudi és la mostra relativament baixa de pacients, com a la majoria d'estudis d'HPPF, atesa la baixa prevalença d'aquesta malaltia, que fa difícil extrapolar els resultats a la població general. Addicionalment, algunes de les variants que vam reportar havien estat classificades com a significat incert, fet que s'ha de tenir present a l'hora d'interpretar la seva rellevància clínica. A més a més, en el nostre estudi no es van poder fer anàlisis funcionals que permetessin esbrinar l'afectació proteica derivada de les variants. Així mateix, cal considerar les limitacions tècniques inherents a la detecció de variants en panells de gens. Per manca de recursos, no vam poder realitzar un estudi genètic més complet de l'exoma sencer, fet que podria ser interessant en aquells pacients amb un resultat genètic negatiu.

7. CONCLUSIONS

- El cribratge de mutacions en línia germinal de gens associats a l'hiperparatiroidisme mitjançant el panell de gens seleccionat ha demostrat ser d'utilitat en individus de l'àrea mediterrània amb un fenotip de risc d'HPPF. La taxa diagnòstica genètica en la nostra cohort ha estat rellevant en comparació amb altres estudis similars de diferents àrees geogràfiques.
- La detecció de variants en línia germinal en algun dels gens estudiats ha afavorit un maneig clínic més adequat tant dels casos índex com dels seus familiars de primer grau. Els estudis de segregació familiar han permès detectar hiperparatiroidisme de forma precoç en individus prèviament asimptomàtics i, per tant, fer-ne un seguiment i un tractament adients. El coneixement obtingut a partir de l'estudi observacional ha afavorit la implementació d'una estratègia racional d'estudi genètic a la pràctica clínica habitual al nostre medi mitjançant el panell de gens esmentat.
- A la cohort estudiada, el grup de subjectes portadors d'alguna variant tenia tendència a presentar més d'una característica de risc, nivells més alts de calcèmia i de PTH plasmàtica respecte dels individus amb estudi genètic negatiu, però la diferència no ha estat estadísticament significativa. D'aquesta manera, proposem que els criteris d'inclusió usats en el projecte s'apliquin com a criteris d'indicació de l'estudi genètic en l'hiperparatiroidisme a la pràctica mèdica rutinària, atès que no n'hi ha cap que predomini especialment respecte dels altres en el grup de pacients amb estudi genètic positiu.
- Hem pogut descriure variants en línia germinal dels gens *CDKN1B*, *CDKN2C*, *CASR* i *TRPV6*, prèviament no reportades a la literatura mèdica. Aquest fet és rellevant de cara a augmentar el coneixement de l'HPPF.

8. LÍNIES DE FUTUR

Amb els resultats obtinguts en aquesta tesi doctoral, les línies d'investigació futures podrien centrar-se en les següents situacions:

- Tornar a avaluar aquells pacients amb fenotip de risc d'HPPF i amb resultat genètic no concloent mitjançant la tecnologia de seqüenciació de tot l'exoma (WES o Whole-Exome Sequencing) o de tot el genoma sencer (WGS o Whole-Genome Sequencing). Implementar aquesta tecnologia d'estudi genètic a la pràctica rutinària del nostre centre, amb l'ús de panells virtuals personalitzats per a cada patologia concreta. Els WES/WGS permeten detectar alteracions genètiques no descrites prèviament, sigui en gens amb una coneguda associació a l'HPPF o en altres possiblement implicats.
- Dur a terme estudis amb una mostra més gran (multicèntrics) per enfortir l'evidència i poder extreure conclusions més robustes quant a quines indicacions clíniques són més determinants per considerar una avaluació genètica dels pacients amb hiperparatiroidisme.
- Aplicar de forma rutinària l'estudi genètic dels gens *CDKIs* en tot pacient amb sospita d'HPPF o amb un patró similar a MEN1 i sense mutació al gen *MEN1*. I, en individus portadors de mutacions en algun d'aquests gens, implementar l'anàlisi immunohistoquímica de les proteïnes afectades a les peces tumorals (com la p27/*CDKN1B* o la p18/*CDKN2C*). Això afavoriria un coneixement més profund de la síndrome de MEN4 i/o d'altres entitats relacionades.
- Fer un estudi observacional prospectiu als subjectes portadors de tumors paratiroidals atípics per avaluar el seu risc de recidiva i millorar-ne el maneig. Acordar amb el servei d'anatomia patològica l'anàlisi rutinària immunohistoquímica amb parafibromina en tot tumor paratiroidal atípic, carcinoma paratiroidal i en aquells adenomes amb alguna característica de risc.
- Realitzar estudis funcionals en aquells pacients portadors de variants no concloents per poder predir de forma més consistent l'afectació proteica derivada de cada mutació.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Press DM, Siperstein AE, Berber E, Shin JJ, Metzger R, Jin J, et al. The prevalence of undiagnosed and unrecognized primary hyperparathyroidism: A population-based analysis from the electronic medical record. *Surgery*. 2013;154(6):1232–8.
2. Soto-Pedre E, Newey PJ, Srinivasan S, Siddiqui MK, Palmer CNA, Leese GP. Identification of 4 New Loci Associated With Primary Hyperparathyroidism (PHPT) and a Polygenic Risk Score for PHPT. *J Clin Endocrinol Metab*. Novembre de 2022;107(12):3302–8.
3. Bilezikian JP. Primary Hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. Novembre de 2018;110(11):3993–4004.
4. Thakker RV. Genetics of parathyroid tumours. Vol. 280, *J Intern Med*. Desembre de 2016;280(6):574–583.
5. Yeh MW, Ituarte PHG, Zhou HC, Nishimoto S, In-Lu Amy Liu, Harari A, et al. Incidence and prevalence of primary hyperparathyroidism in a racially mixed population. *J Clin Endocrinol Metab*. Març de 2013;98(3):1122–9.
6. Griebeler ML, Kearns AE, Ryu E, Hathcock MA, Melton LJ, Wermers RA. Secular trends in the incidence of primary hyperparathyroidism over five decades (1965–2010). *Bone*. Abril de 2015;117:1–7.
7. Soto-Pedre E, Newey PJ, Leese GP. Stable Incidence and Increasing Prevalence of Primary Hyperparathyroidism in a Population-based Study in Scotland. *J Clin Endocrinol Metab*. 1 d'octubre de 2023;108(10):e1117–24.
8. El-Hajj Fuleihan G, Chakhtoura M, Cipriani C, Eastell R, Karonova T, Liu JM, et al. Classical and Nonclassical Manifestations of Primary Hyperparathyroidism. *J Bone Miner Res*. Novembre de 2022;37(11):2330–2350.
9. Minisola S, Arnold A, Belaya Z, Brandi ML, Clarke BL, Hannan FM, et al. Epidemiology, Pathophysiology, and Genetics of Primary Hyperparathyroidism. *J Bone Miner Res*. Novembre de 2022;37(11):2315–2329.
10. Bilezikian JP, Khan AA, Silverberg SJ, Fuleihan GEH, Marcocci C, Minisola S, et al. Evaluation and Management of Primary Hyperparathyroidism: Summary Statement and Guidelines from the Fifth International Workshop. *J Bone Miner Res*. Novembre de 2022;37(11):2293–2314.
11. Nordenström E, Katzman P, Bergenfelz A. Biochemical diagnosis of primary hyperparathyroidism: Analysis of the sensitivity of total and ionized calcium in combination with PTH. *Clin Biochem*. Juliol de 2011;44(10–11):849–52.
12. Minisola S, Pepe J, Cipriani C. Measuring serum calcium: Total, albumin-adjusted or ionized? Vol. 95, *Clin Endocrinology (Oxf)*; Agost de 2021;95(2):267–268.
13. Bollerslev J, Rejnmark L, Zahn A, Heck A, Appelman-Dijkstra NM, Cardoso L, et al. European expert consensus on practical management of specific aspects of parathyroid disorders in adults and in pregnancy: recommendations of the ESE Educational Program of Parathyroid Disorders. *Eur J Endocrinol*. 13 de gener de 2022;186(2):R33–R63.
14. Shokry G, Morkos M. Calcium Challenge to Confirm Secondary Hyperparathyroidism Caused by Decreased Calcium Intake. *Endocr Pract*. Octubre de 2022;28(10):1069–1071.
15. Bilezikian JP, Brandi ML, Eastell R, Silverberg SJ, Udelsman R, Marcocci C, et al. Guidelines for the management of asymptomatic primary hyperparathyroidism: Summary statement from the Fourth International Workshop. *J Clin Endocrinol Metab*. Octubre de 2014;99(10):3561–9.
16. Insogna KL. Primary Hyperparathyroidism. *N Engl J Med*. Setembre de 2018;379(11):1050–9.

17. Romagnoli E, Cipriani C, Nofroni I, Castro C, Angelozzi M, Scarpiello A, et al. “Trabecular Bone Score” (TBS): An indirect measure of bone micro-architecture in postmenopausal patients with primary hyperparathyroidism. *Bone*. Març de 2013;53(1):154–9.
18. Sun Q, Zhang T, Chen P, Tong NW, Zhang M. Review Article Glucose metabolic disorder in primary hyperparathyroidism: a systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2019;12(9):11964-11973.
19. Clifton-Bligh PB, Nery ML, Supramaniam R, Reeve TS, Delbridge L, Stiel JN, et al. Mortality associated with primary hyperparathyroidism. *Bone*. Maig de 2015;74:121–4.
20. Yu N, Donnan PT, Leese GP. A record linkage study of outcomes in patients with mild primary hyperparathyroidism: The Parathyroid Epidemiology and Audit Research Study (PEARS). *Clin Endocrinol (Oxf)*. Agost de 2011;75(2):169–76.
21. Lundgren E, Lind L, Palmér M, Jakobsson S, Ljunghall S, Rastad J. Increased cardiovascular mortality and normalized serum calcium in patients with mild hypercalcemia followed up for 25 years. *Surgery*. Desembre de 2001;130(6):978–85.
22. Wermers RA, Khosla S, Atkinson EJ, Grant CS, Hodgson SF, Michael O’fallon W, et al. Survival after the Diagnosis of Hyperparathyroidism: A Population-based Study. *Am J Med*. Febrer de 1998;104(2):115-22
23. Axelsson KF, Wallander M, Johansson H, Harvey NC, Vandenput L, McCloskey E, et al. Analysis of Comorbidities, Clinical Outcomes, and Parathyroidectomy in Adults with Primary Hyperparathyroidism. *JAMA Netw Open*. Juny de 2022;5(6):e2215396
24. Cusano NE, Maalouf NM, Wang PY, Zhang C, Cremers SC, Haney EM, et al. Normocalcemic hyperparathyroidism and hypoparathyroidism in two community-based nonreferral populations. *J Clin Endocrinol and Metab*. Juliol de 2013;98(7):2734–41.
25. Pappu R, Jabbour SA, Regianto AM, Reginato AJ. Musculoskeletal manifestations of primary hyperparathyroidism. *Clin Rheumatol*. Desembre de 2016;35(12):3081–3087.
26. Tezcan ME, Temizkan S, Ozal ST, Gul D, Aydin K, Ozderya A, et al. Evaluation of acute and chronic MRI features of sacroiliitis in asymptomatic primary hyperparathyroid patients. *Clin Rheumatol*. 1 de novembre de 2016;35(11):2777–82.
27. Mollerup CL, Vestergaard P, Gedsø Frøkjær V, Mosekilde L, Christiansen P, Blichert-Toft M. Papers Risk of renal stone events in primary hyperparathyroidism before and after parathyroid surgery: controlled retrospective follow up study. *BMJ*. Octubre de 2002;325(7368):807.
28. Perrier N, Lang BH, Farias LCB, Poch LL, Sywak M, Almquist M, et al. Surgical Aspects of Primary Hyperparathyroidism. *Journal of Bone and Mineral Research*. Novembre de 2022;37(11):2373–90.
29. Ahmadiéh H, Kreidieh O, Akl EA, El-Hajj Fuleihan G. Minimally invasive parathyroidectomy guided by intraoperative parathyroid hormone monitoring (IOPTH) and preoperative imaging versus bilateral neck exploration for primary hyperparathyroidism in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. Octubre de 2020;10(10):CD010787.
30. Barczynski M, Konturek A, Hubalewska-Dydejczyk A, Cichon S, Nowak W. Evaluation of Halle, Miami, Rome, and Vienna intraoperative iPTH assay criteria in guiding minimally invasive parathyroidectomy. *Langenbecks Arch Surg*. Setembre de 2009;394(5):843–9.
31. Duan K, Hernandez KG, Mete O. Clinicopathological correlates of hyperparathyroidism. *J Clin Pathol*. Octubre de 2015;68(10):771–87.
32. Erickson LA, Mete O, Juhlin CC, Perren A, Gill AJ. Overview of the 2022 WHO Classification of Parathyroid Tumors. *Endocr Pathol*. Març de 2022;33(1):64-89.
33. Goasguen N, Chirica M, Roger N, Munoz-Bongrand N, Zohar S, Noullet S, et al. Primary Hyperparathyroidism from Parathyroid Microadenoma: Specific Features and Implications for a

- Surgical Strategy in the Era of Minimally Invasive Parathyroidectomy. *J Am Coll Surg*. Abril de 2010;210(4):456–62.
34. Hu Y, Zhang X, Wang O, Cui M, Li X, Wang M, et al. Integrated Whole-Exome and Transcriptome Sequencing of Sporadic Parathyroid Adenoma. *Front Endocrinol (Lausanne)*. Maig de 2021;12:631680.
 35. Juhlin CC, Erickson LA. Genomics and Epigenomics in Parathyroid Neoplasia: from Bench to Surgical Pathology Practice. *Endocr Pathol*. Març de 2021;32(1):17-34.
 36. Chang W, Tu CL, Jean-Alphonse FG, Herberger A, Cheng Z, Hwong J, et al. PTH hypersecretion triggered by a GABAB1 and Ca²⁺-sensing receptor heterocomplex in hyperparathyroidism. *Nat Metab*. Març de 2020;2(3):243–55.
 37. Corbetta S, Mantovani G, Lania A, Borgato S, Vicentini L, Beretta^{3 2} E, et al. Calcium-sensing receptor expression and signalling in human parathyroid adenomas and primary hyperplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)*. Març del 2000;52(3):339-48.
 38. Imanishi Y, Hosokawa Y, Yoshimoto K, Schipani E, Mallya S, Papanikolaou A, et al. Primary hyperparathyroidism caused by parathyroid-targeted overexpression of cyclin d1 in transgenic mice. *J Clin Invest*. Maig de 2001;107(9):1093–102.
 39. Jha S, Simonds WF. Molecular and Clinical Spectrum of Primary Hyperparathyroidism. *Endocr Rev*. 15 de setembre de 2023;44(5):779-818.
 40. Singh P, Bhadada SK, Dahiya D, Arya AK, Saikia UN, Sachva N, et al. Reduced Calcium Sensing Receptor (CaSR) Expression is Epigenetically Deregulated in Parathyroid Adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 1 de setembre de 2020;105(9):3015-3024.
 41. Awad SS, Miskulin J, Thompson N. Parathyroid adenomas versus four-gland hyperplasia as the cause of primary hyperparathyroidism in patients with prolonged lithium therapy. *World J Surg*. Abril de 2003;27(4):486–8.
 42. Christakis I, Bussaidy N, Clarke C, Kwatampora LJ, Warneke CL, Silva AM, et al. Differentiating Atypical Parathyroid Neoplasm from Parathyroid Cancer. *Ann Surg Oncol*. Setembre de 2016;23(9):2889–97.
 43. Saponaro F, Pardi E, Mazoni L, Borsari S, Torregrossa L, Apicella M, et al. Do Patients with Atypical Parathyroid Adenoma Need Close Follow-up? *J Clin Endocrinol Metab*. Novembre de 2021;106(11):E4565–79.
 44. Cetani F, Marcocci C, Torregrossa L, Pardi E. Atypical parathyroid adenomas: Challenging lesions in the differential diagnosis of endocrine tumors. *Endocr Relat Cancer*. Juliol de 2019;26(7):R441-R464.
 45. Kruijff S, Sidhu SB, Sywak MS, Gill AJ, Delbridge LW. Negative parafibromin staining predicts malignant behavior in atypical parathyroid adenomas. *Ann Surg Oncol*. Febrer de 2014;21(2):426–33.
 46. Morreau H. PARAT Steering Group Atypical Parathyroid adenomas Part II: A diagnostic View. Meeting report of the 2nd Expert Workshop on Parathyroid Disorders, 27/28 de juny de 2019. p.17.
 47. Kumari N, Chaudhary N, Pradhan R, Agarwal A, Krishnani N. Role of Histological Criteria and Immunohistochemical Markers in Predicting Risk of Malignancy in Parathyroid Neoplasms. *Endocr Pathol*. Juny de 2016;27(2):87–96.
 48. Newey PJ, Bowl MR, Cranston T, Thakker R V. Cell division cycle protein 73 homolog (CDC73) mutations in the hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome (HPT-JT) and parathyroid tumors. *Hum Mutat*. Març de 2010;31(3):295–307.
 49. Shattuck TM, Välimäki S, Obara T, Gaz RD, Clark OH, Shoback D, et al. Somatic and Germ-Line Mutations of the HRPT2 Gene in Sporadic Parathyroid Carcinoma. *N Engl J Med*. 30 d'octubre de 2003;349(18):1722-9.

50. Garrigues G, Batisse-Lignier M, Uhrhammer N, Privat M, Ponelle-Chachuat F, Kelly A, et al. Rare duplication of the CDC73 gene and atypical hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome: A case report and review of the literature. *Mol Genet Genomic Med*. Maig de 2023;11(5).
51. Gill AJ, Lim G, Cheung VK, Andrici J, Perry-Keene JL, Paik J, et al. Parafibromin-deficient (HPT-JT Type, CDC73 Mutated) Parathyroid Tumors Demonstrate Distinctive Morphologic Features. *Am J Surg Pathol*. Gener de 2019;43(1):35-46.
52. Cardoso L, Stevenson M, Thakker R V. Molecular genetics of syndromic and non-syndromic forms of parathyroid carcinoma. *Hum Mutat*. Desembre de 2017;38(12):1621-1648.
53. Fingeret AL. Contemporary Evaluation and Management of Parathyroid Carcinoma. *JCO Oncol Pract*. Gener de 2021;17(1):17-21.
54. Harari A, Waring A, Fernandez-Ranvier G, Hwang J, Suh I, Mitmaker E, et al. Parathyroid carcinoma: A 43-year outcome and survival analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. Desembre de 2011;96(12):3679–86.
55. Kleinpeter KP, Lovato JF, Clark PB, Wooldridge T, Norman ES, Bergman S, et al. Is parathyroid carcinoma indeed a lethal disease? *Ann Surg Oncol*. Març de 2005;12(3):260-6.
56. Wang J, Wang Q, Zhao T, Liu X, Bai G, Xin Y, et al. Expression profile of serum-related exosomal miRNAs from parathyroid tumor. *Endocrine*. Abril de 2021;72(1):239–48.
57. Erovic BM, Harris L, Jamali M, Goldstein DP, Irish JC, Asa SL, et al. Biomarkers of parathyroid carcinoma. *Endocr Pathol*. Desembre de 2012;23(4):221–31.
58. Mohammed KH, Siddiqui MT, Willis BC, Tsvetkova DZ, Mohamed A, Patel S, et al. Parafibromin, APC, and MIB-1 Are Useful Markers for Distinguishing Parathyroid Carcinomas From Adenomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. Novembre/Desembre de 2017;25(10):731-735.
59. Erickson LA, Mete O. Immunohistochemistry in Diagnostic Parathyroid Pathology. *Endocr Pathol*. Juny de 2018;29(2):113-129.
60. Juhlin CC, Nilsson IL, Lagerstedt-Robinson K, Stenman A, Bränström R, Tham E, et al. Parafibromin immunostainings of parathyroid tumors in clinical routine: a near-decade experience from a tertiary center. *Mod Pathol*. Juliol de 2019;32(8):1082–94.
61. Juhlin C, Larsson C, Yakoleva T, Leibiger I, Leibiger B, Alimov A, et al. Loss of parafibromin expression in a subset of parathyroid adenomas. *Endocr Relat Cancer*. Juny de 2006;13(2):509–23.
62. Reddick RL, Costa JC, Marx SJ. Parathyroid hyperplasia and parathyromatosis. *Lancet*. Març de 1977;1(8010):549.
63. Twigt BA, Van Dalen T, Vroonhoven TJMVV, Consten ECJ. Recurrent hyperparathyroidism caused by benign neoplastic seeding: Two cases of parathyromatosis and a review of the literature. *Acta Chir Belg*. 2013;113(3):228–32.
64. Clarke CN, Katsonis P, Hsu TK, Koire AM, Silva-Figueroa A, Christakis I, et al. Comprehensive genomic characterization of parathyroid cancer identifies novel candidate driver mutations and core pathways. *J Endocr Soc*. Març de 2019;3(3):544–59.
65. Nosé V, Lazar AJ. Update from the 5th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumors: Familial Tumor Syndromes. *Head Neck Pathol*. Març de 2022;16(1):143–57.
66. Iacobone M, Carnaille B, Palazzo FF, Vriens M. Hereditary hyperparathyroidism—a consensus report of the European Society of Endocrine Surgeons (ESES). *Langenbecks Arch Surg*. Desembre de 2015;400(8):867-86.
67. Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, Bilezikian JP, Beck-Peccoz P, Bordi C, et al. Guidelines for Diagnosis and Therapy of MEN Type 1 and Type 2. *J Clin Endocrinol Metab*. Desembre de 2001;86(12):5658-71.

68. Eastell R, Brandi ML, Costa AG, D'Amour P, Shoback DM, Thakker R V. Diagnosis of asymptomatic primary hyperparathyroidism: Proceedings of the fourth international workshop. *J Clin Endocrinol Metab.* Octubre de 2014;99(10):3570-9.
69. Thakker RV., Newey PJ, Walls G V., Bilezikian J, Dralle H, Ebeling PR, et al. Clinical practice guidelines for multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). *J Clin Endocrinol Metab.* Setembre de 2012;97(9):2990-3011.
70. Lemos MC, Thakker R V. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): Analysis of 1336 mutations reported in the first decade following identification of the gene. *Hum Mutat.* Gener de 2008;29(1):22–32.
71. Thakker RV. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* Juny de 2010;24(3):355-70.
72. Farnebo F, Teh BT, Skytölä S, Svensson A, Phelan C, Sandelin K, et al. Alterations of the MEN1 gene in sporadic parathyroid tumors. *Agost de 1998;83(8):2627-30.*
73. Byström C, Larsson C, Blomberg C, Sandelin K, Falkmer U, Skogseid B, et al. Localization of the MEN1 gene to a small region within chromosome 11q13 by deletion mapping in tumors. *Proc Natl Acad Sci USA.* Març de 1990;87(5):1968-72.
74. Thakker RV. Multiple Endocrine Neoplasia-syndromes of the twentieth century. *J Clin Endocrinol Metab.* Agost de 1998;83(8):2617-20.
75. Alvelos MI, Vinagre J, Fonseca E, Barbosa E, Teixeira-Gomes J, Sobrinho-Simões M, et al. MEN1 intragenic deletions may represent the most prevalent somatic event in sporadic primary hyperparathyroidism. *Eur J Endocrinol.* Febrer de 2012;168(2):119–28.
76. Zablewska B, Bylund L, Mandic SA, Fromaget M, Gaudray P, Weber G. Transcription regulation of the multiple endocrine neoplasia type 1 gene in human and mouse. *J Clin Endocrinol Metab.* Agost de 2003 1;88(8):3845–51.
77. Bassett JH, Forbes SA, Pannett AAJ Lloyd SE, Christie PT, Wooding C, et al. Characterization of Mutations in Patients with Multiple Endocrine Neoplasia Type 1. *Am J Hum Genet.* Febrer de 1998;62(2):232-44.
78. Falchetti A. Genetics of parathyroids disorders: Overview. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* Desembre de 2018;32(6):781-790.
79. Thevenon J, Bourredjem A, Faivre L, Cardot-bauters C, Calender A, Murat A, et al. Higher risk of death among men1 patients with mutations in the jund interacting domain: A groupe d'étude des tumeurs endocrines (GTE) cohort study. *Hum Mol Genet.* Maig de 2013;22(10):1940–8.
80. Tham E, Grandell U, Lindgren E, Toss G, Skogseid B, Nordenskjöld M. Clinical testing for mutations in the MEN1 gene in Sweden: A report on 200 unrelated cases. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(9):3389–95.
81. Ruggeri RM, Benevento E, De Cicco F, Grossrubatscher EM, Hasballa I, Tarsitano MG, et al. Multiple endocrine neoplasia type 4 (MEN4): a thorough update on the latest and least known men syndrome. *Endocrine.* Desembre de 2023;82(3):480-490.
82. Cavaco BM, Domingues R, Bacelar MC, Cardoso H, Barros L, Gomes L, et al. Mutational analysis of Portuguese families with multiple endocrine neoplasia type 1 reveals large germline deletions. *Clin Endocrinol (Oxf).* Abril de 2002;56(4):465–73.
83. Belar O, De La Hoz C, Pérez-Nanclares G, Castaño L, Gaztambide Saénz S, Moreno A, et al. Novel mutations in MEN1, CDKN1B and AIP genes in patients with multiple endocrine neoplasia type 1 syndrome in Spain. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2012;76(5):719–24.
84. Marx SJ, Menczel J, Campbell G, Aurbach GD, Spiegel AM, Norton JA. Heterogeneous size of the parathyroid glands in familial multiple endocrine neoplasia type 1. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1991;35(6):521–6.

85. Tamiya H, Miyakawa M, Suzuki H, Takeshita A, Ohashi K, Usui T, et al. A large functioning parathyroid cyst in a patient with multiple endocrine neoplasia type 1. *Endocr J*. 2013;60(6):709–14.
86. Ospina NS, Sebo TJ, Thompson GB, Clarke BL, Young WF Jr. Prevalence of parathyroid carcinoma in 348 patients with multiple endocrine neoplasia type 1 - Case report and review of the literature. *Clin Endocrinol (Oxf)*. Febrer de 2016;84(2):244–9.
87. Christakis I, Busaidy NL, Cote GJ, Williams MD, Hyde SM, Silva Figueroa AM, et al. Parathyroid carcinoma and atypical parathyroid neoplasms in MEN1 patients; A clinico-pathologic challenge. The MD Anderson case series and review of the literature. *Int J Surg*. Juliol de 2016;31:10–6.
88. Lamas C, Navarro E, Casterás A, Portillo P, Alcázar V, Calatayud M, et al. MEN1-associated primary hyperparathyroidism in the spanish registry: Clinical characteristics and surgical outcomes. *Endocr Connect*. 2019;8(10):1416–24.
89. Eller-Vainicher C, Chiodini I, Battista C, Viti R, Mascia ML, Massironi S, et al. Sporadic and MEN1-related primary hyperparathyroidism: Differences in clinical expression and severity. *J Bone Miner Res*. Agost de 2009;24(8):1404–10.
90. Burgess JR, David R, Greenaway TM, Parameswaran V, Shepherd JJ. Osteoporosis in multiple endocrine neoplasia type 1: severity, clinical significance, relationship to primary hyperparathyroidism, and response to parathyroidectomy. *Arch Surg*. Octubre de 1999;134(10):1119-23.
91. Pieterman CRC, Vriens MR, Dreijerink KMA, Van Der Luijt RB, Valk GD. Care for patients with multiple endocrine neoplasia type 1: The current evidence base. *Fam Cancer*. Març de 2011;10(1):157–71.
92. Machens A, Schaaf L, Karges W, Frank-Raue K, Bartsch DK, Rothmund M, et al. Age-related penetrance of endocrine tumours in multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): A multicentre study of 258 gene carriers. *Clin Endocrinol (Oxf)*. Octubre de 2007;67(4):613–22.
93. Triponez F, Dosseh D, Goudet P, Cougard P, Bauters C, Murat A, et al. Epidemiology data on 108 MEN 1 patients from the GTE with isolated nonfunctioning tumors of the pancreas. *Ann Surg*. Febrer de 2006;243(2):265–72.
94. Niederle B, Selberherr A, Bartsch DK, Brandi ML, Doherty GM, Falconi M, et al. Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 and the Pancreas: Diagnosis and Treatment of Functioning and Non-Functioning Pancreatic and Duodenal Neuroendocrine Neoplasia within the MEN1 Syndrome - An International Consensus Statement. *Neuroendocrinology*. 2021;111(7):609–30.
95. Goudet P, Murat A, Binquet C, Cardot-Bauters C, Costa A, Ruszniewski P, et al. Risk factors and causes of death in men1 disease. a gte (groupe d'étude des tumeurs endocrines) cohort study among 758 patients. *World J Surg*. Febrer de 2010;34(2):249–55.
96. Blau JE, Simonds WF. Familial Hyperparathyroidism. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 25 de febrer de 2021;12:623667.
97. Simonds WF, Varghese S, Marx SJ, Nieman LK. Cushing's syndrome in multiple endocrine neoplasia type 1. *Clin Endocrinol (Oxf)*. Març de 2012;76(3):379–86.
98. Gatta-Cherifi B, Chabre O, Murat A, Niccoli P, Cardot-Bauters C, Rohmer V, et al. Adrenal involvement in MEN1. Analysis of 715 cases from the Groupe d'étude des Tumeurs Endocrines database. *Eur J Endocrinol*. Febrer de 2012;166(2):269–79.
99. Geerdink EAM, Van Der Luijt RB, Lips CJM. Do patients with multiple endocrine neoplasia syndrome type 1 benefit from periodical screening? *Eur J Endocrinol*. Desembre de 2003;149(6):577-82.
100. Brandi ML, Agarwal SK, Perrier ND, Lines KE, Valk GD, Thakker RV. Multiple Endocrine Neoplasia Type 1: Latest Insights. *Endocr Rev*. 15 de març de 2021;42(2):133-170.

101. Kloos RT, Eng C, Evans DB, Francis GL, Gagel RF, Gharib H, et al. Medullary Thyroid Cancer: Management Guidelines of the American Thyroid Association. *Thyroid*. Juny de 2009;19(6):565-612.
102. Wells SA Jr, Asa SL, Dralle H, Elisei R, Evans DB, Gagel RF, et al. Revised American Thyroid Association Guidelines for the Management of Medullary Thyroid Carcinoma. *Thyroid*. Juny de 2015;25(6):567–610.
103. Eng C, Plitt G; Multiple Endocrine Neoplasia Type 2. Gene Reviews® [Internet] 27 de setembre de 1999 [actualitzat el 10 d'agost de 2023]. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, et al., editors. [consultat el setembre de 2024]. Disponible a: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1257/>
104. Thakker RV. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) and type 4 (MEN4). *Mol Cell Endocrinol*. 5 d'abril de 2014;386(1-2):2-15.
105. Owens M, Ellard S, Vaidya B. Analysis of gross deletions in the MEN1 gene in patients with multiple endocrine neoplasia type 1. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008;68(3):350–4.
106. Pellegata NS, Quintanilla-Martinez L, Siggelkow H, Samson E, Bink K, Höfler H, et al. Germ-line mutations in p27Kip1 cause a multiple endocrine neoplasia syndrome in rats and humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 17 d'octubre de 2006;103(42):15558-63.
107. Franklin DS, Godfrey VL, O'brien DA, Deng C, Xiong Y. Functional Collaboration between Different Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors Suppresses Tumor Growth with Distinct Tissue Specificity. *Mol Cell Biol*. Agost del 2000;20(16):6147-58.
108. Fritz A, Walch A, Piotrowska K, Rosemann M, Schäffer E, Weber K, et al. Recessive Transmission of a Multiple Endocrine Neoplasia Syndrome in the Rat 1. *Cancer Res*. Juny de 2002;62(11):3048-51.
109. Philipp-Staheli J, Payne SR, Kemp CJ. p27Kip1: Regulation and function of a haploinsufficient tumor suppressor and its misregulation in cancer. *Exp Cell Res*. 10 de març de 2001;10;264(1):148–68.
110. Alevizaki M, Stratakis CA. Multiple endocrine neoplasias: advances and challenges for the future. *J Intern Med*. Juliol de 2009;266(1):1-4.
111. Ozawa A, Agarwal SK, Mateo CM, Burns AL, Rice TS, Kennedy PA, et al. The parathyroid/pituitary variant of multiple endocrine neoplasia type 1 usually has causes other than p27Kip1 mutations. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(5):1948–51.
112. Igreja S, Chahal HS, Akker SA, Gueorguiev M, Popovic V, Damjanovic S, et al. A heterozygous frameshift mutation in exon 1 of cdkn1B gene in a patient affected by MEN4 syndrome. *J Intern Med*. 2009;70(2):3048–51.
113. Occhi G, Regazzo D, Trivellin G, Boaretto F, Ciato D, Bobisse S, et al. A Novel Mutation in the Upstream Open Reading Frame of the CDKN1B Gene Causes a MEN4 Phenotype. *PLoS Genet*. Març de 2013;9(3):e1003350.
114. Singeisen H, Renzulli MM, Pavlicek V, Probst P, Hauswirth F, Muller MK, et al. Multiple endocrine neoplasia type 4: a new member of the MEN family. *Endocr Connect*. 15 de desembre de 2022;12(2).
115. Frederiksen A, Rossing M, Hermann P, Ejerdsted C, Thakker RV, Frost M. Clinical Features of Multiple Endocrine Neoplasia Type 4: Novel Pathogenic Variant and Review of Published Cases. *J Clin Endocrinol Metab*. 11 d'abril de 2019;104(9):3637–46.
116. Georgitsi M, Raitila A, Karhu A, Van Der Luijt RB, Aalfs CM, Sane T, et al. Brief report: Germline CDKN1B/p27Kip1 mutation in multiple endocrine neoplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(8):3321–5.

117. Molatore S, Marinoni I, Lee M, Pulz E, Ambrosio MR, Uberti EC, et al. A novel germline CDKN1B mutation causing multiple endocrine tumors: Clinical, genetic and functional characterization. *Hum Mutat*. Novembre de 2010;31(11):E1825-35.
118. Agarwal SK, Mateo CM, Marx SJ. Rare germline mutations in cyclin-dependent kinase inhibitor genes in multiple endocrine neoplasia type 1 and related states. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(5):1826–34.
119. Hengst L, Reed SI. Translational Control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science*. 29 de març de 1996;271(5257):1861-4.
120. Fero ML, Randel E, Gurley KE, Roberts JM, Kemp CJ. The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression. *Nature*. Novembre de 1998;396(6707):177-80.
121. Pannett AAJ, Thakker RV. Somatic Mutations in MEN Type 1 Tumors, Consistent with the Knudson “Two-Hit” Hypothesis. *J Clin Endocrinol Metab*. Setembre de 2001;86(9):4371-4.
122. Lee M, Pellegata NS. Multiple endocrine neoplasia type 4. *Front Horm Res*. 2013;41:63–78.
123. Alrezk R, Hannah-Shmouni F, Stratakis CA. MEN4 and CDKN1B mutations: The latest of the MEN syndromes. *Endocr Relat Cancer*. Octubre de 2017;24(10):T195-T208.
124. Pellegata NS. MENX and MEN4. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012;67 Suppl 1(Suppl 1):13-8.
125. Borsari S, Pardi E, Pellegata NS, Lee M, Saponaro F, Torregrossa L, et al. Loss of p27 expression is associated with MEN1 gene mutations in sporadic parathyroid adenomas. *Endocrine*. 2017;55(2):386–97.
126. Knut & Alice Wallenberg Foundation [Internet]. The human protein atlas, *CDKN1B*. Disponible a <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000111276-CDKN1B>.
127. Pappa V, Papageorgiou S, Papageorgiou E, Panani A, Boutou E, Tsirigotis P, et al. A novel p27 gene mutation in a case of unclassified myeloproliferative disorder. *Leuk Res*. 2005;29(2):229–31.
128. Tonelli F, Giudici F, Giusti F, Marini F, Cianferotti L, Nesi G, et al. A heterozygous frameshift mutation in exon 1 of *cdkn1b* gene in a patient affected by MEN4 syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2014;171(2).
129. Pardi E, Mariotti S, Pellegata NS, Benfini K, Borsari S, Saponaro F, et al. Functional characterization of a CDKN1B mutation in a Sardinian kindred with multiple endocrine neoplasia type 4. *Endocr Connect*. 2015;4:1–8.
130. Seabrook A, Wijewardene A, Sousa S de, Wong T, Sheriff N, Gill AJ, et al. MEN4, the MEN1 mimicker; A Case Series of three Phenotypically Heterogenous Patients With Unique CDKN1B Mutations. *J Clin Endocrinol Metab*. Juliol de 2022;107(8):2339-2349.
131. Costa-Guda J, Marinoni I, Molatore S, Pellegata NS, Arnold A. Somatic mutation and germline sequence abnormalities in CDKN1B, encoding p27Kip1, in sporadic parathyroid adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. Abril de 2011;96(4):E701-6.
132. Bugalho MJ, Domingues R. Uncommon association of cerebral meningioma, parathyroid adenoma and papillary thyroid carcinoma in a patient harbouring a rare germline variant in the CDKN1B gene. *BMJ Case Rep*. 13 de gener de 2016;2016:bcr2015213934.
133. Sambugaro S, Di Ruvo M, Ambrosio MR, Pellegata NS, Bellio M, Guerra A, et al. Early onset acromegaly associated with a novel deletion in CDKN1B 5'UTR region. *Endocrine*. 2015;49(1):58–64.
134. Malanga D, De Gisi S, Riccardi M, Scrima M, De Marco C, Robledo M, et al. Functional characterization of a rare germline mutation in the gene encoding the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 (CDKN1B) in a Spanish patient with multiple endocrine neoplasia-like phenotype. *Eur J Endocrinol*. 2012;166(3):551–60.

135. Chasseloup F, Pankratz N, Lane J, Faucz FR, Keil MF, Chittiboina P, et al. Germline CDKN1B loss-of-function variants cause pediatric Cushing's disease with or without an MEN4 phenotype. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105(6):1–23.
136. Elston MS, Meyer-rochow GY, Dray M, Swarbrick M, Conaglen J V. Case Report Early Onset Primary Hyperparathyroidism Associated with a Novel Germline Mutation in CDKN1B. *Case Rep Endocrinol.* 2015;2015:510985.
137. Tichomirowa MA, Lee M, Barlier A, Daly AF, Marinoni I, Jaffrain-Rea ML, et al. Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B(CDKN1B) gene variants in AIP mutation-negative familial isolated pituitary adenoma kindreds. *Endocr Relat Cancer.* 2012;19(3):233–41.
138. de LaPiscina IM, Najera NP, Rica I, Gaztambide S, Webb SM, Santos A, et al. Clinical and genetic characteristics in patients under 30 years with sporadic pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol.* 2021;185(4):485–96.
139. Lavezzi E, Brunetti A, Smirollo V, Nappo G, Pedicini V, Vitali E, et al. Case Report: New CDKN1B Mutation in Multiple Endocrine Neoplasia Type 4 and Brief Literature Review on Clinical Management. *Front Endocrinol (Lausanne).* Març de 2022;13:773143.
140. Chevalier B, Odou MF, Demonchy J, Cardot-Bauters C, Vantyghem MC. Multiple Endocrine Neoplasia Type 4: Novel CDKN1B variant and immune anomalies. *Ann Endocrinol (Paris) [Internet].* Juny de 2020;81(2-3):124-125.
141. Brock P, Bustamante Alvarez J, Mortazavi A, Roychowdhury S, Phay J, Khawaja RA, et al. Co-occurrence of multiple endocrine neoplasia type 4 and spinal neurofibromatosis: a case report. *Fam Cancer* Abril de 2020;19(2):189–192.
142. Newey PJ. Hereditary Primary Hyperparathyroidism. *Endocrinol Metab Clin North Am.* Desembre de 2021;50(4):663-681.
143. Chevalier B, Coppin L, Romanet P, Cuny T, Maïza JC, Abeillon J, et al. Beyond MEN1, When to Think About MEN4? Retrospective Study on 5600 Patients in the French Population and Literature Review. *J Clin Endocrinol Metab.* 17 de juny de 2024;109(7):e1482-e1493.
144. Marx SJ, Goltzman D. Evolution of Our Understanding of the Hyperparathyroid Syndromes: A Historical Perspective. *J Bone Miner Res.* Gener de 2019;34(1):22-37.
145. Kirsch M, Mörz M, Pinzer T, Schackert HK, Schackert G. Frequent Loss of the CDKN2C (p18INK4c) Gene Product in Pituitary Adenomas. *Genes Chromosomes Cancer.* 2009;48:143–54.
146. Scherthaner-Reiter MH, Trivellin G, Stratakis CA. MEN1, MEN4, and Carney Complex: Pathology and Molecular Genetics. *Neuroendocrinology.* 2016;103(1):18–31.
147. Seabrook AJ, Harris JE, Velosa SB, Kim E, McInerney-Leo AM, Dwight T, et al. Multiple Endocrine Tumors Associated with Germline MAX Mutations: Multiple Endocrine Neoplasia Type 5? *J Clin Endocrinol Metab.* Abril de 2021;106(4):1163–82.
148. Pozza C, Sesti F, Di Dato C, Sbardella E, Pofi R, Schiavi F, et al. A Novel MAX Gene Mutation Variant in a Patient With Multiple and “Composite” Neuroendocrine–Neuroblastic Tumors. *Front Endocrinol (Lausanne).* 19 de maig de 2020;11:234.
149. Petignot S, Daly AF, Castermans E, Korpershoek E, Scagnol I, Beckers P, et al. Pancreatic Neuroendocrine Neoplasm Associated with a Familial MAX Deletion. *Hormone and Metabolic Research.* Novembre de 2020;52(11):784–7.
150. Jackson CE, Norum RA, Boyd SB, Talpos GB, Wilson SD, Taggart RT, et al. Hereditary hyperparathyroidism and multiple ossifying jaw fibromas: A clinically and genetically distinct syndrome. *Surgery.* Desembre de 1990;108(6):1006-12; discussion 1012-3.
151. Carpten JD, Robbins CM, Villablanca A, Forsberg L, Presciuttini S, Bailey-Wilsons J, et al. HRPT2, encoding parafibromin, is mutated in hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome. *Nat Genet.* Desembre de 2002;32(4):676–80.

152. Torresan F, Iacobone M. Clinical Features, Treatment, and Surveillance of Hyperparathyroidism-Jaw Tumor Syndrome: An Up-to-Date and Review of the Literature. *Int J Endocrinol*. 18 de desembre de 2019;2019:1761030.
153. Kikuchi I, Takahashi-Kanemitsu A, Sakiyama N, Tang C, Tang PJ, Noda S, et al. Dephosphorylated parafibromin is a transcriptional coactivator of the Wnt/Hedgehog/Notch pathways. *Nat Commun*. 21 de setembre de 2016;7:12887.
154. Jo JH, Chung TM, Youn H, Yoo JY. Cytoplasmic parafibromin/hCdc73 targets and destabilizes p53 mRNA to control p53-mediated apoptosis. *Nat Commun*. 12 de novembre de 2014;5:5433.
155. Bricaire L, Odou MF, Cardot-Bauters C, Delemer B, North MO, Salenave S, et al. Frequent large germline HRPT2 deletions in a french national cohort of patients with primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. Febrer de 2013;98(2):E403-8.
156. Cascón A, Huarte-Mendicoa CV, Javier Leandro-García L, Letón R, Suela J, Santana A, et al. Detection of the first gross CDC73 germline deletion in an HPT-JT syndrome family. *Genes Chromosomes Cancer*. Novembre de 2011;50(11):922-9.
157. Bradley K, Hobbs M, Buley I, Carpten JD, Cavaco BM, Fares J, et al. Uterine tumours are a phenotypic manifestation of the hyperparathyroidism-jaw tumour syndrome. *J Intern Med*. Gener de 2005;257(1):18-26.
158. Frank-Raue K, Haag C, Schulze E, Keuser R, Raue F, Dralle H, et al. CDC73-related hereditary hyperparathyroidism: Five new mutations and the clinical spectrum. *Eur J Endocrinol*. Setembre de 2011;165(3):477-83.
159. Li Y, Zhang J, Adikaram PR, Welch J, Guan B, Weinstein LS, et al. Genotype of CDC73 germline mutation determines risk of parathyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2020;27(9):483-94.
160. Hahn MA, Marsh DJ. Nucleolar localization of parafibromin is mediated by three nucleolar localization signals. *FEBS Lett*. 30 d'octubre de 2007;581(26):5070-4.
161. Iacobone M, Camozzi V, Mian C, Pennelli G, Pagetta C, Casal Ide E, et al. Long-Term Outcomes of Parathyroidectomy in Hyperparathyroidism-Jaw Tumor Syndrome: Analysis of Five Families with CDC73 Mutations. *World J Surg*. Febrer de 2020;44(2):508-16.
162. Rodrigo JP, Hernandez-Prera JC, Randolph GW, Zafereo ME, Hartl DM, Silver CE, et al. Parathyroid cancer: An update. *Cancer Treat Rev*. Juny de 2020;86:102012.
163. Stålberg P, Carling T. Familial parathyroid tumors: Diagnosis and management. *World J Surg*. Novembre de 2009;33(11):2234-43.
164. Woodard GE, Lin L, Zhang JH, Agarwal SK, Marx SJ, Simonds WF. Parafibromin, product of the hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome gene HRPT2, regulates cyclin D1/PRAD1 expression. *Oncogene*. 10 de febrer de 2005;24(7):1272-6.
165. Liu Y, You M, Wang H, Yang Z, Miao J, Shimizutani K, et al. Ossifying fibromas of the jaw bone: 20 cases. *Dentomaxillofac Radiol*. Gener de 2010;39(1):57-63.
166. Amini Nezhad F, Payab M, Nayebandi S, Hasani-Ranjbar S. Jaw tumor in recurrent primary hyperparathyroidism: A case report. *Int J Surg Case Rep*. Gener de 2018;52:54-58.
167. Yamashita Y, Akiyama T, Mizusawa N, Yoshimoto K, Goto M. A case of hyperparathyroidism-jaw tumour syndrome found in the treatment of an ossifying fibroma in the maxillary bone. *Int J Oral Maxillofac Surg*. Abril de 2007;36(4):365-9.
168. Tean Teh B, Farnebo F, Kristoffersson U, Sundelin B, Cardinal J, Axelson R, et al. Autosomal dominant primary hyperparathyroidism and jaw tumor syndrome associated with renal hamartomas and cystic kidney disease: linkage to 1q21-q32 and loss of the wild type allele in renal hamartomas. *J Clin Endocrinol Metab*. Desembre de 1996;81(12):4204-11.

169. Zheng HC, Takahashi H, Li XH, Hara T, Masuda S, Guan YF, et al. Downregulated parafibromin expression is a promising marker for pathogenesis, invasion, metastasis and prognosis of gastric carcinomas. *Virchows Archiv*. Febrer de 2008;452(2):147–55.
170. Selvarajan S, Sii LH, Lee A, Yip G, Bay BH, Tan MH, et al. Parafibromin expression in breast cancer: A novel marker for prognostication? *J Clin Pathol*. Gener de 2008;61(1):64–7.
171. Korpi-Hyövälti E, Cranston T, Ryhänen E, Arola J, Aittomäki K, Sane T, et al. CDC73 intragenic deletion in familial primary hyperparathyroidism associated with parathyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. Setembre de 2014;99(9):3044–8.
172. Iacobone M, Masi G, Barzon L, Porzionato A, MacChi V, Ciarleglio FA, et al. Hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome: A report of three large kindred. *Langenbecks Arch Surg*. Setembre de 2009;394(5):817–25.
173. T P Foley Jr, H C Harrison, C D Arnaud, H E Harrison. Familial benign hypercalcemia. *J Pediatr*. Desembre de 1972;81(6):1060–7.
174. Newey PJ, Berg JN, Zhou K, Palmer CNA, Thakker R V. Utility of population-level DNA sequence data in the diagnosis of hereditary endocrine disease. *J Endocr Soc*. 2017;1(12):1507–26.
175. Dershem R, Gorvin CM, Metpally RPR, Krishnamurthy S, Smelser DT, Hannan FM, et al. Familial Hypocalciuric Hypercalcemia Type 1 and Autosomal-Dominant Hypocalcemia Type 1: Prevalence in a Large Healthcare Population. *Am J Hum Genet*. 4 de juny de 2020;106(6):734–47.
176. Hannan FM, Nesbit MA, Zhang C, Cranston T, Curley AJ, Harding B, et al. Identification of 70 calcium-sensing receptor mutations in hyper- and hypo-calcaemic patients: Evidence for clustering of extracellular domain mutations at calcium-binding sites. *Hum Mol Genet*. Juny de 2012;21(12):2768–78.
177. Christensen SE, Nissen PH, Vestergaard P, Mosekilde L. Familial hypocalciuric hypercalcaemia: A review. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. Desembre de 2011;18(6):359–70.
178. Mouly C, Vargas-Poussou R, Lienhardt A, Silve C, Hureauux M, Magdelaine C, et al. Clinical characteristics of familial hypocalciuric hypercalcaemia type 1: A multicentre study of 77 adult patients. *Clin Endocrinol (Oxf)*. Setembre de 2020;93(3):248–260.
179. Pollak MR, Brown EM, Estep HL, McLaine PN, Kifor O, Park J, et al. Autosomal dominant hypocalcaemia caused by a Ca(2+)-sensing receptor gene mutation. *Nat Genet*. Novembre de 1994;8(3):303–7.
180. S Pearce SH, Trump D, Wooding C, Besser GM, Chew SL, Grant DB, et al. Calcium-sensing Receptor Mutations in Familial Benign Hypercalcemia and Neonatal Hyperparathyroidism. *J Clin Invest*. Desembre de 1995. 96(6):2683–92.
181. Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Klfor O, et al. Cloning and characterization of an extracellular Calcium-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature*. Desembre de 1993;366:575–80.
182. Tfelt-Hansen J, Brown EM. The calcium-sensing receptor in normal physiology and pathophysiology: A review. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2005;42(1):35–70.
183. Marini F, Cianferotti L, Giusti F, Brandi ML. Molecular genetics in primary hyperparathyroidism: the role of genetic tests in differential diagnosis, disease prevention strategy, and therapeutic planning. A 2017 update. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2017;14(1):60–70.
184. Vargas-Poussou R, Mansour-Hendili L, Baron S, Bertocchio JP, Travers C, Simian C, et al. Familial hypocalciuric hypercalcemia types 1 and 3 and primary hyperparathyroidism: Similarities and differences. *J Clin Endocrinol Metab*. Maig de 2016;101(5):2185–95.

185. Hovden S, Rejnmark L, Ladefoged SA, Nissen PH. AP2S1 and GNA11 mutations - not a common cause of familial hypocalciuric hypercalcemia. *Eur J Endocrinol*. Febrer de 2017;176(2):177-185.
186. Vannucci L, Brandi ML. Familial Hypocalciuric Hypercalcemia and Neonatal Severe Hyperparathyroidism. *Front Horm Res*. 2018;51:52–62.
187. Gorvin CM, Frost M, Malinauskas T, Cranston T, Boon H, Siebold C, et al. Calcium-sensing receptor residues with loss-and gain-of-function mutations are located in regions of conformational change and cause signalling bias. *Hum Mol Genet*. Novembre de 2018;27(21):3720-3733.
188. Hannan FM, Stevenson M, Bayliss AL, Stokes VJ, Stewart M, Kooblall KG, et al. Ap2s1 mutation causes hypercalcaemia in mice and impairs interaction between calcium-sensing receptor and adaptor protein-2. *Hum Mol Genet*. 15 de maig de 2021;30(10):880–92.
189. Nesbit MA, Hannan FM, Howles SA, Babinsky VN, Head RA, Cranston T, et al. Mutations Affecting G-Protein Subunit α 11 in Hypercalcemia and Hypocalcemia. *N Engl J Med*. 27 de juny de 2013;368(26):2476–86.
190. Hannan FM, Howles SA, Rogers A, Cranston T, Gorvin CM, Babinsky VN, et al. Adaptor protein-2 sigma subunit mutations causing familial hypocalciuric hypercalcaemia type 3 (FHH3) demonstrate genotype-phenotype correlations, codon bias and dominant-negative effects. *Hum Mol Genet*. 9 d'abril de 2015;24(18):5079–92.
191. Marx SJ, Lourenco DM Jr. Familial Hyperparathyroidism – Disorders of Growth and Secretion in Hormone-Secretory Tissue. *Horm Metab Res*. Novembre de 2017;49(11):805-815.
192. Simonds WF, James-Newton L, Agarwal SK, Yang B, Skarulis MC, Hendy GN, et al. Familial Isolated hyperparathyroidism. Clinical and Genetic Characteristics of 36 Kindreds. *Medicine*. 2002;81(1):1–26.
193. Carling T, Szabo E, Bai M, Ridefelt P, Westin G, Gustavsson P, et al. Familial Hypercalcemia and Hypercalciuria Caused by a Novel Mutation in the Cytoplasmic Tail of the Calcium Receptor. *J Clin Endocrinol Metab*. Maig del 2000;85(5):2042-7.
194. Guarnieri V, Canaff L, Yun FHJ, Scillitani A, Battista C, Muscarella LA, et al. Calcium-Sensing Receptor (CASR) mutations in hypercalcemic states: Studies from a single endocrine clinic over three years. *J Clin Endocrinol Metab*. Abril de 2010;95(4):1819-29.
195. Volpe A, Guerriero A, Marchetta A, Caramaschi P, Furlani L. Familial hypocalciuric hypercalcemia revealed by chondrocalcinosis. *Joint Bone Spine*. Desembre de 2009;76(6):708–10.
196. Lee JY, Shoback DM. Familial hypocalciuric hypercalcemia and related disorders. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. Octubre de 2018;32(5):609-619.
197. Hannan FM, Kallay E, Chang W, Brandi ML, Thakker R V. The calcium-sensing receptor in physiology and in calcitropic and noncalcitropic diseases. *Nat Rev Endocrinol*. Desembre de 2018;15(1):33-51.
198. Papadakis M, Meurer N, Margariti T, Meyer A, Weyerbrock N, Dotzenrath C. A novel mutation of the calcium-sensing receptor gene in a German subject with familial hypocalciuric hypercalcemia and primary hyperparathyroidism. *Hormones (Athens)*. Octubre de 2016;15(4):557-559.
199. Bertocchio JP, Tafflet M, Koumakis E, Maruani G, Vargas-Poussou R, Silve C, et al. Pro-FHH: A risk equation to facilitate the diagnosis of parathyroid-related hypercalcemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 1 de juliol de 2018;103(7):2534-2542.
200. Asla Q, Sardà H, Seguí N, Martínez de Pinillos G, Mazarico-Altisent I, Capel I, et al. Clinical and outcome comparison of genetically positive vs. negative patients in a large cohort of suspected familial hypocalciuric hypercalcemia. *Endocrine*. Març de 2024;83(3):747–56.

201. Szalat A, Shpitzen S, Tsur A, Zalmon Koren I, Shilo S, Tripto-Shkolnik L, et al. Stepwise CaSR, AP2S1, and GNA11 sequencing in patients with suspected familial hypocalciuric hypercalcemia. *Endocrine*. Març de 2017;55(3):741–7.
202. Newey PJ, Hannan FM, Wilson A, Thakker R V. Genetics of monogenic disorders of calcium and bone metabolism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. Octubre de 2022;97(4):483-501.
203. Miñambres I, Corcoy R, Weetman AP, Kemp EH. Autoimmune hypercalcemia due to autoantibodies against the calcium-sensing receptor. *J Clin Endocrinol Metab*. Juliol de 2020;105(7):dgaa219.
204. Kifor O, Moore FD, Delaney M, Garber J, Hendy GN, Butters R, et al. A syndrome of hypocalciuric hypercalcemia caused by autoantibodies directed at the calcium-sensing receptor. *J Clin Endocrinol Metab*. Gener de 2003;88(1):60–72.
205. Pallais JC, Kemp EH, Bergwitz C, Kantham L, Slovik DM, Weetman AP, et al. Autoimmune hypocalciuric hypercalcemia unresponsive to glucocorticoid therapy in a patient with blocking autoantibodies against the calcium-sensing receptor. *J Clin Endocrinol Metab*. Març de 2011;96(3):672–80.
206. Dharmaraj P, Gorvin CM, Soni A, Nelhans ND, Olesen MK, Boon H, et al. Neonatal Hypocalcemic Seizures in Offspring of a Mother with Familial Hypocalciuric Hypercalcemia Type 1 (FHH1). *J Clin Endocrinol Metab*. 1 de maig de 2020;105(5):1393–400.
207. Stokes VJ, Nielsen MF, Hannan FM, Thakker R V. Hypercalcemic Disorders in Children. *J Bone Miner Res*. Novembre de 2017;32(11):2157-2170.
208. Burski K, Torjussen B, Paulsen AQ, Boman H, Bollerslev J. Parathyroid Adenoma in a Subject with Familial Hypocalciuric Hypercalcemia: Coincidence or Causality? *J Clin Endocrinol Metab*. Març de 2002;87(3):1015-6.
209. Frank-Raue K, Leidig-Bruckner G, Haag C, Schulze E, Lorenz A, Schmitz-Winnenthal H, et al. Inactivating calcium-sensing receptor mutations in patients with primary hyperparathyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011;75(1):50–5.
210. Egan AM, Ryan J, Aziz MA, O'Dwyer TP, Byrne MM. Primary hyperparathyroidism in a patient with familial hypocalciuric hypercalcaemia due to a novel mutation in the calcium-sensing receptor gene. *J Bone Miner Metab*. Juliol de 2013;31(4):477–80.
211. Yabuta T, Miyauchi A, Inoue H, Yoshida H, Hirokawa M, Amino N. A patient with primary hyperparathyroidism associated with familial hypocalciuric hypercalcemia induced by a novel germline CASR gene mutation. *Asian J Surg*. 2009;32(2):118–22.
212. De Sousa SMC, Carroll RW, Henderson A, Burgess J, Clifton-Bligh RJ. A contemporary clinical approach to genetic testing for heritable hyperparathyroidism syndromes. *Endocrine*. Gener de 2022;75(1):23-32.
213. Mukhtar NN, Abouzied MEDM, Alqahtani MH, Hammami MM. Misleading localization by 18F-fluorocholine PET/CT in familial hypocalciuric hypercalcemia type-3: a case report. *BMC Endocr Disord*. Desembre de 2021;21(1).
214. Mayr B, Schnabel D, Dörr HG, Schöfl C. GENETICS IN ENDOCRINOLOGY: Gain and loss of function mutations of the calcium-sensing receptor and associated proteins: current treatment concepts. *Eur J Endocrinol*. Maig de 2016;174(5):R189-208.
215. Hannan FM, Babinsky VN, Thakker R V. Disorders of the calcium-sensing receptor and partner proteins: Insights into the molecular basis of calcium homeostasis. *J Mol Endocrinol*. Octubre de 2016;57(3):R127-42.
216. DeLellis RA, Mangray S. Heritable forms of primary hyperparathyroidism: a current perspective. *Histopathology*. Gener de 2018;72(1):117-132.

217. Gulcan-Kersin S, Kirkgoz T, Eltan M, Rzayev T, Ata P, Bilgen H, et al. Cinacalcet as a First-Line Treatment in Neonatal Severe Hyperparathyroidism Secondary to Calcium Sensing Receptor (CaSR) Mutation. *Horm Res Paediatr*. Deseembre de 2020;93(5):313–21.
218. Suzuki Y, Chitayat D, Sawada H, Deardorff MA, McLaughlin HM, Begtrup A, et al. TRPV6 Variants Interfere with Maternal-Fetal Calcium Transport through the Placenta and Cause Transient Neonatal Hyperparathyroidism. *Am J Hum Genet*. 7 de juny de 2018;102(6):1104–1114.
219. Nett V, Erhardt N, Wyatt A, Wissenbach U. Human TRPV6-pathies caused by gene mutations. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. Juny de 2021;1865(6):129873.
220. Khattar V, Wang L, Peng J Bin. Calcium selective channel TRPV6: Structure, function, and implications in health and disease. *Gene*. 5 d'abril de 2022 5;817:146192.
221. Suzuki Y, Sawada H, Tokumasu T, Suzuki S, Ninomiya S, Shirai M, et al. Novel TRPV6 mutations in the spectrum of transient neonatal hyperparathyroidism. *J Physiol Sci*. Juliol de 2020;70(1):33.
222. Peng J Bin. TRPV5 and TRPV6 in transcellular Ca²⁺ transport: Regulation, gene duplication, and polymorphisms in African populations. *Adv Exp Med Biol*. 2011;704:239–75.
223. Burren CP, Caswell R, Castle B, Welch CR, Hilliard TN, Smithson SF, et al. TRPV6 compound heterozygous variants result in impaired placental calcium transport and severe undermineralization and dysplasia of the fetal skeleton. *Am J Med Genet A*. Setembre de 2018;176(9):1950–5.
224. Yamashita S, Mizumoto H, Sawada H, Suzuki Y, Hata D. TRPV6 gene mutation in a dizygous twin with transient neonatal hyperparathyroidism. *J Endocr Soc*. Març de 2019;3(3):602–6.
225. Li D, Tian L, Hou C, Kim CE, Hakonarson H, Levine MA. Association of mutations in SLC12A1 encoding the NKCC2 cotransporter with neonatal primary hyperparathyroidism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Maig de 2016;101(5):2196–200.
226. Gross I, Siedner-Weintraub Y, Simckes A, Gillis D. Antenatal Bartter syndrome presenting as hyperparathyroidism with hypercalcemia and hypercalciuria: A case report and review. *J Pediatr Endocrinol Metab*. Juliol de 2015;28(7-8):943–6.
227. Guan B, Welch JM, Sapp JC, Ling H, Li Y, Johnston JJ, et al. GCM2-Activating Mutations in Familial Isolated Hyperparathyroidism. *Am J Hum Genet*. 3 de novembre de 2016;99(5):1034–44.
228. Hannan FM, Nesbit MA, Christie PT, Fratter C, Dudley NE, Sadler GP, et al. Familial isolated primary hyperparathyroidism caused by mutations of the MEN1 gene. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. Gener de 2008;4(1):53–8.
229. Cetani F, Pardi E, Aretini P, Saponaro F, Borsari S, Mazoni L, et al. Whole exome sequencing in familial isolated primary hyperparathyroidism. *J Endocrinol Invest*. Febrer de 2020;43(2):231–45.
230. Simonds WF, Robbins CM, Agarwal SK, Hendy GN, Carpten JD, Marx SJ. Familial Isolated Hyperparathyroidism Is Rarely Caused by Germline Mutation in HRPT2, the Gene for the Hyperparathyroidism-Jaw Tumor Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. Gener de 2004;89(1):96–102.
231. Pontikides N, Karras S, Kaprara A, Anagnostis P, Mintziori G, Goulis DG, et al. Genetic basis of familial isolated hyperparathyroidism: A case series and a narrative review of the literature. *J Bone Miner Metab*. 2014;32(4):351–66.
232. Attie MF, Gill JR, Stock JL, Spiegel AM, Downs RW, Levine MA, et al. Urinary calcium excretion in familial hypocalciuric hypercalcemia persistence of relative hypocalciuria after induction of hypoparathyroidism. *J Clin Invest*. Agost de 1983;72(2):667–76.

233. Coppin L, Dufosse M, Romanet P, Giraud S, North MO, Bauters CC, et al. Should the GCM2 gene be tested when screening for familial primary hyperparathyroidism? *Eur J Endocrinol.* 2019;182(1):57–65.
234. El Lakis M, Nockel P, Gaitanidis A, Guan B, Agarwal S, Welch J, et al. Probability of Positive Genetic Testing Results in Patients with Family History of Primary Hyperparathyroidism. *J Am Coll Surg.* Maig de 2018;226(5):933–8.
235. Skefos CM, Waguespack SG, Perrier ND, Hu MI. *CDC73*-Related Disorders. 2008 Dec 31 [actualitzat el setembre de 2023]. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2025. Disponible a: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3789/>
236. Raitila A, Georgitsi M, Karhu A, Tuppurainen K, Mäkinen MJ, Birkenkamp-Demtröder K, et al. No evidence of somatic aryl hydrocarbon receptor interacting protein mutations in sporadic endocrine neoplasia. *Endocr Relat Cancer.* Setembre de 2007;14(3):901–6.
237. Vierimaa O, Georgitsi M, Lehtonen R, Vahteristo P, Kokko A, Raitila A, et al. Pituitary adenoma predisposition caused by germline mutations in the AIP gene. *Science* (1979). 26 de maig de 2006;312(5777):1228–30.
238. Pardi E, Borsari S, Saponaro F, Bogazzi F, Urbani C, Mariotti S, et al. Mutational and large deletion study of genes implicated in hereditary forms of primary hyperparathyroidism and correlation with clinical features. *PLoS One.* 1 d'octubre de 2017;12(10).
239. Pardi E, Marcocci C, Borsari S, Saponaro F, Torregrossa L, Tancredi M, et al. Aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) mutations occur rarely in sporadic parathyroid adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* Juliol de 2013;98(7):2800–10.
240. Au AY, McDonald K, Gill A, Sywak M, Diamond T, Conigrave A, et al. PTH Mutation with Primary Hyperparathyroidism and Undetectable Intact PTH. *N Engl J Med.* 11 de setembre de 2008;359(11):1184–6.
241. Giusti F, Marini F, Brandi ML. Multiple Endocrine Neoplasia Type 1. 2005 Aug 31 [actualitzat el 10 de març de 2022]. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2025. Disponible a: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1538/>
242. Brock P, Kirschner L. Multiple Endocrine Neoplasia Type 4. 21 de setembre de 2023. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2025. Disponible a: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK594826/>
243. Rylander-Rudqvist T, Håkansson N, Tybring G, Wolk A. Quality and quantity of saliva DNA obtained from the self-administrated oragene method - A pilot study on the cohort of Swedish men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* Setembre de 2006;15(9):1742–5.
244. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* Maig de 2015;17(5):405–24.
245. Milat F, Ramchand SK, Herath M, Gundara J, Harper S, Farrell S, et al. Primary hyperparathyroidism in adults-(Part I) assessment and medical management: Position statement of the endocrine society of Australia, the Australian & New Zealand endocrine surgeons, and the Australian & New Zealand bone and mineral society. *Clin Endocrinol (Oxf).* Gener de 2024;100(1):3–18.
246. NHS. National Genomic Test Directory Testing Criteria for Rare and Inherited Disease. Octubre de 2021;2022(October):280. Disponible a: <https://www.england.nhs.uk/wp-content/uploads/2018/08/rare-and-inherited-disease-eligibility-criteria-v2.pdf>

247. Oucharek JJ, O'Neill CJ, Suliburk JW, Sywak MS, Delbridge LW, Sidhu SB. Durability of focused minimally invasive parathyroidectomy in young patients with sporadic primary hyperparathyroidism. *Ann Surg Oncol*. Maig de 2011;18(5):1290–2.
248. Skandarajah A, Barlier A, Morlet-Barlat N, Sebag F, Enjalbert A, Conte-Devolx B, et al. Should routine analysis of the MEN1 gene be performed in all patients with primary hyperparathyroidism under 40 years of age? *World J Surg*. Juny de 2010;34(6):1294–8.
249. Khan AA, Hanley DA, Rizzoli R, Bollerslev J, Young JEM, Rejnmark L, et al. Primary hyperparathyroidism: review and recommendations on evaluation, diagnosis, and management. A Canadian and international consensus. *Osteoporos Int*. Gener de 2017;28(1):1–19.
250. Cetani F, Saponaro F, Borsari S, Marcocci C. Familial and Hereditary Forms of Primary Hyperparathyroidism. *Front Horm Res*. 2018;51:40–51.
251. Wilhelm SM, Wang TS, Ruan DT, Lee JA, Asa SL, Duh QY, et al. The American association of endocrine surgeons guidelines for definitive management of primary hyperparathyroidism. *JAMA Surg*. Octubre de 2016;151(10):959–68.
252. Cetani F, Dinoi E, Pierotti L, Pardi E. Familial states of primary hyperparathyroidism: an update. *J Endocrinol Invest*. Setembre de 2024;47(9):2157–2176.
253. Cetani F, Pardi E, Ambrogini E, Lemmi M, Borsari S, Cianferotti L, et al. Genetic analyses in familial isolated hyperparathyroidism: Implication for clinical assessment and surgical management. *Clin Endocrinol (Oxf)*. Febrer de 2006;64(2):146–52.
254. Vierimaa O, Villablanca A, Alimov A, Georgitsi M, Raitila A, Vahteristo P, et al. Mutation analysis of MEN1, HRPT2, CASR, CDKN1B, and AIP genes in primary hyperparathyroidism patients with features of genetic predisposition. *J Endocrinol Invest*. Juny de 2009;32(6):512–8.
255. El Allali Y, Hermetet C, Bacchetta J, Amouroux C, Rothenbuhler A, Porquet-Bordes V, et al. Presenting features and molecular genetics of primary hyperparathyroidism in the paediatric population. *Eur J Endocrinol*. 2021;184(2):347–55.
256. García- Castaño A, Madariaga L, Nanclares G, Ariceta G, Gaztambide S, Castaño L. Novel mutations associated with inherited human calcium-sensing receptor disorders: A clinical genetic study. *Eur J Endocrinol*. Gener de 2019;180(1):59–70.
257. Mariathasan S, Andrews K, Thompson E, Armstrong R, Park SM, Casey R, et al. Genetic testing for hereditary hyperparathyroidism in a large UK cohort. *Clin Endocrinol (Oxf)*. Octubre de 2020;93(4):409–418.
258. Starker LF, Åkerström T, Long WD, Delgado-Verdugo A, Donovan P, Udelsman R, et al. Frequent Germ-Line Mutations of the MEN1, CASR, and HRPT2/CDC73 Genes in Young Patients with Clinically Non-familial Primary Hyperparathyroidism. *Horm Cancer*. Abril de 2012;3(1–2):44–51.
259. Mizusawa N, Uchino S, Iwata T, Tsuyuguchi M, Suzuki Y, Mizukoshi T, et al. Genetic analyses in patients with familial isolated hyperparathyroidism and hyperparathyroidism-jaw tumour syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. Juliol de 2006;65(1):9–16.
260. Mamedova E, Mokrysheva N, Vasilyev E, Petrov V, Pigarova E, Kuznetsov S, et al. Primary hyperparathyroidism in young patients in Russia: High frequency of hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome. *Endocr Connect*. Novembre de 2017;6(8):557–65.
261. Warner J, Epstein M, Sweet A, Singh D, Burgess J, Stranks S, et al. Genetic testing in familial isolated hyperparathyroidism: Unexpected results and their implications. *J Med Genet*. 2004;41(3):155–60.
262. Muntean A, Mazarico Altisent I, Capel Flores I, Hernández Lázaro A, Casamitjana Espuña L, Barcons Vilaplana S, et al. Novel germline variant of CDC73 identified during screening for familial primary hyperparathyroidism. *Endocrine Abstracts*. 2024;99,EP8 [Internet]. Disponible a: <https://www.endocrine-abstracts.org/ea/0099/ea0099ep8>

263. Christensen SE, Nissen PH, Vestergaard P, Heickendorff L, Rejnmark L, Brixen K, et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D, 1,25-dihydroxyvitamin D, and parathyroid hormone in familial hypocalciuric hypercalcemia and primary hyperparathyroidism. *Eur J Endocrinol*. Desembre de 2008;159(6):719–27.
264. Elizabeth Forde H, Hill AD, Smith D. Parathyroid adenoma in a patient with familial hypocalciuric hypercalcaemia. *BMJ Case Rep*. 15 d'octubre de 2014;2014:bcr2014206473.
265. Cetani F, Picone A, Cerrai P, Vignali E, Borsari S, Pardi E, et al. Parathyroid Expression of Calcium-Sensing Receptor Protein and in Vivo Parathyroid Hormone-Ca²⁺ Set-Point in Patients with Primary Hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. Desembre del 2000;85(12):4789–94.
266. Farnebo F, Enberg U, Grimelius L, Bäckdahl M, Schalling M, Larsson C, et al. Tumor-specific decreased expression of calcium sensing receptor messenger ribonucleic acid in sporadic primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. Octubre de 1997;82(10):3481-6.
267. Hosokawa Y, Pollak MR, Brown EM, Arnold A. Mutational analysis of the extracellular Ca(2+)-sensing receptor gene in human parathyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. Novembre de 1995;80(11):3107-10.
268. Cetani F, Pinchera A, Pardi E, Cianferotti L, Vignali E, Picone A, et al. No evidence for mutations in the calcium-sensing receptor gene in sporadic parathyroid adenomas. *J Bone Miner Res*. Juny de 1999;14(6):878-82.
269. Ho C, Conner D, Pollak M, Ladd D, Kifor O, Warren H, et al. A mouse model of human familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. *Nat Genet*. Desembre de 1995;11(4):389–94.
270. Corbetta S, Lania A, Filopanti M, Vicentini L, Ballaré E, Spada A. Mitogen-activated protein kinase cascade in human normal and tumoral parathyroid cells. *J Clin Endocrinol Metab*. Maig de 2002;87(5):2201-5.
271. Szabo E, Carling T, Hessman O, Rastad J. Loss of heterozygosity in parathyroid glands of familial hypercalcemia with hypercalciuria and point mutation in calcium receptor. *J Clin Endocrinol Metab*. Agost de 2002;87(8):3961-5.
272. Giusti F, Cavalli L, Cavalli T, Brandi ML. Hereditary hyperparathyroidism syndromes. *J Clin Densitom*. Gener-març de 2013;16(1):69-74.
273. Inoue K, Fry EA. Haploinsufficient tumor suppressor genes. *Adv Med Biol*. 2017;118:83–122.
274. Costa-Guda J, Soong CP, Parekh VI, Agarwal SK, Arnold A. Germline and Somatic Mutations in Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Genes CDKN1A, CDKN2B, and CDKN2C in Sporadic Parathyroid Adenomas. *Horm Cancer*. Octubre de 2013;4(5):301–7.
275. Costa-Guda J, Arnold A. Genetic and epigenetic changes in sporadic endocrine tumors: Parathyroid tumors. *Mol Cell Endocrinol*. 5 d'abril de 2014;386(1-2):46-54.
276. El Naofal M, Kim A, Yon HY, Baity M, Ming Z, Bui-Griffith J, et al. Role of CDKN2C fluorescence in situ hybridization in the management of medullary thyroid carcinoma. *Ann Clin Lab Sci*. 2017;47(5):523–8.
277. Georgitsi M. MEN-4 and other multiple endocrine neoplasias due to cyclin-dependent kinase inhibitors (p27Kip1 and p18INK4C) mutations. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. Juny de 2010;24(3):425-37.
278. Heptinstall AB, Adiyasa I, Cano C, Hardcastle IR. Recent advances in CDK inhibitors for cancer therapy. *Future Med Chem*. Juny de 2018;10(11):1369-1388.

10. ANNEXOS

10.1 Annex 1: finançament

Aquest projecte de recerca no ha rebut cap finançament específic. Es va presentar a dues convocatòries públiques sense obtenir-ne. Les determinacions analítiques no assistencials i les despeses de publicació en *Open Access* van ser finançades amb romanents d'honoraris d'assaigs clínics i altres projectes de recerca dels mateixos investigadors, gestionades per l'Institut d'Investigació i Innovació Parc Taulí (I3PT). La publicació en *Open Acces* a la revista *Journal of Endocrinological Investigation* es va beneficiar d'una exempció de despeses mercès a un acord preestablert entre *Springer Nature* i la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). Ni els pacients participants ni els investigadors han rebut cap remuneració específica per la seva participació.

10.2 Annex 2: material suplementari del primer article

Les referències enumerades a la primera columna de l'annex corresponen a la bibliografia del primer article. Llegendra del material suplementari: *PHPT*: primary hyperparathyroidism; *P*: pathogenic; *LP*: likely pathogenic; *VUS*: variant of uncertain significance; *GH*: growth hormone; *ACTH*: adrenocorticotropin hormone; *NET*: neuroendocrine tumors; *MEN1*: multiple endocrine neoplasia type 1; *PA*: pituitary adenoma; *CD*: Cushing disease; *MS*: multiple sclerosis; *AA*: adrenal adenoma; *BCT*: bronchial carcinoid tumor; *PTC*: Papillary thyroid carcinoma; *ZES*: Zollinger-Ellison syndrome; *GEPT*: gastro-entero-pancreatic tumors; *TCT*: thymic carcinoid tumor.

Reference	Gene	Genotype	Type of mutation	ACMG	Reported phenotype of the proband
16	<i>CDKN1B</i>	ATG-7G>C	Mutation in 5'UTR	P	PHPT (Parathyroid adenoma)
ClinVar	<i>CDKN1B</i>	c.13C>T (p.Arg5Ter)	Nonsense	P	Multiple endocrine neoplasia type 4
ClinVar	<i>CDKN1B</i>	c.15_16dup (p.Val6fs)	Frameshift	P	Multiple endocrine neoplasia type 4
ClinVar	<i>CDKN1B</i>	c.21dup (p.Asn8Ter)	Nonsense	P	Multiple endocrine neoplasia type 4
36	<i>CDKN1B</i>	c.25G>A (p.Gly9Arg)	Missense	VUS	PHPT (Parathyroid adenoma)
38, 39, 40, 41	<i>CDKN1B</i>	c.-29_- 26delAGAG	Deletion in 5'UTR	P	PHPT; GH-secreting PA; Gastric carcinoid tumor, PHPT; PA
ClinVar	<i>CDKN1B</i>	c.49_52del (p.Asp17fs)	Frameshift	P	Multiple endocrine neoplasia type 4
ClinVar	<i>CDKN1B</i>	c.58C>T (p.Gln20Ter)	Nonsense	P	Multiple endocrine neoplasia type 4
49	<i>CDKN1B</i>	c.59_77dup19 (p.Lys25fs)	Frameshift	P	Neuroendocrine cervical carcinoma, CD; PHPT, MS
ClinVar	<i>CDKN1B</i>	c.80_81del (p.Ser27fs)	Frameshift	P	Multiple endocrine neoplasia type 4
ClinVar	<i>CDKN1B</i>	c.86dup (p.Cys29fs)	Frameshift	P	Multiple endocrine neoplasia type 4
ClinVar	<i>CDKN1B</i>	c.102_105del (p.Pro35fs)	Frameshift	P	Multiple endocrine neoplasia type 4
47	<i>CDKN1B</i>	c.121_122 delTT (p.Leu41Asnfs*83)	Frameshift	P	PHPT (Parathyroid adenoma), Cushing disease
56	<i>CDKN1B</i>	c.151_152delGA (p.Asp51Hisfs*73)	Frameshift	P	Paraganglioma
44	<i>CDKN1B</i>	c.160G >C (p.Glu54Gln)	Missense	VUS	GH-secreting pituitary adenoma
50	<i>CDKN1B</i>	c.163G>A (p.Ala55Thr)	Missense	P	Zollinger-Ellison syndrome, PHPT
ClinVar	<i>CDKN1B</i>	c.174del (p.Lys59fs)	Frameshift	P	Multiple endocrine neoplasia type 4
ClinVar	<i>CDKN1B</i>	c.178dup (p.Trp60fs)	Frameshift	P	Hereditary cancer-predisposing syndrome
54	<i>CDKN1B</i>	c.179G>A (p.Trp60Ter)	Nonsense	LP	PHPT (two adenomas), Prolactinoma, NET, AA
ClinVar	<i>CDKN1B</i>	c.185dup (p.Asp63fs)	Frameshift	P	Multiple endocrine neoplasia type 4
ClinVar	<i>CDKN1B</i>	c.186del (p.Phe62fs)	Frameshift	P	Multiple endocrine neoplasia type 4
55	<i>CDKN1B</i>	c.195G>T (p.Gln65His)	Missense	P	Colorectal cancer
46, 51	<i>CDKN1B</i>	c.206C>T (p.Pro69Leu)	Missense	VUS	BCT, PHPT (parathyroid adenoma), PA, PTC, PHPT, AA
ClinVar	<i>CDKN1B</i>	c.209del (p.Leu70fs)	Frameshift	P	Multiple endocrine neoplasia type 4
ClinVar	<i>CDKN1B</i>	c.215del (p.Gly72fs)	Frameshift	P	Multiple endocrine neoplasia type 4
ClinVar	<i>CDKN1B</i>	c.215dup (p.Lys73fs)	Frameshift	LP	not described
ClinVar	<i>CDKN1B</i>	c.217A>T (p.Lys73Ter)	Nonsense	P	Multiple endocrine neoplasia type 4
ClinVar	<i>CDKN1B</i>	c.226_227insA (p.Trp76Ter)	Nonsense	P	Multiple endocrine neoplasia type 4
12	<i>CDKN1B</i>	c.227G>A (p.Trp76*)	Nonsense	P	Acromegaly, PHPT
ClinVar	<i>CDKN1B</i>	c.229_238dup (p.Glu80fs)	Frameshift	P	Multiple endocrine neoplasia type 4

ClinVar	<i>CDKN1B</i>	c.251T>A (p.Leu84Ter)	Nonsense	P	Multiple endocrine neoplasia type 4
57	<i>CDKN1B</i>	c.255dupC (p.Lys96Glnfs*29)	Frameshift	P	Medulloblastoma
ClinVar	<i>CDKN1B</i>	c.267_268del (p.Tyr89_Arg90delinsTer)	Nonsense	P	Multiple endocrine neoplasia type 4
ClinVar	<i>CDKN1B</i>	c.267C>G (p.Tyr89Ter)	Nonsense	P	Multiple endocrine neoplasia type 4
ClinVar	<i>CDKN1B</i>	c.269dup (p.Pro91fs)	Frameshift	P	Multiple endocrine neoplasia type 4
44	<i>CDKN1B</i>	c.272C>T (p.Pro91Leu)	Missense	VUS	Prolactinoma
ClinVar	<i>CDKN1B</i>	c.276del (p.Arg93fs)	Frameshift	P	Multiple endocrine neoplasia type 4
ClinVar	<i>CDKN1B</i>	c.281_282insT (p.Lys96fs)	Frameshift	P	Multiple endocrine neoplasia type 4
16	<i>CDKN1B</i>	c.283C>T (p.Pro95Ser)	Missense	VUS	PHPT (2 parathyroid tumors), ZES, GEPT
48	<i>CDKN1B</i>	c.285dupC (p.Lys96Glnfs*29)	Duplication	P	PHPT (Parathyroid adenoma), Prostate cancer
43	<i>CDKN1B</i>	c.286A>C (p.Lys96Gln)	Missense	VUS	Prolactin-secreting adenoma, Breast cancer
ClinVar	<i>CDKN1B</i>	c.310C>T (p.Gln104Ter)	Nonsense	P	Hereditary cancer-predisposing syndrome
41	<i>CDKN1B</i>	c.320delA (p.Gln107Argfs*12)	Frameshift	LP	ACTH-secreting pituitary microadenoma
41, 43, 44, 45, 29	<i>CDKN1B</i>	c.356T>C (p.Ile119Thr)	Missense	P	PA; GH-secreting adenoma; PA; NET; Myeloproliferative syndrome.
52, 53, 54	<i>CDKN1B</i>	c.374_375delCT (p.Ser125*)	Frameshift	P	PHPT (adenomas); gastrinoma; PHPT (adenomas); GEPT; TCT
41	<i>CDKN1B</i>	c.376G>C (p.Glu126Gln)	Missense	VUS	ACTH-secreting pituitary microadenoma
42	<i>CDKN1B</i>	c.378G>C (p.Glu126Asp)	Missense	VUS	Nephrocalcinosis, PHPT (Parathyroid adenoma)
ClinVar	<i>CDKN1B</i>	c.385dup (p.His129fs)	Frameshift	P	Multiple endocrine neoplasia type 4
ClinVar	<i>CDKN1B</i>	c.388_392del (p.Leu130fs)	Frameshift	P	Multiple endocrine neoplasia type 4
ClinVar	<i>CDKN1B</i>	c.410del (p.Pro137fs)	Frameshift	P	Multiple endocrine neoplasia type 4
ClinVar	<i>CDKN1B</i>	c.421C>T (p.Gln141Ter)	Nonsense	P	Multiple endocrine neoplasia type 4
20	<i>CDKN1B</i>	c.-456_-453delCCTT	Deletion in 5'UTR	LP	Acromegaly
ClinVar	<i>CDKN1B</i>	c.460C>T (p.Arg154Ter)	Nonsense	P	Multiple endocrine neoplasia type 4
54	<i>CDKN1B</i>	c.475G>A (p.Asp159Asn)	Missense	LP	PHPT (Parathyroid adenoma)
ClinVar	<i>CDKN1B</i>	c.476_482del	splice acceptor	LP	Multiple endocrine neoplasia type 4
45	<i>CDKN1B</i>	c.482C>G (p.Ser161Cys)	Missense	VUS	Ovarian dermoid cyst, NET
30	<i>CDKN1B</i>	c.514G>A (p.Glu172Lys)	Missense	P	Acute lymphoblastic leukaemia
16	<i>CDKN1B</i>	c.595T>C (p.Ter199Gln)	Nonsense	P	PHPT
16	<i>CDKN2B</i>	c.191T>G (p.Leu64Arg)	Missense	LP	MEN1 like
16	<i>CDKN1A</i>	c.200G>T (p.R67L)	Missense	P	MEN1 like
16	<i>CDKN2C</i>	c.91G>C (p.Val31Leu)	Missense	P	MEN1 like (HPP + mama)

ClinVar

CDKN2C c.230C>A

Missense

LP

Multiple myeloma

