



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Búsqueda de genes implicados en el cáncer de tiroides no medular familiar (FNMTC) no sindrómico

Aida Orois Añón

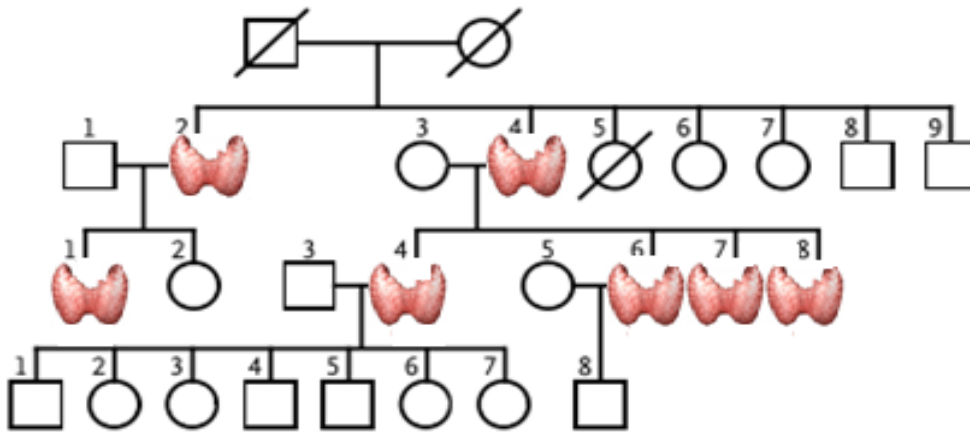
ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

TESIS DOCTORAL

Búsqueda de genes implicados en el cáncer de tiroides no medular familiar (FNMTC) no sindrómico.



Aida Orois Añón

Directora y tutora: Mireia Mora Porta

Programa de Doctorat de Medicina i recerca translacional

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut

Universitat de Barcelona

Año 2020

Título del proyecto: Búsqueda de genes implicados en el cáncer de tiroides no medular familiar (FNMTTC) no sindrómico.

Doctoranda: Aida Orois Añón

Directora y tutora: Dra. Mireia Mora Porta. **Filiación:** Especialista Sénior. Servicio de Endocrinología y Nutrición. Institut de Malalties Digestives i Metabòliques (IMDiM). Hospital Clínic de Barcelona. Profesora asociada de la Universidad de Barcelona.

Colaboradores: Dr. Josep Oriola Ambròs y Dra. Irene Halperin Rabinovich. Servicio de Bioquímica y Genética Molecular y Servicio de Endocrinología y Nutrición, respectivamente. Hospital Clínic de Barcelona.

Línea de investigación del grupo: Fetge, sistema digestiu i metabolisme.

Programa de Doctorat de Medicina i recerca translacional

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut

Universitat de Barcelona

Año 2020

AGRADECIMIENTOS:

A Josep Oriola, mi “pseudo-director”, por su calidad y calidez como persona. Gracias por dejarme en herencia tanto conocimientos científicos como de la vida diaria en Berga y alrededores, e infinitas gracias por tu admirable capacidad docente.

A Mireia Mora, es un orgullo ser tu primera doctoranda. Gracias por ser tan cercana y franca, y hacer que los días duraran más de 24 horas con tal de echar una mano.

A Irene Halperin, el manual del residente (y del adjunto) de endocrinología más accesible y paciente que he conocido.

A los pacientes y sus familias, que han colaborado en este proyecto por el bien común, al margen del individualismo; así como a sus médicos referentes. Y a las fuentes de financiación que han permitido llevar a cabo este trabajo con ilusión.

A Josep Vidal e Ignacio Conget. Ambos fueron mentores y guías en mi camino en la especialidad, y me ayudaron a entender que “existe vida inteligente más allá de las puertas del Hospital Clínic”.

A las técnicas de laboratorio, especialmente a las “carameletas” Estefi y Ana que supieron ayudarme con paciencia cuando era “R1” de genética.

A todos mis compañeros. Una de las connotaciones más positivas del pluriempleo ha sido la inmensidad de gente magnífica que he conocido durante el trayecto: Gracias a mis colegas del H.Mútua de Terrassa, de CPEN, del Servicio de Urgencias, del Hospital de Cisanello (Pisa), del National Institutes of Health (Bethesda)... y por supuesto y de manera destacada, a todo el Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Clínic. Todos y cada uno de vosotros me habéis hecho madurar como especialista pero también como persona.

En la parte más personal, quiero dar las gracias a Agustín. Porque te has implicado al máximo y te preocupabas no sólo por el bienestar de mis propias celulitas, sino también por el de “mis celulitas” del laboratorio. Y sobre todo, porque siempre me has animado a prosperar profesionalmente incluso aunque supusiera la distancia entre nosotros. Te correspondo en ese amor altruista.

A mis padres, o mejor dicho mis flotadores. Porque independientemente de si eres un mar de lágrimas o sonrisas ellos siempre te sacan a flote cual DobleTín. Gracias por vuestros consejos, que tantas alegrías me han dado en la vida. Os quiero.

A mi hermano y Elena, por hacerme cambiar de tema cuando quería hablar de la tesis.

A los que desde el cielo siguen inspirando, como la abuela Concha.

A Antía, amiga y compañera de fatigas. Acompañada de gente que se encuentra en la misma tesitura la lucha es más fácil. Lo mismo le agradezco a mis amigas intercontinentales: Paola, Maida y Belén. Y a mis R pequeñas y grandes, en especial a Carmen y Vero por su ayuda y pragmatismo.

A Rosario y Prado, que han sido como segundas mamis.

A mis compadres, M. João y Ricardo, *obrigada pela sua amizade*. Los amigos de verdad son difíciles de encontrar pero imposibles de perder.

Por último, a mi constancia y testarudez.

FUENTES DE FINANCIACIÓN

Nuestro agradecimiento a las siguientes fuentes de financiación, que han permitido a la doctoranda llevar a cabo este proyecto de tesis doctoral:

- Beca la Sociedad Catalana de Endocrinología y Nutrición (SCEN) 2015/2016, otorgada al Dr. Josep Oriola.

- Premi Fi de Residència del Hospital Clínic de Barcelona 2016/2017, otorgado a la doctoranda.

- Beca Morreale-Escobar 2017/2018 para estancia en el extranjero de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición (SEEN), otorgada a la doctoranda.

- Beca de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición (SEEN) para investigación en patología tiroidea 2018, otorgada a la Dra. Mireia Mora.

Colaboración del “Intramural Research Program of the Center for Cancer Research”, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD (USA). Persona referente: Dr. Electron Kebebew.

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
ENUMERACIÓN DE LOS ARTÍCULOS	4
PREFACIO	6
INTRODUCCIÓN	9
1. Carcinoma no medular de tiroides familiar sindrómico.	11
1.1. Síndrome de Gardner [MIM: 175100]	13
1.2. Síndrome de Cowden [MIM: 158350]	13
1.3. Complejo de Carney [MIM: 160980]	13
1.4. Síndrome de DICER1 [MIM: 606241]	14
1.5. Progeria o Síndrome de Werner [MIM: 277700]	14
2. Carcinoma no medular de tiroides familiar, no sindrómico.	14
2.1. Características clínicas	15
2.2. Bases genéticas	18
2.2.1. Estrategias de búsqueda empleadas	20
2.2.2. Genes candidatos descritos	22
JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO	28
DESARROLLO DE LOS OBJETIVOS	31
1. OBJETIVO 1. Reclutamiento de familias con FNMTC y creación de una base de datos clínicos y de muestras biológicas. Descripción de las características clínicas de dichas familias	32
1.1. Justificación del objetivo	32
1.2. Material y métodos	32
1.3. Resultados	35
2. OBJETIVO 2.- Investigación de mutaciones en el exoma mediante NGS, en familias con al menos 3 miembros afectados de FNMTC no sindrómico, a fin de identificar genes candidatos a ser causantes de la predisposición al FNMTC no sindrómico.	44
2.1. Estudio de genes previamente descritos	44
2.1.1. Justificación del objetivo	44

2.1.2. Material y métodos	44
2.1.3. Resultados	46
2.2. Búsqueda de nuevos genes candidatos y validación en el resto de familias reclutadas.	47
2.2.1. Justificación del objetivo.....	47
2.2.2. Material y métodos	47
2.2.3. Resultados	49
3. OBJETIVO 3. Comprobación mediante estudios de funcionalidad del papel patológico de los cambios genéticos hallados.	50
3.1. Justificación del objetivo.....	51
3.2. Material y métodos	51
3.3. Resultados	52
Comunicaciones surgidas de estos objetivos	53
Publicaciones surgidas de estos objetivos.....	54
ORIGINAL 1	55
ORIGINAL 2	71
DISCUSIÓN	78
1. Selección de familias con FNMTC.....	79
2. Características clínicas de las familias con FNMTC.....	80
3. Genes de susceptibilidad al FNMTC.....	81
4. Dificultades y limitaciones del estudio	90
CONCLUSIONES.....	93
BIBLIOGRAFÍA	96
ANEXO 1	108

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ATA American Thyroid Association, o Asociación Americana de Tiroides

BCPAP Papillary thyroid cancer cell line with a BRAF V600E and TP53 D259Y mutations, o línea celular de cáncer de tiroides papilar con las mutaciones V600E en *BRAF* y D259Y en p53

BMN Bocio multinodular

CDT Carcinoma diferenciado de tiroides

CFT Carcinoma folicular de tiroides

CMT Carcinoma medular de tiroides

CPT Carcinoma papilar de tiroides

ExAC Exome Aggregation Consortium, o consorcio por la armonización de la secuenciación del exoma

FNMTc Familial non-medullary thyroid cancer, o Carcinoma de tiroides familiar no medular.

FTC133 Follicular thyroid cancer cell line, o línea celular de cáncer de tiroides folicular

GWAS Genome-wide association study, o Estudios de Asociación de Genoma Completo

HAD Herencia Autosómica Dominante

HAR Herencia Autosómica Recesiva

MAF Minor Allele Frequency, o frecuencia alélica

miR MicroRNA

NGS Next Generation Sequencing, o secuenciación de última generación

PAAF Punción aspiración con aguja fina

SEEN Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición

siRNA RNA interferente

SNP Polimorfismo de un solo nucleótido

TPC1 Papillary thyroid cancer cell line, o línea celular de cáncer de tiroides papilar

WES Whole exome sequencing, o secuenciación masiva del exoma

ENUMERACIÓN DE LOS ARTÍCULOS

ENUMERACIÓN DE LOS ARTÍCULOS QUE COMPONEN LA TESIS

Tesis en formato de compendio de artículos. La tesis consta de 3 objetivos y 2 artículos originales (incluidos en la sección de resultados); junto con una revisión (anexo 1).

■ Original 1:

Orois A, Gara S, Mora M, Halperin I, Martínez S, Alfayate R, Kebebew E, Oriola J. NOP53 as A Candidate Modifier Locus for Familial Non-Medullary Thyroid Cancer. *Genes (Basel)*. 2019;10:1–15.

Factor de impacto: 3.331, Q1

Genetics

■ Original 2:

Orois A, Badenas C, Reverter JL, López V, Potrony M, Mora M, Halperin I, Oriola J. Lack of Mutations in *POT1* Gene in Selected Families with Familial Non-Medullary Thyroid Cancer. *Horm Cancer*. 2020;11(2):111-6.

Factor de impacto: 2.239, Q2

Endocrinology, diabetes and metabolism

■ Anexo 1:

Orois A, Mora M, Halperin I, Oriola J. Carcinoma diferenciado de tiroides familiar: más allá de las formas sindrómicas. *Endocrinol Diabetes Nutr*. 2020;12 (20)30216-0.

Factor de impacto: 1.18, Q3

Endocrinology, diabetes and metabolism

PREFACIO

PREFACIO

La tiroides es una glándula situada en la cara anterior del cuello, que se encarga de la síntesis de hormonas tiroideas, implicadas en múltiples funciones en el organismo, a destacar el mantenimiento de la homeostasis termogénica y metabólica (1).

La glándula tiroides está organizada en unidades funcionales llamadas folículos, formados por células foliculares alrededor de una sustancia coloidal secretada que contiene grandes cantidades de tiroglobulina, el precursor proteínico de las hormonas tiroideas (**figura 1**). La función de las células foliculares es la síntesis de las hormonas tiroideas, junto con su secreción al torrente sanguíneo. El otro tipo celular presente en la glándula son las células C o parafoliculares, unas células de estirpe neuroendocrina cuyo cometido es la síntesis de calcitonina (1).

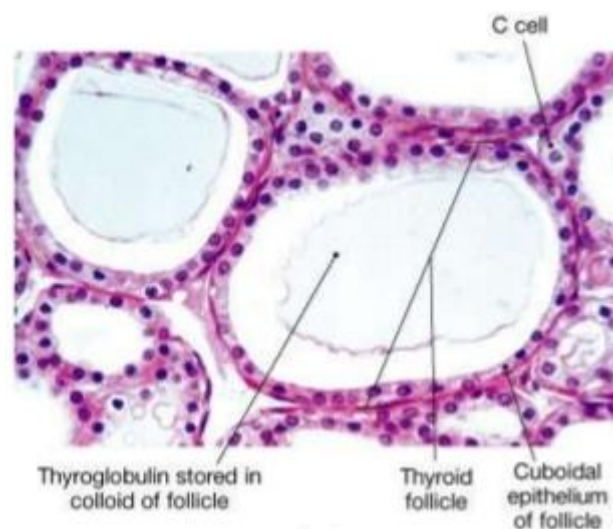


Figura 1. Adaptado de Atlas de histología (2).

Al igual que en el resto de tejidos, la proliferación anormal de las células tiroideas puede originar neoplasias, siendo el cáncer de tiroides la neoplasia endocrinológica más común. Existen dos tipos fundamentales de cáncer de tiroides atendiendo a su origen celular: los carcinomas medulares de tiroides (CMT), que provienen de las células C, y constituyen el 5% de los cánceres de tiroides; y los carcinomas no medulares, que provienen de las células foliculares y representan el 95% de los cánceres de tiroides. El comportamiento clínico de los carcinomas no medulares es muy heterogéneo, y de hecho se subdividen en varios grupos: el 95% son carcinomas

bien diferenciados (mayoritariamente papilares y foliculares), mientras que los carcinomas pobremente diferenciados y anaplásicos, con alto grado de malignidad, representan aproximadamente el 5% restante (1).

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El cáncer de tiroides es la neoplasia endocrina más común, representando actualmente el quinto cáncer más frecuente en mujeres en EEUU (3). El 95% de las neoplasias de tiroides son carcinomas de tiroides derivados de las células foliculares: los carcinomas papilares (CPT; aproximadamente el 80% de los casos), los carcinomas foliculares (CFT; 15%), que junto con los anteriores constituyen los llamados carcinomas diferenciados de tiroides (CDT), y otros tipos de cáncer menos frecuentes (<5%; pobremente diferenciados y anaplásicos). El 5% de neoplasias de tiroides restantes derivan de las células C o parafoliculares, productoras de calcitonina, ocasionando los carcinomas medulares de tiroides (CMT).

Existen familias en las que concurren varios pacientes afectados de cáncer de tiroides. En el registro sueco de cáncer (4) se constató que la descendencia de los pacientes con cáncer de tiroides tenía el triple de riesgo de padecer una neoplasia tiroidea en comparación con la población general. El abordaje asistencial integral de estas familias, que posiblemente incluye asesoramiento genético, requiere conocer las bases genéticas de la enfermedad. En el caso del CMT familiar (hasta un 25% de los CMT), se sabe que el protooncogen *RET* es el principal protagonista implicado (5). La presencia de mutaciones germinales en *RET* se asocia con el CMT hereditario o la neoplasia endocrina múltiple tipo 2, con un patrón de herencia autosómica dominante (HAD). En los últimos años, se ha avanzado mucho en el conocimiento genético de esta patología, e incluso se ha podido establecer una estrecha correlación genotipo-fenotipo (6). Sin embargo, en la presente tesis doctoral nos centraremos en el carcinoma familiar no medular, con una base hereditaria mucho menos conocida.

El carcinoma diferenciado (o no medular) de tiroides familiar, también conocido como FNMTTC por su siglas en inglés (Familial non-medullary thyroid cancer), se define por la presencia de esta neoplasia en 2 o más familiares de primer grado, siempre y cuando no haya otros factores predisponentes como radiación o deficiencia de yodo (7).

La prevalencia de FNMTTC no es desdeñable: Se estima que hasta el 9% de los carcinomas no medulares de tiroides son hereditarios (7). Por tanto, es lo suficientemente frecuente como para que identifiquemos algunos casos en nuestro

ámbito clínico; y al mismo tiempo es tan infrecuente como para que debamos aunar esfuerzos multicéntricos con el fin de reunir una casuística que permita avanzar en su investigación.

Ante la sospecha de FNMTC, debemos distinguir entre las formas sindrómicas, en las que el FNMTC forma parte de un espectro fenotípico más amplio asociado a un síndrome, y las no sindrómicas, donde el FNMTC se presenta de manera aislada. En el 95% de los casos estaremos ante un FNMTC no sindrómico. No obstante, alrededor del 5% de los casos de FNMTC aparece en el seno de un síndrome genético bien caracterizado. Como endocrinólogos debemos conocerlos por sus posibles repercusiones sistémicas, que exigen un abordaje multidisciplinar.

1. Carcinoma no medular de tiroides familiar sindrómico.

Hoy en día se reconocen los siguientes cinco síndromes que cursan con FNMTC y cuyos genes involucrados ya han sido descritos (**tabla 1**). En otros síndromes como McCune-Albright, Peutz-Jeghers o el de ataxia-telangectasia se ha sugerido asimismo una predisposición al cáncer diferenciado de tiroides no medular, pero ésta no se encuentra claramente establecida.

Tabla 1 Síndromes hereditarios asociados con FNTMC

Síndrome	Gen causante (locus)	Herencia	Manifestaciones tiroideas	Frecuencia del cáncer de tiroides	Manifestaciones extratiroides fundamentales
Síndrome de Gardner	<i>APC</i> (5q21)	HAD	CPT (variante cribiforme-morular)	≈2-12%	Poliposis/neoplasia colónica, osteomas, quistes epidermoides
Síndrome de Cowden	<i>PTEN</i> (10q22)	HAD	BMN, CDT (sobre todo CFT)	≈ 14% (hasta el 66% con patología benigna)	Cáncer de endometrio y mama
Complejo de Carney	<i>PRKAR1A</i> (17q22-24)	HAD	Adenomas foliculares y CDT	≈ 5% (hasta el 15% con patología benigna)	Hiperpigmentación cutánea, mixomas múltiples, otras patologías endocrinas
Síndrome de DICER1	<i>DICER1</i> (14q32)	HAD	CDT en la infancia, también BMN	Muy infrecuente	Blastoma pleuropulmonar, nefroma, tumores ováricos
Progeria o Síndrome de Werner	<i>WRN</i> (8p11-12)	HAR	CDT	≈ 20%	Envejecimiento prematuro, talla baja

Abreviaturas: CDT: carcinomas diferenciados de tiroides; CPT: carcinomas papilares de tiroides; CFT: carcinomas foliculares de tiroides; BMN: bocio multinodular; HAD: herencia autosómica dominante; HAR: herencia autosómica recesiva. Adaptado de “Practical Management of Thyroid Cancer” (8).

1.1. Síndrome de Gardner [MIM: 175100].

El Síndrome de Gardner es un síndrome de HAD causado por mutaciones germinales en el gen supresor tumoral *APC* (cromosoma 5q21). Se trata de una variante de la poliposis adenomatosa familiar, en la que además concurren manifestaciones extracolónicas. Clínicamente cursa con poliposis/neoplasia colónica, osteomas, quistes epidermoides y tumores dermoides, entre otros. Entre un 2-12% de los pacientes pueden desarrollar CDT, habitualmente a edades jóvenes, y como primera manifestación del síndrome hasta en un tercio de los casos. Concretamente se asocia a la variante cribiforme-morular del CPT, por lo que ante cualquier paciente con dicha histología debemos descartar que no se trate de la manifestación inicial de un síndrome de Gardner (8).

1.2. Síndrome de Cowden [MIM: 158350].

Éste es un síndrome de HAD asociado a mutaciones inactivadoras en línea germinal en el gen supresor *PTEN* (cromosoma 10q22). Los pacientes padecen múltiples hamartomas y mayor riesgo de cáncer de endometrio y mama, y hasta dos tercios de los pacientes tienen patología tiroidea, principalmente BMN y CDT (este último en un 3-14% de los casos, y fundamentalmente de estirpe folicular) (8). En pacientes en los que no se hallan mutaciones en *PTEN* (hasta un 15%), deberían considerarse otros genes más infrecuentemente asociados al síndrome de Cowden, tales como *SDHx*, la hipermetilación del promotor de *KLLN* (9); *PIK3CA* y *AKT1* (10); *RASAL1* (11) y *SEC23B* (12).

1.3. Complejo de Carney [MIM: 160980].

Se trata de un síndrome de HAD, debido a mutaciones germinales en el gen supresor *PRKAR1A* (cromosoma 17q22-24), que provoca hiperpigmentación cutánea (a destacar léntigos y nevus azules), mixomas en múltiples localizaciones y patología endocrina hipofisaria, suprarrenal, gonadal, y/o tiroidea. Hasta un 15% de los afectados pueden presentar adenomas y más raramente carcinomas de tiroides. No ha de confundirse

con el término “tríada de Carney” (asociación de tumor del estroma gastrointestinal (GIST), condroma pulmonar y paraganglioma) (8).

1.4. Síndrome de DICER1 [MIM: 606241].

De HAD y de descripción más reciente, se relaciona con mutaciones germinales en *DICER1* (cromosoma 14q32), que codifica una ribonucleasa, predisponiendo a múltiples tumores en la infancia como el blastoma pleuropulmonar, así como al BMN y CDT. Es un gen a tener en cuenta fundamentalmente en las neoplasias tiroideas en edad pediátrica (13).

1.5. Progeria o Síndrome de Werner [MIM: 277700].

Es el único de estos síndromes de HAR, originado por mutaciones en el gen *WRN* (cromosoma 8p11–12), que codifica una helicasa implicada en el mantenimiento de los telómeros. Sus características clínicas incluyen talla baja, múltiples neoplasias (entre ellas la de tiroides, hasta en un 20% de los casos), y lo más distintivo: un envejecimiento prematuro. Es muy infrecuente fuera de Japón (8).

2. Carcinoma no medular de tiroides familiar, no sindrómico.

Recapitulando, la mayoría de los pacientes con cáncer de tiroides que vemos en el ámbito endocrinológico presentan subtipos histológicos no medulares (mayoritariamente CPT o CFT), que en aproximadamente el 9% de los casos son hereditarios o familiares. Excluyendo los pocos casos que aparecen en el seno de los síndromes previamente comentados, el resto son no sindrómicos, y su genética está aún por dilucidar. Seguidamente, revisaremos de manera general las características clínicas de los FNMTTC no sindrómicos, para posteriormente centrarnos en los genes de susceptibilidad descritos hasta la fecha.

2.1. Características clínicas

Hace más de 10 años que el FNMTC es reconocido como una enfermedad con entidad propia, que representa aproximadamente el 3,2-6,2 % de todos los cánceres de tiroides (7). Sin embargo, y dada la alta prevalencia e incidencia de cáncer de tiroides en la población general (se diagnostican 15,8 nuevos casos/100.000 habitantes/año (14) surge la duda de si en realidad la presencia de 2 o más casos de cáncer no medular de tiroides en una misma familia no podría ser debido al azar. Tras un complejo análisis estadístico, Charkes (15) concluyó que alrededor del 62% de las familias con dos casos pueden tratarse de fenocopias (dos casos esporádicos asociados por azar) y sólo el 38% ser hereditarios. En cambio, si hay 3 miembros afectados, la probabilidad de que sea realmente hereditario es del 96%.

Se ha observado que el FNMTC presenta HAD, con expresividad variable y penetrancia incompleta. La mayoría de los FNMTC son CPT ($\approx 90\%$), seguido de CFT, al igual que en los carcinomas no medulares esporádicos. Pueden coexistir diferentes variantes histológicas dentro de la misma familia. Respecto a alteraciones moleculares a nivel somático, al comparar las muestras de tiroidectomía/punción aspiración con aguja fina (PAAF) de los pacientes con FNMTC con las de los pacientes con CDT sin antecedentes familiares, no se observaron diferencias significativas en cuanto a frecuencia ni tipo de mutaciones somáticas, con presencia de la mutación *BRAF V600E* o mutaciones en *NRAS* o reordenamientos *RET/PTC* en un porcentaje muy similar de casos (16). Este dato sugiere que las causantes de la enfermedad son mutaciones en línea germinal, sin que las mutaciones somáticas jueguen un papel crucial en la tumorigénesis.

Globalmente las características clínicas son similares, con una predominancia femenina en algunos estudios (proporción 2-3/1). Como rasgos diferenciales, el FNMTC suele presentarse con una edad menor al diagnóstico, en torno a los 43 años -versus los 48 años del CDT esporádico- (16). Estudios recientes sugieren que la segunda generación de afectados por el FNMTC podría presentar un “fenómeno de anticipación”, con un diagnóstico a edad más temprana, con mayor proporción de varones afectados que en la primera generación, y una enfermedad más agresiva que en sus antecesores (17,18).

Además, en el FNMTTC se ha descrito una mayor agresividad tumoral según un metaanálisis de 2015 que incluyó 12 estudios con resultados bastante dispares (19). Concretamente, se observó mayor presencia de adenopatías y extensión extratiroidea, mayor tasa de multifocalidad y de recurrencia, y menor supervivencia libre de progresión, especialmente en los estudios que incluyeron familias con al menos 3 miembros afectados; las diferencias en las familias con sólo 2 miembros afectados eran menos claras. En la misma línea, Ya-Bing Zhang et al. (20) y Kalmovich et al. (21) describen mayor agresividad en familias con 3 o más miembros con FNMTTC, sugiriendo que deberían hacerse estudios prospectivos focalizados en estas familias más floridas.

Se ha investigado la utilidad de llevar a cabo un cribado de CDT en personas con familiares que sufren esta enfermedad (22). En este estudio prospectivo de 5 años, el CDT fue detectado por cribado en un 4,6% de los individuos en riesgo de familias de 2 miembros afectados, mientras que en las familias de ≥ 3 miembros afectados el cribado detectó un 22,7% de CDT, concluyéndose que esta búsqueda activa debería ser considerada en estas últimas. Es decir, cuantas más personas afectas, mayor es el riesgo de que más miembros de la familia padezcan la patología, y estaría más indicado plantear una búsqueda activa (23). También documentaron que los FNMTTC detectados por cribado tenían menor tamaño tumoral, menor tasa de adenopatías y un tratamiento quirúrgico y de radioyodo menos agresivo que los casos índice. Pese a todo, en las últimas guías de manejo del CDT de la American Thyroid Association (ATA) (24), no se posicionan a favor o en contra del cribado familiar ya que la reducción de la morbi-mortalidad no está demostrada. En realidad, esta demostración es poco factible en una enfermedad con una supervivencia a los 10 años del 95-97% (24). Triponez et al. (25) compararon la supervivencia de pacientes con FNMTTC con la de sus familiares no afectados y con población general, y observaron una supervivencia más corta en los pacientes cuyas familias eran de 3 ó más miembros afectados. Sin embargo, no compararon con CDT esporádicos. Recientemente, Lee et al. (26) publicaron un estudio de cohortes con seguimiento a 12 años de pacientes con FNMTTC y pacientes con CDT esporádico. Descartaron que la historia familiar fuese un factor de riesgo independiente de recurrencia (sí lo eran el tamaño tumoral, la presencia de adenopatías y la extensión extratiroidea), y adicionalmente concluyeron que la

estratificación dinámica de riesgo, empleada en el seguimiento del CDT esporádico, era igualmente útil en el FNMTC.

En cualquier caso, la mayoría de publicaciones reconocen que la mayor agresividad del FNMTC sigue siendo hoy un tema de debate debido a la heterogeneidad de los estudios, fundamentalmente retrospectivos. Esta controversia se extrapola al seguimiento y tratamiento de dichos tumores. Recientemente, se ha sugerido que el tratamiento quirúrgico inicial del FNMTC debería ser más agresivo, una vez más, en familias con ≥ 3 miembros afectados (27). De hecho, en las últimas guías de manejo del CDT (24) se aboga por la tiroidectomía total y la terapia con radioyodo en pacientes con antecedentes familiares de CDT. Más recientemente, Kim et al. (28) también apuestan por la tiroidectomía total, pues en su estudio retrospectivo de 2894 pacientes con CDT (391 casos familiares), describen mayor presencia de multifocalidad o de nódulos benignos contralaterales en los pacientes con FNMTC, comparado con casos esporádicos. Además, algún estudio sugiere que dado que estos pacientes podrían tener más adenopatías, habría que considerar la realización de linfadenectomía central junto a la tiroidectomía total (29). Lo que no estaría indicado es la tiroidectomía total profiláctica, pues aún no hemos identificado las causas genéticas de la enfermedad que permita detectar a los portadores, y además no existe una penetrancia completa. En cuanto a la PAAF, actualmente se recomienda en lesiones nodulares por encima de 1cm (24) (en las anteriores guías de la ATA de 2009 se recomendaba también en nódulos subcentimétricos) (30). Se ha descrito que la PAAF en los pacientes con FNMTC podría tener más falsos negativos dado que estos pacientes suelen tener una alta incidencia de enfermedad maligna multifocal, coexistente con nódulos benignos (31).

En resumen, parece razonable considerar la presencia de un componente familiar como un factor de riesgo más a tener en cuenta en el manejo personalizado del cáncer de tiroides (32), especialmente en familias con al menos 3 miembros afectados, dada la alta probabilidad de que sea genético -y no por asociación casual-, así como por los estudios que en este subgrupo han demostrado mayor agresividad tumoral y mayor beneficio de un cribado precoz.

2.2. Bases genéticas

Si bien el FNMTTC es una enfermedad relativamente poco prevalente, representa un esfuerzo de recursos significativo para el sistema nacional de salud, principalmente por el actual desconocimiento de sus determinantes hereditarios, y de sus posibles diferencias clínicas respecto a la enfermedad esporádica. Estas circunstancias dificultan su diagnóstico precoz (en estadios en los que el tratamiento es más resolutivo), y hace inviable el consejo genético, que, además del impacto sanitario, es una demanda creciente de la sociedad actual. Conocer la mutación germinal implicada en cáncer de tiroides en una familia tendría como consecuencia directa permitir el estudio familiar, identificar a las personas portadoras de la mutación, concentrar en estas personas los esfuerzos diagnósticos y terapéuticos, y poder incidir precozmente en el curso de estas neoplasias. Asimismo, se evitaría tener que estudiar a todos los familiares no portadores de la mutación. Por otra parte, la historia científica reciente nos señala que la identificación de genes causales de neoplasias genéticas ha permitido un enorme avance en el conocimiento de la oncogénesis en los casos esporádicos (mucho más prevalentes), en la identificación de componentes y vías de señalización celulares implicadas, y en el diseño de moléculas capaces de modular estas vías y ejercer acciones terapéuticas específicas.

Por todo, el conocimiento de las bases genéticas de una patología como el FNMTTC resulta relevante, por las implicaciones directas que puede tener en la práctica asistencial. Se han empleado distintas estrategias de búsqueda de los genes implicados en esta patología, que detallamos a continuación. En la **tabla 2** se resumen los principales genes candidatos identificados en la actualidad, y que describiremos a lo largo de las próximas páginas.

Tabla 2 Genes/familias de genes descritos en el FNMTC no sindrómico

Gen/es ^a	Locus	Conclusiones de los estudios más destacados
Reparadores de DNA: <i>ATM, CHEK2, XRCC1, XRCC3</i>	11q22.3, 22q12, 19q13.31, 14q32 respectivamente	rs17879961 en <i>CHEK2</i> (40), y el rs373759 en <i>ATM</i> (41) podrían conferir susceptibilidad a FNMTC
<i>TITF-1</i>	14q13	Parece más relacionado con el BMN que con CDT (45, 46)
<i>FOXE1</i>	9q22.33	Hasta 23 SNPs que conferirían riesgo (47) → Gen de susceptibilidad a FNMTC de baja penetrancia
<i>SRGAP1</i>	12q14	4 mutaciones missense que conferirían riesgo en 4 familias (49) → Gen de susceptibilidad a FNMTC de baja penetrancia en algunas familias
<i>HABP2</i>	10q25.3	Variante G534E en una familia de 7 afectados (51) → Posible gen de susceptibilidad, no demostrado en otras poblaciones
<i>SRRM2</i>	16p13.3	Controvertido (55)
Genes del complejo telómero–telomerasa	Varios	Poca consistencia entre estudios (59,61)
<i>RTFC (C14orf93)</i>	14q11.2	Variante V205M en una familia de 5 afectados (64) → Posible gen de susceptibilidad, no validado en otros estudios
<i>MAP2K5</i>	15q23	Variantes A321T y M367T presentes en 2 familias (65) → resultados no replicados (66)
<i>DUOX2</i>	15q21.1	Variante Y1203H en una familia de 6 afectados (67) → Posible gen de susceptibilidad, no validado en otros estudios

^a Existen otros loci que se han asociado a FNMTC en los que aún no se han identificado los genes responsables, así como algunos microRNA que podrían estar relacionados con la aparición de FNMTC.

Abreviaturas: FNMTC: familiar non-medullary thyroid cancer; BMN: bocio multinodular; CDT: carcinomas diferenciados de tiroides; SNPs: Polimorfismos de un solo nucleótido.

2.2.1. Estrategias de búsqueda empleadas

Se han desarrollado diversas estrategias para la búsqueda de genes candidatos responsables del FNMTC. Previamente a la aparición de las técnicas de secuenciación modernas, se habían llevado a cabo:

a) Estudios de ligamiento (*linkage*). En genética se denomina ligamiento a la asociación física entre dos loci (esto es, su cercanía en una misma hebra de ADN, lo que repercute en una baja frecuencia de recombinación entre ellos durante la meiosis, y, por tanto, a una mayor probabilidad de herencia conjunta). En individuos con parentesco se mapean loci genéticos para encontrar alelos que se hereden ligados a la enfermedad de interés y determinar de manera indirecta la localización cromosómica del gen asociado a FNMTC. Es decir, este tipo de estudios son un método indirecto que usa marcadores genéticos (por ejemplo, microsatélites) ligados al gen de la enfermedad.

Los loci descritos hasta la fecha incluyen TCO (19q13.2), fPTC/ PRN (1q21), FTEN (8p23.1-p22), NMTC1 (2q21), MNG1 (14q32), 6q22, 8q24 y 4q32 (33,34). Sin embargo, los genes candidatos ubicados en estos loci permanecen desconocidos.

b) Estudios de GWAS (acrónimo inglés de Estudios de Asociación de Genoma Completo). Se estudian miles de polimorfismos comparando controles versus pacientes, a fin de encontrar polimorfismos de predisposición. Mediante esta técnica se han identificado por ejemplo dos polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) asociados a riesgo de FNMTC: rs944289 (localizado en 14q13.3, cerca de *NKX2-1*), y

rs965513 (localizado en 9q22.33, cerca del gen candidato *FOXE1*) (35). Sin embargo, la mayoría de estudios están realizados en CDT no familiar (36).

c) Estudios dirigidos a genes candidatos o vías metabólicas específicas. Por ejemplo, Pereira et al. (37) estudiaron directamente *FOXE1* en 60 familias con FNMTC en Portugal, encontrando una asociación entre variantes en línea germinal de este gen y la aparición de FNMTC en estas familias.

Sin embargo, en todos estos estudios los resultados han sido poco fructíferos, describiendo genes que podrían estar implicados en la etiología del FNMTC con baja penetrancia y únicamente en algunas familias. Además, los resultados no se han replicado en sucesivas investigaciones.

d) Técnicas de secuenciación masiva. En los últimos años se ha producido un gran avance en el campo de la genómica gracias a la mayor factibilidad tanto desde el punto de vista técnico como económico para realizar la secuenciación masiva del genoma. La secuenciación masiva (next generation sequencing (NGS)) ha conllevado un gran salto ya que ha supuesto pasar de examinar genes específicos a explorar genomas completos de grupos humanos o de otras especies. Todo ello, además, de forma mucho más eficiente y rápida que con la secuenciación clásica de Sanger. De este modo se puede comparar, por ejemplo, cómo difiere el genoma de pacientes con una determinada patología frente al genoma de individuos sanos. La ingente cantidad de información obtenida, eso sí, obliga a la aplicación de una serie de filtros arbitrarios para seleccionar las variantes candidatas a estar relacionadas con la patología de estudio. Incluso algunos investigadores han compartido su estrategia de búsqueda y filtros sugeridos para el caso concreto de la NGS en el FNMTC (38). Así pues, la NGS abriría las puertas al estudio de familias con varios miembros con FNMTC, sin necesidad de tener que estudiar miles de polimorfismos o genes candidatos concretos. Desde la incorporación de las nuevas técnicas de secuenciación, se han multiplicado los estudios que tratan de dilucidar las causas genéticas del FNMTC, identificando nuevos genes recogidos en una revisión reciente (39). A continuación,

profundizaremos en el conocimiento de los genes asociados con vulnerabilidad al FNMTC descritos hasta la fecha.

2.2.2. Genes candidatos descritos

Genes implicados en la reparación de DNA.

Correspondería a los genes *ATM* (ATM Serine/Threonine Kinase, locus 11q22.3), *CHEK2* (Checkpoint Kinase 2, locus 22q12), *XRCC1* (X-Ray Repair Cross Complementing 1, locus 19q13.31) y *XRCC3* (X-Ray Repair Cross Complementing 3, locus 14q32).

El hecho de que factores como la radiación ionizante aumenten el riesgo de cáncer de tiroides sugiere que genes reparadores de DNA podrían estar implicados en su fisiopatología. Por ello, se han estudiado genes como *ATM*, *CHEK2*, *XRCC1*, *XRCC3*. En varios estudios se ha descrito que determinados polimorfismos en estos genes podrían asociarse a mayor susceptibilidad a CDT, como el rs17879961 en *CHEK2* (40), y el rs373759 en *ATM* (41). Además, mutaciones en *CHEK2* podrían ser más frecuentes en casos de CDT (42). Por el contrario, Ryu et al. (43) describieron que el cambio Arg194Trp en *XRCC1* confería menor susceptibilidad a CDT en población coreana. Dichas investigaciones se han realizado básicamente comparando pacientes con CDT esporádico versus controles (44), no pudiendo establecerse por el momento una clara relación con el FNMTC.

***TTF-1* (Thyroid Transcription Factor 1, también conocido como *NKX2.1*).**

Ubicado en 14q13, es un factor de transcripción tiroideo. En 2009 se describió la mutación germinal Ala339Val en *TTF-1* en 4 pacientes con historia de BMN y CPT, dos de los cuales tenían antecedentes familiares de BMN con o sin CPT (45). Un año después, Cantara et al. (46) no encontraron en su serie de pacientes con CPT la presencia de esta variante en *TTF-1*. Por ello no se descarta que esta variante esté asociada con el BMN, pero no puede afirmarse que esté relacionada con el CPT y menos aún con el FNMTC.

FOXE1 (Forkhead Box E1).

Ubicado en 9q22.33, codifica un factor de transcripción tiroideo (TTF-2) que participa en la morfogénesis y migración de la glándula tiroidea. Determinados polimorfismos en este gen se han asociado al FNMTC de manera más robusta. Como hemos comentado, en el estudio de GWAS de 2009 de Gudmunson et al. (35) se describieron los polimorfismos rs944289 (localizado en 14q13.3, cerca de *NKX2-1*) y rs965513 (en 9q22.33, cerca de *FOXE1*) como predisponentes al cáncer de tiroides en población europea. Bonora et al. (47) genotiparon estos y otros 21 SNPs identificados por GWAS en 11 genes candidatos en 672 sujetos pertenecientes a 133 familias con FNMTC de 2 o más miembros afectados. Hallaron dos SNPs (rs965513 y rs10759944) en 9q22.33 (cerca de *FOXE1*) que se asociaban de manera estadísticamente consistente con FNMTC; no así el SNP rs944289. Pereira et al. (37) secuenciaron entonces *FOXE1* en 60 familias con FNMTC y en 80 casos esporádicos de CPT, encontrando una nueva variante en línea germinal (Ala248Gly) con segregación en una única familia con FNMTC, y que en los estudios funcionales promovía la tumorigénesis.

Por todo, aunque los resultados no son completamente consistentes, *FOXE1* podría considerarse un gen de susceptibilidad a FNMTC de baja penetrancia.

SRGAP1 (Slit-Robo Rho GTPase-activating protein 1)

SRGAP1 (locus 12q14) codifica una proteína que inactiva a CDC42, una pequeña proteína GTPasa de la familia Rho, implicada en la migración neuronal y la tumorigénesis (48). Mediante estudios de ligamiento, se identificó el locus 12q14 en 21 de 38 familias con FNMTC, por lo que posteriormente se procedió a la secuenciación de todos los exones de *SRGAP1*, ubicado a ese nivel (49). Encontraron 4 mutaciones *missense* en línea germinal (Gln149His, Ala275Thr, Arg617Cys y His875Arg), cada una en una única familia. Los estudios funcionales demostraron que las variantes Gln149His y Arg617Cys condicionaban pérdida de función de la proteína *SRGAP1*, que sería incapaz de inactivar a CDC42. Este trabajo sugiere que *SRGAP1*

podría ser un gen de baja penetrancia asociado a FNMTc. Sin embargo, es necesaria su validación como gen candidato en una cohorte más amplia de familias con FNMTc.

***HABP2* (Hyaluronan-Binding Protein 2)**

HABP2 se localiza en 10q25.3, y codifica una proteasa que se une al ácido hialurónico y participa en la fibrinólisis y la integridad vascular (50).

En 2015, aparece el primer estudio que aplica la secuenciación masiva del exoma para el estudio de las bases genéticas del FNMTc. El grupo de Gara (51) describió un cambio genético constitucional Gly534Glu en el gen *HABP2*, que cosegregaba en una familia con 7 miembros con CPT, como posible causante de la enfermedad. También describieron este cambio en un 4,7% de 423 casos con CDT esporádico, versus en 0,7% de la población control, lo que indicaba una frecuencia 6,71 veces mayor en pacientes con cáncer de tiroides. Asimismo, demostraron sobreexpresión de la proteína *HABP2* en tejido tumoral de los pacientes con FNMTc comparado con los de controles y casos esporádicos; además, en los estudios de funcionalidad la presencia de la variante Gly534Glu condicionaba pérdida de función supresora tumoral. Todo ello indicaba que *HABP2* podría tener una función supresora tumoral, y que el cambio Gly534Glu supondría una predisposición al cáncer de tiroides con penetrancia incompleta. Otro grupo encontró en 4 de 29 familias con FNMTc que también presentaban la misma variante germinal Gly534Glu (52). Sin embargo, el papel de *HABP2* como gen de susceptibilidad a FNMTc es aún controvertido, dado que estos resultados no se han replicado en otros estudios y la frecuencia poblacional del cambio Gly534Glu podría ser muy variable atendiendo a su origen geográfico (53), quedando patente la importancia de seleccionar correctamente los controles a la hora de realizar este tipo de estudios (54).

***SRRM2* (Serine/Arginine Repetitive Matrix 2)**

SRRM2 (locus 16p13.3) codifica una proteína implicada en el splicing. Este gen fue propuesto como candidato en el FNMTc a raíz del estudio de Tomsic en 2015 (55), en

el que se sugiere que variantes en esta proteína podrían afectar al splicing de genes implicados en la tumorigénesis tiroidea. Concretamente, llevaron a cabo NGS de 2 miembros de una familia de 6 afectados de FNMTC, encontrando la variante en heterocigosis c.1037C > T (Ser346Phe, rs149019598) que cosegregaba con el CDT en la familia. Por el contrario, este cambio no fue encontrado cuando analizaron otras 138 familias con CDT (55), por lo que este hallazgo requiere validación ulterior.

Genes del Complejo telómero-telomerasa

Los telómeros son secuencias repetitivas de ADN no codificante que se encuentran en los extremos de los cromosomas. Su función es dar estabilidad cromosómica, y cuando estas secuencias se acortan se produce una inestabilidad que favorece la oncogénesis (56). Existen varios genes implicados en el mantenimiento de los telómeros, tales como *TERT* (Telomerase Reverse Transcriptase), o los genes del complejo shelterina (*POT1*, *RAP1*, *TIN2*, *TPP1*, *TRF1* y *TRF2*)(57).

Sabemos que mutaciones somáticas en el promotor de *TERT* juegan un papel importante en el desarrollo del cáncer de tiroides (58). Por ello, se ha sugerido que los genes implicados en el mantenimiento de los telómeros podrían estar implicados en CDT, y en el FNMTC en particular. De hecho, se ha descrito que los pacientes con FNMTC tienen los telómeros más cortos que sus familiares no afectados, los controles sanos o casos esporádicos (59). Por el contrario, recientemente se ha publicado un estudio en el que describen una mutación frameshift en *TINF2*, también conocido como *TIN2*, que cosegregaba en todos los miembros afectados en una única familia con CDT y melanoma (60), y que se asociaba a mayor longitud de los telómeros (61). No hallaron el cambio en las otras 23 familias analizadas (61). Por otro lado, Jendrzejewski et al. (62) no encontraron diferencia en la longitud de los telómeros entre CDT esporádicos y FNMTC. Tampoco se han observado diferencias en el número de copias ni en la expresión de diversos genes del complejo telómero-telomerasa en seis familias con FNMTC (63). No se han hallado mutaciones en *TERT* u otros genes del complejo shelterina en línea germinal en familias con FNMTC (57). Por tanto, aunque parece que la longitud de los telómeros y los genes del complejo telómero-telomerasa están

implicados de algún modo en el desarrollo del FNMTc, los resultados en la literatura son aún poco consistentes y requieren más investigaciones.

RTFC o C14orf93 (Chromosome 14 Open Reading Frame 93).

En un estudio de 2017 en China (64), combinando análisis de ligamiento y NGS, encontraron la variante Val205Met en *RTFC* (locus 14q11.2) en una única familia con 5 miembros con FNMTc. En los estudios funcionales, esta variante promovía la oncogénesis. Hasta la fecha, no se han realizado otros estudios independientes para validar estos resultados.

MAP2K5 (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 5)

MAP2K5 (también conocido como *MEK5*) se localiza en 15q23 y codifica una proteína de la familia de las MAP kinasa. En un artículo reciente en población china (65), estudiaron a 34 familias de ≥ 3 miembros afectados de FNMTc mediante NGS, y hallaron dos variantes en el gen *MAP2K5* presentes en 2 familias: Ala321Thr y Met367Thr. Estas variantes son muy infrecuentes en población sana. Los resultados de los estudios funcionales también sugirieron que *MAP2K5* podría ser un gen de susceptibilidad al FNMTc. Sin embargo, otro grupo italiano no replicó estos resultados en 33 familias (66), permaneciendo incierta la implicación de *MAP2K5* en esta patología.

DUOX2 (Dual Oxidase 2)

Ubicado en 15q21.1, este gen codifica una glicoproteína que participa en el metabolismo del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), necesario para la actividad de los enzimas tiroideos que participan en la síntesis de hormonas tiroideas. Recientemente, se ha descrito una nueva variante germinal en *DUOX2* (la variante missense Tyr1203His), identificada mediante NGS en una familia de 6 miembros con FNMTc, y que podría asociarse a susceptibilidad a éste (67). La presencia de esta variante aumentaría la fabricación de H_2O_2 , tóxico para el DNA, promoviendo la tumorigénesis.

De manera interesante, la expresión de DUOX2 está aumentada en pacientes homocigotos para el polimorfismo rs965513 en *FOXE1*, con lo que ambos mecanismos podrían estar conectados, sugiriendo los autores que la desregulación de proteínas implicadas en el metabolismo del H₂O₂ podría relacionarse con la susceptibilidad al FNMTc.

MicroRNAs

También se ha hipotetizado que los microRNA, pequeños segmentos de RNA capaces de regular la expresión de otros genes, podrían estar implicados en el desarrollo del cáncer de tiroides (68). En una revisión de 2018 (69) se recogen los distintos microRNA relacionados hasta entonces con los diferentes subtipos de cáncer de tiroides. Destacamos el artículo de Xiong et al. (70) por focalizarse en el estudio del perfil de microRNAs del FNMTc, encontrando una desregulación del miR-886-3p y miR-20-a.

En el **anexo 1**, se incluye una revisión sobre el estado actual del conocimiento de los genes implicados en el FNMTc, publicada por la doctoranda y el resto del equipo.

Desde la aparición de NGS, la publicación de nuevos genes candidatos crece exponencialmente, pero en la mayoría de publicaciones no existen estudios de funcionalidad, y a menudo solo incluyen un número muy limitado de familias, mayoritariamente de 2 miembros afectados (71-73). El esfuerzo que comporta superar estas limitaciones confiere un mayor valor a nuestros originales.

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO

Como se ha expuesto en la introducción, en los estudios realizados hasta la fecha se han sugerido diversos genes candidatos a ser causantes del FNMTC, pero sin resultados concluyentes.

La observación de familias en las que hay diferentes miembros afectados de FNMTC no sindrómico está bien documentada. La búsqueda de genes causantes de este cáncer hereditario por los métodos clásicos (ligamiento, genes candidatos, polimorfismos) no ha dado unos resultados claros ni se han replicado; sin embargo es evidente que en un porcentaje alto de estas familias existe una causa genética.

El proyecto actual pretende aplicar técnicas de secuenciación masiva para lograr identificar posibles genes causantes de FNMTC, y estudios de funcionalidad posterior que corroboren dicho papel.

Nuestra hipótesis es que el FNMTC no sindrómico, al igual que en otros cánceres hereditarios, es debido mayoritariamente a cambios en uno o unos pocos genes, que nos proponemos identificar mediante el presente proyecto.

Así, los objetivos planteados en esta tesis y que desarrollaremos en el siguiente epígrafe son los siguientes:

-Objetivo 1: Reclutamiento de familias con FNMTC y creación de una base de datos clínicos y de muestras biológicas. Descripción de las características clínicas de dichas familias.

-Objetivo 2: Investigación de mutaciones en el exoma mediante NGS, en familias con al menos 3 miembros afectados de FNMTC no sindrómico, a fin de identificar genes candidatos a ser causantes de la predisposición al FNMTC no sindrómico.

2.1. Estudio de genes previamente descritos.

2.2. Búsqueda de nuevos genes candidatos y validación en el resto de familias reclutadas.

-Objetivo 3: Comprobación mediante estudios de funcionalidad del papel patogénico de los cambios genéticos hallados.

DESARROLLO DE LOS OBJETIVOS

DESARROLLO DE LOS OBJETIVOS

1. OBJETIVO 1. Reclutamiento de familias con FNMTC y creación de una base de datos clínicos y de muestras biológicas. Descripción de las características clínicas de dichas familias.

1.1. Justificación del objetivo

La relativa baja prevalencia del FNMTC hace necesaria una colaboración multicéntrica, a fin de reunir un tamaño muestral suficiente para llevar a cabo proyectos de investigación. Para el presente proyecto, nuestro grupo ha coordinado y sigue promoviendo en la actualidad el reclutamiento de familias con FNMTC, para la recogida de datos clínicos y muestras biológicas. Desde la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición (SEEN), se ha habilitado online un registro de datos clínicos de familias con FNMTC (<http://www.regcancerdiferenciadofamiliar.es/>), en el que también hemos participado.

Por otro lado, tal y como se ha expuesto en la introducción, existen pocos estudios y todavía mucha controversia acerca de las características clínicas y la agresividad tumoral en las familias con FNMTC. En el reciente congreso de la SEEN (octubre de 2020) se han presentado los datos preliminares del análisis del registro de la SEEN de FNMTC (referenciado en comunicaciones de la presente tesis doctoral). Sin embargo, hasta la fecha no existen publicaciones con datos procedentes de familias con FNMTC en nuestro país, por lo que pensamos que podría ser interesante analizar las características de nuestra muestra.

1.2. Material y métodos

-Sujetos del estudio: selección de familias con al menos dos casos confirmados histológicamente de CDT, sin características clínicas que hagan sospechar de que se trate de casos sindrómicos, ni antecedentes de irradiación cervical u otras neoplasias.

Los pacientes serán seleccionados en los centros asociados de acuerdo con estos criterios de inclusión y siempre que consientan su participación.

-Centros colaboradores:

- Servei d' Endocrinologia i Nutrició. Hospital Clínic. Barcelona
- Servei d'Endocrinologia. Hospital de Bellvitge. Hospitalet de Llobregat.
- Servei d'Endocrinologia. Hospital Althaia. Manresa.
- Servicio de Endocrinología y Nutrición. Hospital Ramón y Cajal. Madrid.
- Servei d'Endocrinologia. Hospital de Mataró. Mataró.
- Laboratorio de Hormonas. Hospital de Alicante. Alicante.
- Servei d'Endocrinologia. Hospital Josep Trueta. Girona.
- Servei d'Endocrinología pediátrica. H.San Joan de Déu. Esplugues.
- Servicio de Endocrinología. Hospital de Elda. Alicante.
- Servei d' Endocrinologia i Nutrició. Hospital Vall Hebrón. Barcelona.
- Servei de Cirurgia General. Hospital del Mar. Barcelona.
- Servei d' Endocrinologia i Nutrició. Hospital de Mollet. Mollet del Vallès.
- Hospital de Xàtiva. Valencia.
- Hospital Universitario de La Plana. Castellón.
- Servei d' Endocrinologia i Nutrició. Hospital Germans Trias i Pujol. Badalona.
- Servei d' Endocrinologia i Nutrició. Hospital Universitari Mútua de Terrassa. Terrassa.
- Servei d' Endocrinologia i Nutrició. Hospital de Terrassa. Terrassa.

-Recogida de datos: Se procederá a la recogida retrospectiva de datos clínicos de todos los sujetos reclutados, concretamente se reunirá la información clínica siguiente:

- Número de familiares afectos. Identificación del caso índice.
- Edad al diagnóstico. Fecha.
- Sexo.
- Presentación clínica en el momento del diagnóstico (nódulo tiroideo, BMN, adenopatía/s, hallazgo por cribado familiar).

- Histología del tumor.
- Presencia o no de enfermedad multicéntrica, invasión local. Lateralidad.
- Estadaje del tumor (TNM).
- Tratamientos, incluyendo la cirugía/s y el tratamiento con radioyodo.
- Situación de la enfermedad.
- Recurrencia. Fecha.
- Presencia de *BRAF* mutado.

Con estos datos, se procederá a realizar un estudio descriptivo mediante el paquete estadístico SPSS versión 17.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL).

Asimismo, de cada sujeto se recogerá muestra sanguínea (15 ml de sangre total) para la extracción de ADN usando el protocolo convencional de precipitación salina, para poder llevar a cabo los siguientes objetivos de la presente tesis doctoral. También se recogerán muestras histológicas de tejido tumoral en los casos en que sea factible. Todas las muestras extraídas (sangre y tejido) estarán codificadas. Las muestras obtenidas durante el proyecto serán incluidas en una colección particular (“Síndromes Endocrinos Hereditarios”; CEIC: Reg. 2013/8772; responsable de la colección: Dr. Josep Oriola). El almacenamiento de muestras se hará a -20°C en el congelador situado en el Servicio de Bioquímica y Genética Molecular del Hospital Clínic, de uso exclusivo por parte del equipo investigador.

-Aspectos éticos.

El presente proyecto ha sido aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínic de Barcelona, España (Reg. HCB /2016/0200), y se realizó de conformidad con la Declaración de Helsinki. Los sujetos dieron su consentimiento informado por escrito antes de ser admitidos en el estudio.

1.3. Resultados

Hasta la fecha (octubre de 2020), hemos reclutado 51 familias (41 de 2 miembros afectados; 10 de 3 o más miembros afectados) procedentes de 17 centros nacionales. Del total de 118 sujetos hemos podido recolectar muestras sanguíneas de 91 (debido a distintos motivos tales como exitus, cambio de vivienda habitual, seguimiento médico privado, etc.) y datos clínicos de 104. Sólo hemos conseguido muestras histológicas de una familia de ≥ 3 miembros. La incorporación de nuevos centros y el reclutamiento siguen abiertos.

En cuanto a las características clínicas de las familias reclutadas, el 67,3% de los sujetos fueron mujeres, con edad media al diagnóstico de 43,2 años (intervalo de 13 a 71 años). La variante histológica más común fue el CPT variante clásica (84% de los casos), seguido del CPT variante folicular (11%). Dentro de otros subtipos histológicos menos comunes, encontramos dos casos de CFT, un caso de CPT variante cribiforme morular (en que se descartó síndrome de Gardner asociado), un CPT columnar, un CPT de células altas y otro caso de CPT variante esclerosante difusa. Cabe recordar que se ha demostrado que estas tres últimas variantes del CPT confieren peor pronóstico (24).

A todos los pacientes se les practicó una tiroidectomía total, y un 87,5% de los pacientes recibieron terapia con yodo radioactivo (rango 30–450 mCi). Como otras características reseñables que se han asociado al FNMTc, la multifocalidad tumoral estaba presente en el 50,6% de los casos. En total, un tercio de los tumores eran bilaterales, y un cuarto de los tumores presentaron extensión extratiroidea macroscópica e invasión local. Se hallaron metástasis en ganglios linfáticos en el 45,3% de los casos, y metástasis a distancia en el 4,7%. Uno de los pacientes (con metástasis pulmonares a distancia) murió de cáncer de tiroides (mortalidad 0,9%). Este mismo paciente fue el único que ha recibido inhibidores de tirosín-kinasa (concretamente lenvatinib y sorafenib). Hasta la fecha, un 21,7% presentaron persistencia o recurrencia de la enfermedad. Las características clínicas de nuestras familias se resumen en la siguiente tabla (**tabla 3**).

Tabla 3. Características basales de las familias con FNMTC reclutadas (N= 51 familias)

Característica	Proporción
Sexo (%) ♂/♀	32,7/67,3
Edad al diagnóstico (años) X (DS)	43,2 (12,4)
Número IQ (n) X (DS)	1,19 (0,49)
Radioyodo (%) sí/no	87,5/12,5
Dosis de radioyodo (mCi) X (DS)	125,6 (74,4)
Tamaño tumoral (%) <2cm/2-4cm/>4cm	50,5/32,3/17,2
Ganglios (%) sí/no	45,3/54,7
M1 al diagnóstico (%) sí/no	4,7/95,3
Multifocalidad (%) sí/no	50,6/49,4
Bilateralidad (%) sí/no	33,3/66,7
Invasión local (%) sí/no	25,6/74,4
Recurrencia (%) sí/no	21,7/78,3

Leyenda: X: media; DS: desviación estándar; IQ: intervenciones quirúrgicas; mCi: milicurios; M1: metástasis.

Separamos por grupos y analizamos las familias de al menos 3 miembros afectados (N=10 familias, en total 32 sujetos de los que disponíamos de la información clínica), versus las familias de 2 miembros afectados (N=41 familias, en total 72 sujetos de los que disponíamos de la información clínica).

No encontramos diferencias en cuanto a la edad al diagnóstico, variantes histológicas, ni número de cirugías o la administración de radioyodo. Sin embargo, detectamos una mayor dosis de radioyodo en las familias de ≥ 3 miembros afectados versus las de 2

miembros (147,8 versus 108,6 mCi, $p < 0,05$). En cuanto al sexo, había mayor proporción de varones afectados en las familias de ≥ 3 miembros afectados (un 43%, versus el 28%), aunque esta diferencia no fue significativa ($p = 0,08$, no significativa (NS)). También observamos una tendencia a mayor presencia de adenopatías, metástasis, multifocalidad y bilateralidad en las familias de ≥ 3 miembros afectados, pero nuevamente sin diferencias estadísticamente significativas. En cuanto a la invasión local, sí detectamos mayor frecuencia en las familias de ≥ 3 miembros afectados (44% versus 17,5%, $p < 0,05$). En lo que se refiere a la recurrencia, se observó en un 33,3% de las familias de ≥ 3 miembros afectados, versus un 16,1% de las de 2 miembros (diferencia no significativa, $p = 0,05$). El único paciente fallecido fue del grupo de ≥ 3 miembros afectados.

Las características clínicas de las familias de tres o más miembros afectados, versus las de 2 miembros afectados, se resumen en la siguiente tabla (**tabla 4**).

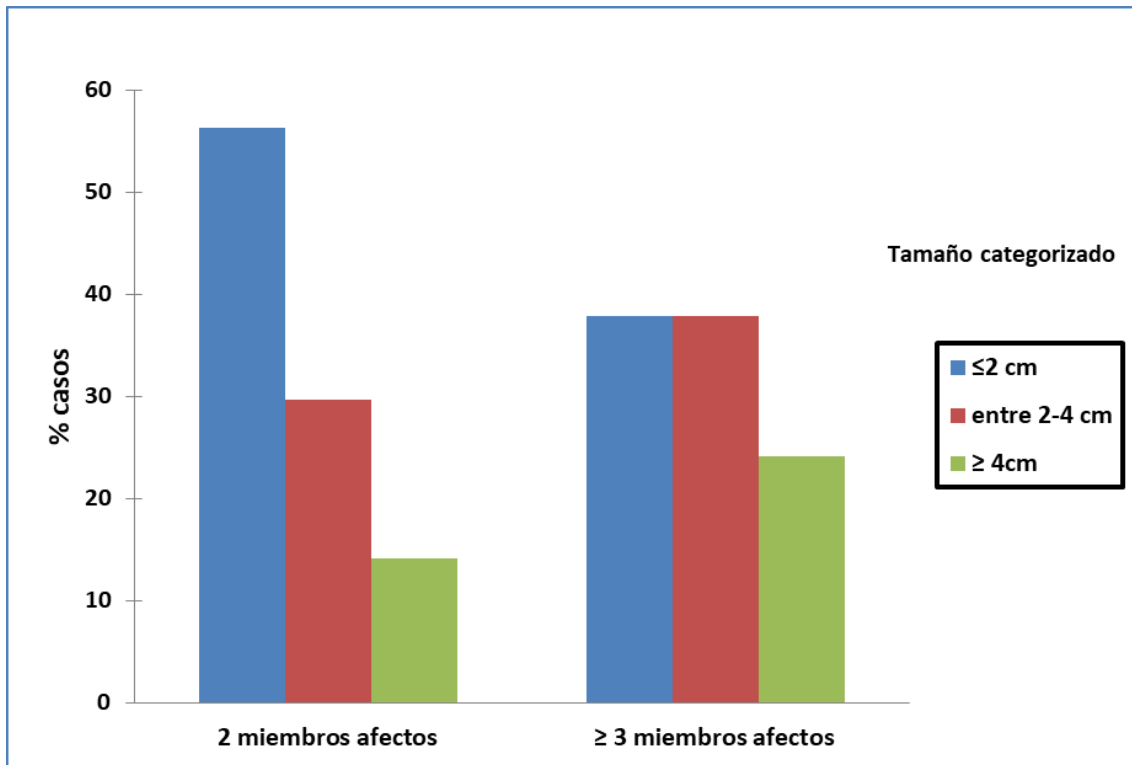
Tabla 4. Características basales de las familias de ≥ 3 versus 2 miembros afectados.

Característica	Familias de ≥ 3 miembros afectados (N=10)	Familias de 2 miembros afectados (N=41)	p
Sexo (%) ♂/♀	43/56	28/72	NS (p= 0,08)
Edad al diagnóstico (años) X (DS)	42,4 (11,8)	43,6 (12,6)	NS
Número IQ (n) X (DS)	1,25 (0,67)	1,16 (0,37)	NS
Radioyodo (%) sí/no	96,6/3,4	83,6/16,4	NS (p= 0,07)
Dosis de radioyodo (mCi) X (DS)	147,8 (110,6)	108,6 (35,82)	<0,05
Tamaño tumoral (%) <2cm/2-4cm/>4cm	37,9/37,9/24,1	56,3/29,7/14,1	NS
Ganglios (%) sí/no	55,6/44,4	40,7/59,3	NS
M1 al diagnóstico (%) sí/no	7,4/92,6	3,4/96,6	NS
Multifocalidad (%) sí/no	57,7/42,3	47,5/52,5	NS
Bilateralidad (%) sí/no	43,5/56,5	29,3/70,7	NS
Invasión local (%) sí/no	44/56	17,5/82,5	<0,05
Recurrencia (%) sí/no	33,3/66,7	16,1/83,9	NS (p= 0,05)

Leyenda: X: media; DS: desviación estándar; IQ: intervenciones quirúrgicas; mCi: milicurios; M1: metástasis.

A continuación, se representa el tamaño tumoral en los dos grupos (**gráfico 1**). Aunque no hubo diferencias significativas, se intuye una tendencia a un mayor tamaño tumoral en las familias de ≥ 3 miembros afectados.

Gráfico 1. Categorías de tamaño tumoral en las familias con ≥ 3 miembros afectados, versus las de 2 miembros afectados.



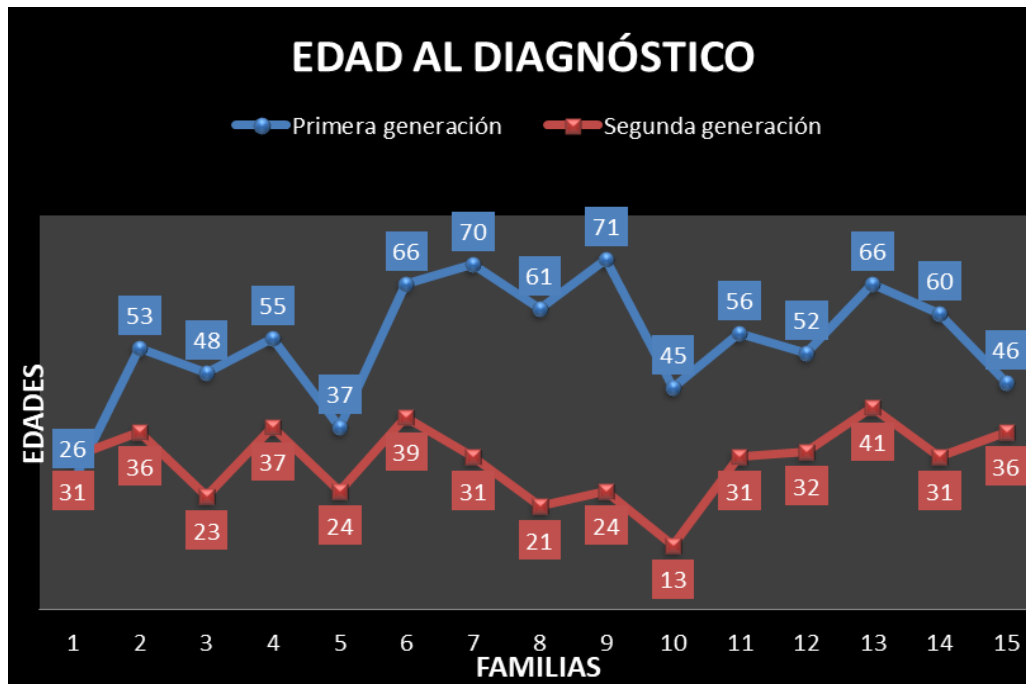
También quisimos comprobar si en el conjunto total de nuestras familias se daba un fenómeno de anticipación, tal y como está descrito en la literatura. Para ello, seleccionamos las familias en las que los casos tenían una relación paterno-filial. En total, se trataba de 15 familias: 15 padres/madres con 18 hijos/as afectos/as. Sus características basales están recogidas en la **tabla 5**. Efectivamente, observamos una menor edad al diagnóstico en pacientes de segunda generación respecto a la primera generación (**gráfico 2**). La mediana de edad al diagnóstico de la primera generación fue de 51 años, versus 32 años para la segunda generación ($p < 0,01$). Separando las familias según el número de miembros afectos, se mantenía la misma diferencia. Solo en 3 casos de las 15 familias el diagnóstico del miembro de segunda generación fue en contexto de realización de ecografía de tiroides por screening familiar (concretamente en 3 familias de ≥ 3 miembros afectos), en el resto fue por aparición de nódulo tiroideo/bocio multinodular años después del diagnóstico de CDT en la primera generación: Considerando la fecha de diagnóstico, la segunda generación fue diagnosticada en promedio 6,6 años más tarde que la primera generación (rango 0-24 años).

Tabla 5. Familias con relación paterno-filial (N=15 familias). Diferencias entre los miembros de primera versus de segunda generación.

Característica	Miembros de primera generación (N=15 individuos)	Miembros de segunda generación (N=18 individuos)	P
Sexo (%) ♂/♀	33,3/66,7	38,9/61,1	NS
Edad al diagnóstico (años) X (DS)	51,8 (15,1)	32,7 (9,8)	P<0.01
Número IQ (n) X (DS)	1,21 (0,57)	1,11 (0,32)	NS
Radioyodo (%) sí/no	93,3/6,7	94,1/5,9	NS
Dosis de radioyodo (mCi) X (DS)	175,2 (126,2)	116,9 (77,2)	NS
Tamaño tumoral (%) <2cm/2-4cm/>4cm	53,3/33,3/13,3	29,4/47,1/23,5	NS
Ganglios (%) sí/no	53,8/46,2	56,3/43,8	NS
M1 al diagnóstico (%) sí/no	15,4/84,6	6,7/93,3	NS
Multifocalidad (%) sí/no	53,8/46,2	62,5/37,5	NS
Bilateralidad (%) sí/no	42,9/57,1	46,2/53,8	NS
Invasión local (%) sí/no	38,5/61,5	14,3/85,7	NS
Recurrencia (%) sí/no	28,6/71,4	37,5/62,5	NS

Leyenda: X: media; DS: desviación estándar; IQ: intervenciones quirúrgicas; mCi: milicurios; M1: metástasis.

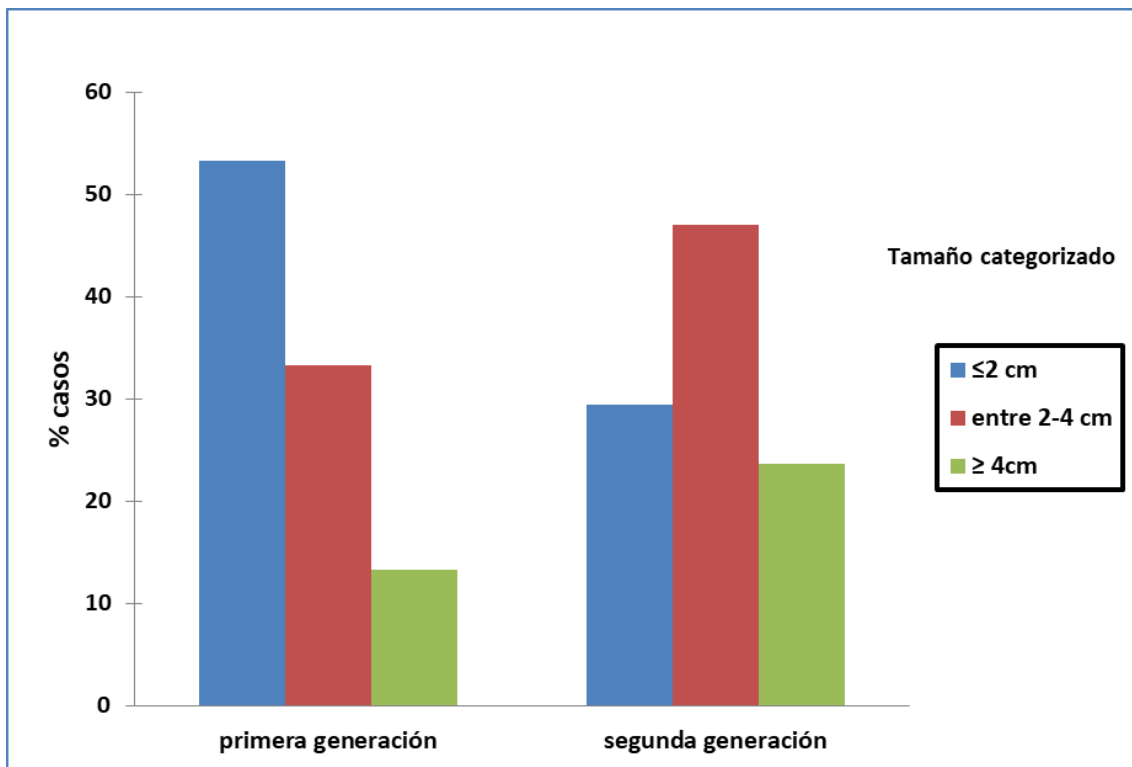
Gráfico 2. Edad al diagnóstico en la primera generación versus en la segunda generación, en las 15 familias con relación paterno-filial.



En cuanto a la proporción entre sexos, observamos una mayor proporción del sexo masculino en segunda generación (39% de los casos) versus en primera generación (33% de los casos), aunque la diferencia no fue significativa. Tampoco pudimos demostrar diferencias significativas pronósticas o de otra índole entre ambas generaciones. Solo observamos una tendencia a mayor recurrencia en la segunda generación versus la primera, concretamente en las familias de 3 o más miembros: 4 casos de la segunda generación presentaron recurrencia, versus 2 casos de la primera generación. En cambio, en las familias de 2 afectos hubo 2 casos con recurrencia en la primera generación, y también 2 casos en la segunda generación.

Finalmente, en el siguiente gráfico (**gráfico 3**) podemos ver el tamaño tumoral en las distintas generaciones. Aunque no hubo diferencias significativas, se puede sospechar que hay una tendencia a mayor tamaño tumoral en segunda generación.

Gráfico 3. Categorías de tamaño tumoral en la primera generación versus en la segunda generación, en las 15 familias con relación paterno-filial.



2. OBJETIVO 2.- Investigación de mutaciones en el exoma mediante NGS, en familias con al menos 3 miembros afectados de FNMTC no sindrómico, a fin de identificar genes candidatos a ser causantes de la predisposición al FNMTC no sindrómico.

Este objetivo queda ampliamente desarrollado en los originales 1 y 2. A continuación se describen brevemente los resultados más significativos.

2.1. Estudio de genes previamente descritos.

2.1.1. Justificación del objetivo

Como hemos comentado previamente, se han sugerido diversos genes de susceptibilidad al FNMTC, que no han podido validarse en posteriores estudios. Por ello, en primer lugar procedimos al estudio de estos genes previamente descritos en nuestras familias. Concretamente, seleccionamos las familias más ricas en miembros afectados (≥ 3), por su mayor probabilidad de que el cáncer de tiroides sea realmente hereditario. De cada familia estudiamos el exoma de dos de los miembros, los dos genéticamente más alejados. De este modo, habría menos variaciones que se compartan simplemente por el vínculo familiar pudiendo hacer un mejor cribado de los cambios que puedan ser responsables del cáncer de tiroides en cada familia.

2.1.2. Material y métodos

- Una vez obtenidas las muestras sanguíneas, se procedió a la extracción del DNA (mediante el protocolo de precipitación salina) y valoración del DNA mediante cuantificación fluorométrica por nanodrop/qubitTM.
- Estudio del exoma de cuatro familias con al menos tres miembros afectados mediante secuenciación masiva del exoma (WES). Concretamente, se estudió el exoma de 10 personas afectas procedentes de 4 familias (**figura 2**). La construcción de librerías para la secuenciación se realizó a partir de 5 μ g de DNA de cada paciente. Las librerías fueron enriquecidas mediante el kit de Agilent Technologies Exome capture

Agilent v6 para una secuenciación bidireccional con una profundidad de 60x. La secuenciación se realizó en un secuenciador de Illumina HiSeq 2000. Las lecturas fueron mapeadas contra el genoma de referencia humano (UCSC hg19).

- En el caso concreto del gen *POT1*, además de su estudio mediante WES en esas cuatro familias, se procedió a la secuenciación completa del gen mediante Sanger en tres casos índice pertenecientes a tres familias adicionales (**figura 3**, familias 5,6 y 7).
- Búsqueda de variantes en genes previamente descritos como posiblemente relacionadas con el FNMTC. La anotación de variantes se basó en las bases de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y UCSC Genome Browser, suplementadas con programas bioinformáticos de predicción.
- Para más detalles sobre la metodología, ver apartado correspondiente en las publicaciones 1 y 2.

Figura 2. Familias analizadas mediante WES (El asterisco indica las personas afectas estudiadas).

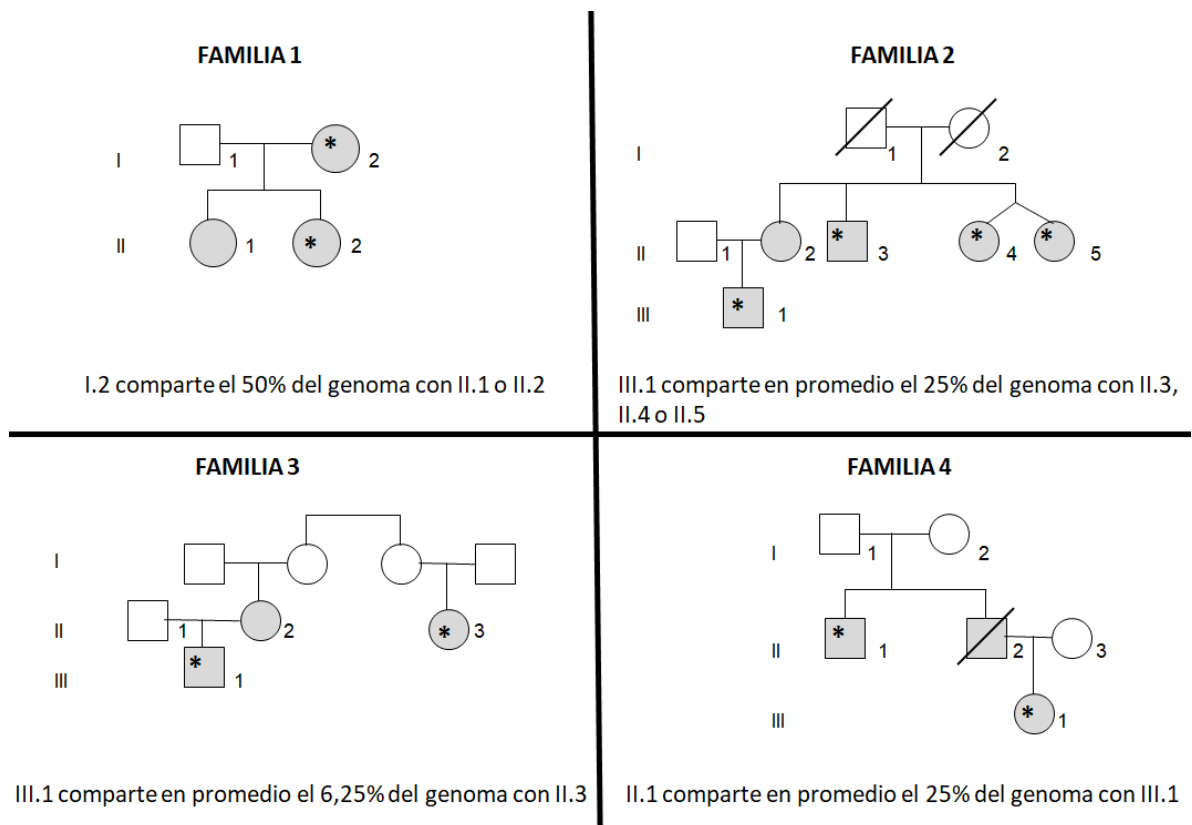
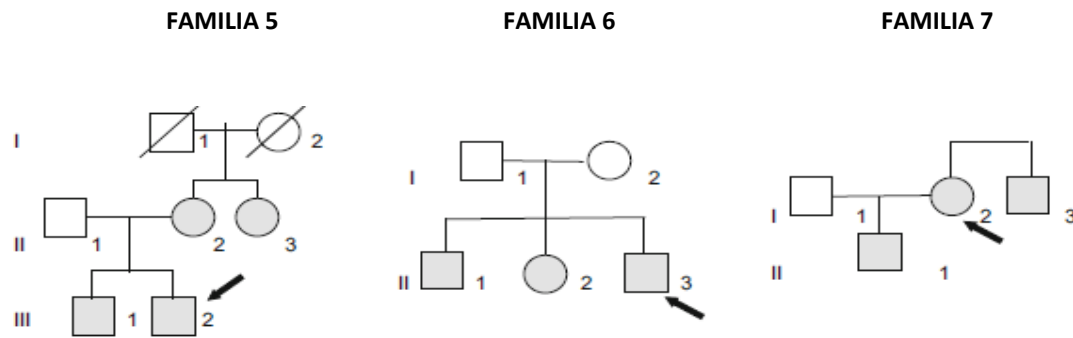


Figura 3. Familias adicionales en las que se analizó *POT1*, mediante Sanger (La flecha indica las personas afectas estudiadas, que se corresponden con los casos índice).



2.1.3. Resultados

En los 10 exomas analizados (y por tanto en las 4 familias, pues tratándose de una patología hereditaria todos los miembros afectos deberían ser portadores de las variantes) hemos descartado alteraciones en genes que condicionan cáncer de tiroides no medular familiar de naturaleza sindrómica (genes *APC*, *PTEN*, *WRN*, *DICER1* Y *PRKAR1A*).

También hemos descartado variantes sugestivas de causar la patología en genes supresores tumorales (*SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *STK11*, *VHL*, *RB1*); genes reordenados en tiroides (*NRTK*, *PPARG*); genes reparadores de DNA (*ATM*, *XRCC1*, *XRCC3*, *BRCA1*, *BRCA2*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*); genes implicados en el desarrollo de la tiroides (*PAX8*, *JAG1*, *CDC42*, *GSTM1*, *GSTT1*, *SRGAP1*, *TERT*, *THRB*, *AKT1*, *SEC23B*, *ESR2*, *NKX2*, *TBL1X*); genes previamente descritos en la literatura como posibles implicados en el FNMTc (*HABP2*, *TTF1*, *THADA*, *SEC23B*, *FOXE1*, *KLLN*, *MAP2K5*, *CHEK2*, *MYH9*, *SRRM2*); genes del complejo telómero-telomerasa como *POT1*; proto-oncogenes (*RET*, *MET*, *KIT*, *MERTK*) y genes que se han encontrado mutados en cáncer

de tiroides a nivel somático (en tejido tumoral) como *BRAF*, *NRAS*, *TP53*, *CDKN2A*, *ALK*, *ATF4* (original 1).

En el caso concreto de *POT1*, dado que se ha sugerido recientemente su posible implicación en el cáncer de tiroides hereditario (74), ampliamos el estudio a tres familias adicionales (**figura 3**), en las que también descartamos la presencia de variantes patológicas mediante secuenciación directa completa de dicho gen (original 2).

2.2. Búsqueda de nuevos genes candidatos y validación en el resto de familias reclutadas.

2.2.1. Justificación del objetivo

Dado que no hallamos variantes en genes previamente descritos en la literatura como posiblemente implicados en el FNMTTC, nos sumergimos en la búsqueda de nuevos genes.

2.2.2. Material y métodos

- Para el presente objetivo, empleamos los datos del estudio del exoma del objetivo previo. Concretamente, seleccionamos los datos de WES de la familia 2, porque es la familia con más miembros afectados que pudimos reclutar (**figura 2**). Además, disponíamos también de muestra sanguínea del individuo II.1. (control sano).
- Nuevamente, las lecturas fueron mapeadas contra el genoma de referencia humano (UCSC hg19); y la anotación de variantes se basó en las bases de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y UCSC Genome Browser, suplementadas con programas bioinformáticos de predicción.
- Dada la ingente cantidad de variantes obtenidas por WES, se establecieron una serie de criterios para filtrar las variantes con más probabilidad de ser patogénicas (**tabla 6**). En todos los casos, cuando se encontró una variante en un sujeto, se hizo un estudio de segregación en los demás miembros afectados.

- Análisis y comprobación de las variantes seleccionadas mediante secuenciación directa (Sanger).
- Integración de los datos de secuenciación y clínicos.
- Validación de los resultados obtenidos: los cambios genéticos encontrados (así como los genes de los que forman parte, dado que podrían presentarse variantes en distintos exones dentro de un mismo gen) en esta familia inicial (familia 2), fueron estudiados mediante secuenciación por Sanger en las restantes familias reclutadas en el proyecto (en aquel momento disponíamos de 44 familias). También se estudiaron en población control (100 muestras sanguíneas anónimas procedentes del banco de sangre de nuestro centro, previo consentimiento).
- Para más detalles sobre la metodología, ver apartado correspondiente en las publicaciones 1 y 2.

Tabla 6. Filtros empleados sobre los datos de WES de la familia 2 para la obtención de variantes candidatas (adaptado de original 1).

Filtros empleados	Número de variantes obtenidas (SNVs e INDELS)
Número total de variantes	90.249
Presentes en todos los miembros afectados de la familia, heterocigotas y con cobertura >20	244
En regiones exónicas	118
No-sinónimas (missense) o inserciones/delecciones (frameshift)	87
SIFT score patogénico (<0.05) o no disponible	82
Frecuencia de la SNVs/ INDELS \leq 2% o no disponible, según las bases de datos de ExAC (población europea) y 1000 Genomes	58
Descritas como un GST o protooncogen	5
Confirmadas por Sanger	2
Presentes en todos los miembros afectados de al menos otra familia adicional	1

Abreviaturas: SNVs: Variantes de un solo nucleótido; INDELS: inserciones y deleciones; GST: gen supresor tumoral.

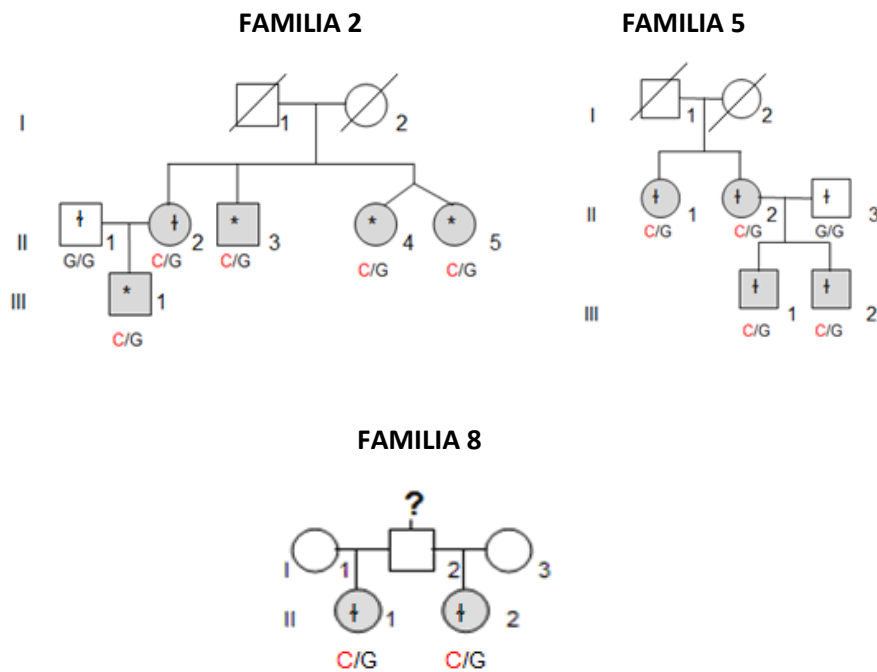
2.2.3. Resultados

El número total de variantes presentes en todos los miembros de la familia 2 analizados mediante WES fue de 90.249. Tras filtrar por nuestros criterios preestablecidos (**tabla 6**), identificamos 58 variantes. Seleccionamos cinco de ellas, por estar en genes previamente descritos como protooncogenes o genes supresores tumorales. Tras la comprobación mediante secuenciación de Sanger, sólo se confirmaron dos variantes: p.Thr190Met en *SH3BP1*; y p.Asp31His en *NOP53* (gen también conocido como *GLTSCR2*). Estas dos variantes seleccionadas, fueron estudiadas mediante secuenciación en las restantes familias reclutadas en aquel momento (37 de dos miembros afectados; 7 de tres o más miembros afectados), así como en nuestro grupo control de 100 personas.

No encontramos la variante p.Thr190Met en *SH3BP1* en ninguna otra familia. Sin embargo, sí estaba presente en el 3% de los controles, por lo que la descartamos debido a su alta frecuencia en nuestra población (>2%, uno de nuestros filtros preestablecidos).

En cambio, sí hallamos la variante p.Asp31His o D31H (dbSNP: rs78530808) en *NOP53* presente en heterocigosis y en todos los miembros de otras dos familias: Una familia de 4 miembros afectados (familia 5) y otra familia de 2 afectas (familia 8). Es decir, p.Asp31His en *NOP53* estaba presente en todas las personas afectas de 3 familias con FNMTc (familias 2, 5 y 8) (**figura 4**), y no presente en los controles no afectados: Ni en el miembro II.1 de la familia 2 (**figura 2**), ni en el miembro II.3 de la familia 5 (**figura 3**), reforzando su posible papel patogénico. Las características clínicas de las tres familias portadoras de la variante p.Asp31His en *NOP53* están descritas en la tabla 2 del original 1.

Figura 4. Pedigrís de las familias 2, 5 y 8 y genotipo de NOP53 para cada mutación en heterocigosis (c.91G > C, p. Asp31His). Los pacientes afectos de cáncer de tiroides se muestran coloreados en gris. El asterisco indica que la variante fue identificada mediante WES y validada con Sanger; mientras que † indica que la variante fue identificada directamente mediante Sanger.



En cuanto a nuestro grupo control, hallamos la variante p.Asp31His en 3/100 muestras, lo cual representa una frecuencia alélica o Minor Allele Frequency (MAF) del 1,5%. En población europea no finlandesa, esta misma variante ha sido descrita en el 1,8% de la población según Exome Aggregation Consortium (ExAC) (75), resultado similar a nuestro estudio.

3. OBJETIVO 3. Comprobación mediante estudios de funcionalidad del papel patogénico de los cambios genéticos hallados.

Este objetivo queda ampliamente desarrollado en el original 1. A continuación se describen brevemente los resultados más significativos.

3.1. Justificación del objetivo

Tras el hallazgo de la variante p.Asp31His en *NOP53* en todos los miembros de 3 familias con FNMTC (resultados descritos en el objetivo anterior), nos planteamos profundizar en el conocimiento de dicha variante. La posición Asp31 en *NOP53* está bien conservada en diferentes especies. Además, verificamos en distintos algoritmos in silico (PolyPhen-2, mutation taster) su probable efecto patogénico. Todo ello nos impulsó a llevar a cabo estudios funcionales, para comprobar su posible papel en la oncogénesis del FNMTC. Para ello, contamos con la colaboración y experiencia del Endocrine Oncology Branch, National Institutes of Health (Bethesda, Maryland, USA). Allí pude llevar a cabo, bajo su supervisión, los siguientes estudios funcionales, fruto de una estancia de investigación de 6 meses becada por la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición (SEEN): Beca Morreale Escobar, 2018.

3.2. Material y métodos

- Obtención de líneas celulares estables de cáncer de tiroides:
 - TPC1 (papillary thyroid cancer cell line).
 - FTC133 (follicular thyroid cancer cell line).
 - BCPAP (papillary thyroid cancer cell line with a BRAF V600E and TP53 D259Y mutations).
- Estudios de knockdown de *NOP53* en TPC1, FTC133 y BCPAP, empleando ARN interferentes (siRNAs) mediante la técnica de transfección inversa. Realización de estudios de clonogenicidad y de proliferación celular.
- Estudios de sobreexpresión de *NOP53* en TPC1, FTC133 y BCPAP, a las que previamente insertamos mediante transfección una copia de *NOP53* wild type, o de

NOP53 con la mutación de interés (D31H). Realización de estudios de clonogenicidad y de proliferación celular.

- Por otro lado, sobre los cortes histológicos fijados en parafina de las piezas de tiroidectomía conseguidas, estudiamos la expresión inmunohistoquímica de los genes candidatos (*NOP53*) mediante anticuerpos específicos. En estos cortes histológicos había representación del tejido tumoral y de tejido tiroideo normal, de modo que permitiese la comparación semicuantitativa.

3.3. Resultados

En los estudios de knockdown de *NOP53* (figura 4 del original 1) se observó una reducción significativa de la proliferación celular y la formación de clones en las tres líneas celulares, en comparación con los controles. Esto sugiere una función protooncogénica de *NOP53* (al bloquear el gen, desciende la proliferación y la clonogenicidad, eventos propios de la oncogénesis). Estos hallazgos se confirmaron realizando los ensayos con dos siRNA distintos.

En los estudios de sobreexpresión de *NOP53* (figura 5 del original 1) se observó un aumento significativo de la proliferación celular y la formación de clones en las tres líneas celulares, en comparación con los controles. Esto sugiere de nuevo una función protooncogénica de *NOP53* (al sobreexpresar el gen, aumenta la proliferación y la clonogenicidad, eventos propios de la oncogénesis). Sin embargo, no detectamos diferencias significativas en la proliferación celular y la clonogenicidad entre las células transfectadas con *NOP53* wild type versus las transfectadas con *NOP53* con la variante D31H.

Por último, obtuvimos piezas de tiroidectomía de los 4 individuos afectados de la familia 5. Los estudios de inmunohistoquímica revelaron mayor expresión de la proteína *NOP53* en tejido tumoral, en comparación con el tejido tiroideo normal, sugiriendo que *NOP53* puede estar sobreexpresado en el tejido tumoral de pacientes con FNMTc.

Comunicaciones surgidas de estos objetivos

- **Aida Orois.** Comunicación oral sobre nuestro proyecto en el “Primer retreat traslacional” de intercambio científico entre el Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Clínic y el Institut d’Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPs) celebrado el 4/11/2016 en Barcelona.

- Josep Oriola, **Aida Orois.** “Recerca de gens implicats en el càncer diferenciat de tiroide familiar no sindròmic”. Comunicación oral en el 19é Congrès de la Societat Catalana d’Endocrinologia i Nutrició (SCEN), 2016.

- **Aida Orois,** Mireia Mora, Irene Halperin, Josep Oriola. “Búsqueda de genes implicados en el cáncer diferenciado de tiroides (CDT) familiar no sindrómico”. Póster en el 59º Congreso de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición (SEEN), 2017.

- **Aida Orois,** Mireia Mora, Irene Halperin, Sudheer Kumar Gara, Electron Kebebew, Josep Oriola. “Germline mutations in *KIF1B* gene in two families with familial non-medullary thyroid cancer (FNMTC)”. Póster en el 20º Congreso Europeo de Endocrinología y Nutrición (ECE), 2018.

- Diego J del Can, Ana Romero, Suset Dueñas, Emma Anda, Julia Sastre, Victoria Alcázar, Jorge García, Amelia Oleaga, Begoña Pérez, Edelmiro Menéndez, Nerea Utrilla, M Luisa Isidro, Francisca Vich, Paula Sánchez, Juan C Galofré, Jersy J Cárdenas, Gonzalo Maldonado, Claudia Arnás, **Aida Orois,** Elena Navarro. “Análisis del registro nacional de pacientes con carcinoma familiar de tiroides no medular (CFTNM)”. Póster en el 61º Congreso de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición (SEEN), 2020.

Publicaciones surgidas de estos objetivos

■ Original 1:

Orois A, Gara S, Mora M, Halperin I, Martinez S, Alfayate R, Kebebew E, Oriola J. NOP53 as A Candidate Modifier Locus for Familial Non-Medullary Thyroid Cancer. *Genes (Basel)*. 2019;10:1–15.

Factor de impacto: 3.331, Q1

Genetics

■ Original 2:

Orois A, Badenas C, Reverter JL, López V, Potrony M, Mora M, Halperin I, Oriola J. Lack of Mutations in *POT1* Gene in Selected Families with Familial Non-Medullary Thyroid Cancer. *Horm Cancer*. 2020;11(2):111-6.

Factor de impacto: 2.239, Q2

Endocrinology, diabetes and metabolism

De manera complementaria, en el **anexo 1** se incluye una revisión publicada por la doctoranda y el resto del equipo.

ORIGINAL 1

Article

NOP53 as A Candidate Modifier Locus for Familial Non-Medullary Thyroid Cancer

Aida Orois ^{1,*} , Sudheer K. Gara ², Mireia Mora ^{1,3}, Irene Halperin ^{1,3}, Sandra Martínez ⁴, Rocio Alfayate ⁵, Electron Kebebew ⁶ and Josep Oriola ^{3,7}

¹ Department of Endocrinology and Nutrition, ICMDM, Hospital Clinic, 08036 Barcelona, Spain; mporta@clinic.cat (M.M.); halperin@clinic.cat (I.H.)

² Thoracic Surgery Branch, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA; sudheer.gara@nih.gov

³ Faculty of Medicine, University of Barcelona, 08007 Barcelona, Spain; joriola@clinic.cat

⁴ Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital de Elda, 03600 Elda, Alicante, Spain; smartinez080l@cv.gva.es

⁵ Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital General Universitario de Alicante, 03010 Alicante, Spain; alfayate_roc@gva.es

⁶ Department of Surgery and Stanford Cancer Institute, Stanford University, Stanford, CA 9430, USA; kebebew@stanford.edu

⁷ Department of Biochemistry and Molecular Genetics, CDB, Hospital Clínic, 08036 Barcelona, Spain

* Correspondence: aorois@clinic.cat

Received: 4 September 2019; Accepted: 4 November 2019; Published: 7 November 2019



Abstract: Nonsyndromic familial non-medullary thyroid cancer (FNMTTC) represents 3–9% of thyroid cancers, but the susceptibility gene(s) remain unknown. We designed this multicenter study to analyze families with nonsyndromic FNMTTC and identify candidate susceptibility genes. We performed exome sequencing of DNA from four affected individuals from one kindred, with five cases of nonsyndromic FNMTTC. Single Nucleotide Variants, and insertions and deletions that segregated with all the affected members, were analyzed by Sanger sequencing in 44 additional families with FNMTTC (37 with two affected members, and seven with three or more affected members), as well as in an independent control group of 100 subjects. We identified the germline variant p. Asp31His in *NOP53* gene (rs78530808, MAF 1.8%) present in all affected members in three families with nonsyndromic FNMTTC, and not present in unaffected spouses. Our functional studies of *NOP53* in thyroid cancer cell lines showed an oncogenic function. Immunohistochemistry exhibited increased *NOP53* protein expression in tumor samples from affected family members, compared with normal adjacent thyroid tissue. Given the relatively high frequency of the variant in the general population, these findings suggest that instead of a causative gene, *NOP53* is likely a low-penetrant gene implicated in FNMTTC, possibly a modifier.

Keywords: thyroid cancer; genetic abnormalities; molecular testing; *NOP53*; oncogenic mutations

1. Introduction

Thyroid cancer (TC) is the most common endocrine cancer, with more than 54,000 new cases diagnosed every year in the USA. In fact, it is expected that in a few years it will become the third most common cancer among American women [1].

There are two main types of TC, defined according to their cellular origin: (a) non-medullary cancer, arising from follicular cells, which accounts for 95% of TCs (mostly papillary thyroid cancer (PTC) and follicular thyroid cancer (FTC)); and (b) medullary thyroid carcinomas (MTC), which originates from parafollicular C-cells (accounting for 5% of TCs). Familial non-medullary thyroid

cancer (FNMTTC) represents 3–9% of TCs [2]. FNMTTC is classified as either syndromic or nonsyndromic. Susceptibility genes involved in syndromic FNMTTC are known: *APC* in familial adenomatous polyposis [MIM: 175100], *PTEN* in Cowden's disease [MIM: 158350], *PRKAR1A* in Carney complex type 1 [MIM: 160980], *WRN* in Werner's syndrome [MIM: 277700], and *DICER1* in the DICER1 syndrome [MIM: 606241], [3]. Nonsyndromic FNMTTC accounts for more than 95% of all FNMTTC cases and is defined by the presence of TC in two or more first-degree relatives, in the absence of environmental causes (e.g., exposure to radiation) [4]. Most cases of FNMTTC are nonsyndromic and the genetic causes are still unknown [5,6]. In addition, some studies have suggested that nonsyndromic FNMTTC is more aggressive than sporadic non-medullary thyroid cancer [7]. Therefore, given the prevalence and aggressiveness of nonsyndromic FNMTTC, it is crucial to identify the susceptibility genes involved.

Most nonsyndromic FNMTTCs show an autosomal dominant pattern of inheritance with incomplete penetrance. Given the high prevalence of TC in the general population, Charkes [8] estimated that about 62% of families with two cases of FNMTTC can be phenocopies (two sporadic cases associated by chance) and, therefore, only 38% would be truly hereditary. However, if there are three affected cases, the probability of its being hereditary rises to 96%.

Different strategies have been used to identify candidate genes responsible for FNMTTC: Linkage [9,10], Genome Wide Association Studies (GWAS) [11], and next generation sequencing studies [12,13]. Several candidate regions, such as PRN (1q21), NMTC1 (2q21), FTEN (8p23), MNG1 (14q32) and TCO (19p13.2), as well as candidate genes, like *SRGAP1*, *NKX2*, *FOXE1*, *HABP2* or *MAP2K5* have been suggested, but none have been clearly validated as causative of familial thyroid cancer [14–16]. Overall, this suggests that many genes could be involved in FNMTTC in a monogenic fashion with different penetrance levels, without ruling out the possibility of polygenic inheritance (the sum of genetic variants).

We designed this multicentric study to analyze families with FNMTTC and identify putative susceptibility genes for nonsyndromic FNMTTC.

2. Materials and Methods

2.1. Study Subjects

We designed a multicentric study in Spain to collect blood specimens (15 mL of whole blood in potassium EDTA tubes), and clinical data from families with at least two members with non-medullary thyroid cancer, confirmed by histology, without history of other malignancies, and without clinical characteristics suggestive of syndromic FNMTTC. We obtained blood samples and clinical data from 45 families with nonsyndromic FNMTTC (37 with two affected members and eight families with three or more affected members) from 15 hospitals in Spain.

This project was approved by the Ethics Committee of the Hospital Clínic of Barcelona, Spain (Reg. HCB/2016/0200), and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Patients gave written informed consent before undergoing evaluation and testing.

2.2. DNA Extraction, Exome Capture and Next-Generation Sequencing

Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples (using conventional salt-precipitation protocol). The DNA library was prepared using the SureSelect exon v5-post kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), that enables the capture of the target sequence of exonic regions in the human genome. The libraries were sequenced using the Illumina HiSeq 2000 sequencer (Macrogen, Seoul, Korea), with 101-base pair (bp) average read length.

Whole-exome sequencing (WES) was performed in four affected individuals (marked with an asterisk in Figure 1) from the kindred with the most affected members (Kindred 1, with five affected cases; II.4 and II.5 are dizygotic twins).

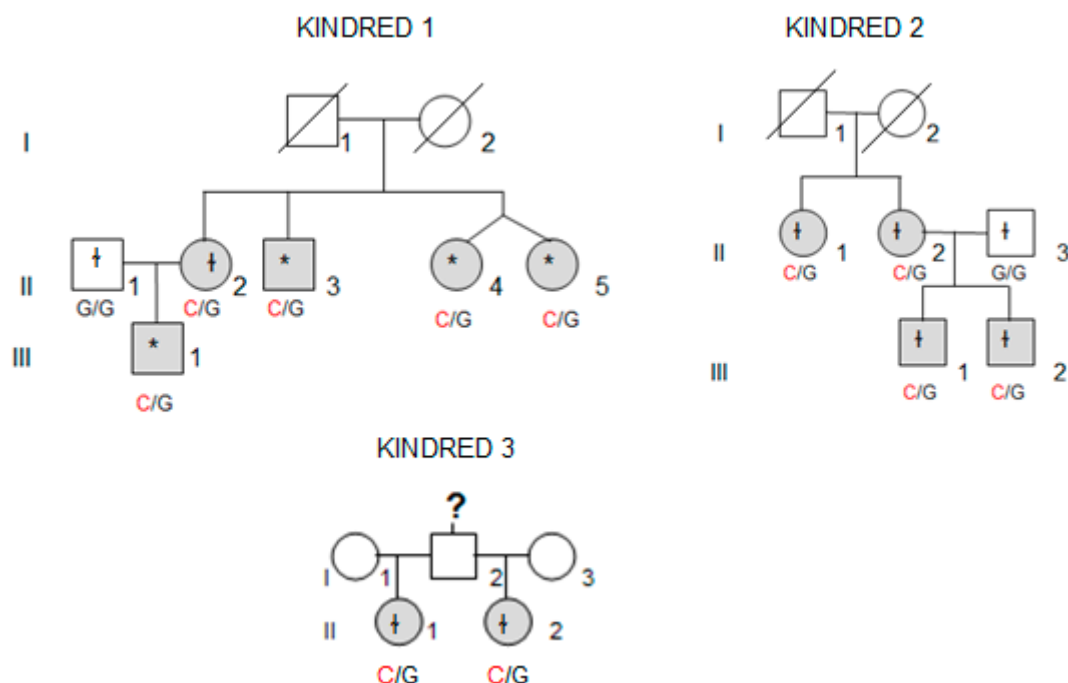


Figure 1. Family pedigrees for Kindreds 1, 2 and 3 and the *NOP53* genotype for each heterozygous mutation (c.91G > C, p. Asp31His). Patients affected by thyroid cancer are shown in grey. The asterisk indicates p. Asp31His variant was observed in whole-exome sequencing (WES) and validated by Sanger sequencing, whereas † indicates that the variant was identified using direct Sanger sequencing.

2.3. Filtering Criteria of Whole-Exome Sequencing Data and Validation

We filtered and identified germline single nucleotide variants (SNVs) and insertions/deletions (INDELS) using HaplotypeCaller and The Genome Analysis Toolkit website [17]. The sequence data was mapped to the human reference genome (GRCh37/hg19) using Burrows–Wheeler Alignment (BWA) method. We used the following filters (Table 1): present in heterozygosity with coverage >20 in all affected members of Kindred 1, present in exonic region, nonsynonymous or frameshift deletion/insertion changes, SIFT score less than 0.05 or not available, Minor Allele Frequency (MAF) in the European Non-Finish population less than 2% in Exome Aggregation Consortium (ExAC) browser and 1000 Genome databases [18,19]; genes described as tumor suppressor genes (TSG) or proto-oncogenes, and present in all affected members in at least another kindred.

We identified five likely pathogenic variants (LPV), but only two were confirmed by Sanger sequencing. These two LPV were then studied in our 45 families (included Kindred 1, to confirm the WES results), and in our own independent control group (100 anonymous subjects from the blood donor bank). For that purpose, PCR, followed by Sanger sequencing, was performed. PCR conditions were as follows: denaturation at 95 °C for 5 min, 10 cycles (95 °C for 1 min, 65–60 °C for 1 min, 72 °C for 1 min), followed by 25 cycles (95 °C for 1 min, 55 °C for 1 min, 72 °C for 1 min) and extension at 72 °C (10 min). Sanger sequencing was performed using the following primers (Sigma–Aldrich, Saint Louis, MO, USA):

NOP53, exon 1. Forward TTGGTGGGAAGCGCAGCTCG
NOP53, exon 1. Reverse TCCAGGAACTGGTCAACCTC
SH3BP1, exon 7. Forward CCCATGTGGTCTGCTGTATG
SH3BP1, exon 7. Reverse AAGAGGCTACGAGGGAATGG

Sequences were analyzed using the CodonCode Aligner software version 7.0. (CodonCode Co., USA).

Table 1. SNVs and INDELs in Kindred 1 by filtering steps of whole-exome sequencing data.

Filter Criteria for Variants	Number of Variants (SNV and INDELs) after Filtering
Total number of variants	90,249
Present in all affected members of the kindred heterozygous; and coverage > 20	244
In exonic regions	118
Nonsynonymous (missense) or frameshift deletion/insertion	87
Deleterious SIFT score less than 0.05 or not available	82
SNVs/ INDELs \leq 2% or not available in ExAC (European Non-Finish) and 1000 Genomes databases	58
Described as TSG or proto-oncogene	5
Confirmed by Sanger sequencing	2
Present in all affected members in at least another kindred	1

SNVs, Single nucleotide variants; INDELs, insertions and deletions; TSG, tumor suppressor gene.

2.4. Cell Culture

Three cell lines were used in this study: TPC1 (papillary thyroid cancer cell line) was obtained from Dr. Nabuo Satoh (Japan). FTC133 (follicular thyroid cancer cell line) was kindly provided by Dr. Peter Goretzki (Germany). BCPAP (female derived, papillary thyroid cancer (PTC) cell line with a *BRAF* V600E and *TP53* D259Y mutations) was purchased from American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA). All cell lines were authenticated by short-tandem repeat profiling. All experiments were done using cell lines between passages P8–P25.

The cell lines were grown and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin and streptomycin (10 u/mL), insulin (10 μ g/mL) and fungizone (250 ng/mL), in a standard humidified incubator, at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere.

2.5. Gene Expression Analysis

Total RNA was extracted from TPC1, FTC133 and BCPAP thyroid cancer cells lines, using TRIzol reagent (Invitrogen, Waltham, MA, USA) and purified using an RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands). For gene expression, 500–1000 ng of total RNA was reverse transcribed using a High Capacity Reverse Transcription cDNA kit (cat no. 4374967; Applied Biosystems, Waltham, MA, USA), and the resulting cDNA was diluted and amplified with specific primers, according to the manufacturer's instructions, using a real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) system (Quant Studio 5; Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). Gene expression levels were normalized using the *GAPDH* gene expression as an endogenous control. Results obtained were analyzed using the $\Delta\Delta$ Ct method with SDS software (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA).

The taqman probes for detecting gene expression of human *NOP53* (Hs00414236_m1, Catalog # 4448892) and internal control *GAPDH* (Hs02786624_g1, Catalog #4331182) were purchased from Thermo Fisher (Waltham, MA, USA). The amplicon length for *NOP53* was 118 bp and it spanned the exon boundary 1–2. The sequence of the probe is proprietary and would not be released.

2.6. Knockdown Studies

We conducted knockdown experiments using two different small interfering RNAs (siRNA) targeting *NOP53* mRNA (cat# s26871 (si#1), cat# s26873 (si#2)) obtained from Ambion (Austin, TX, USA). Cells were reverse transfected in six wells with 50 nmol/L of siRNA, with the use of Lipofectamine RNAiMAX transfection reagent (Life Technologies, Frederick, MD, USA). All functional assays were carried out 48 h post transfection.

2.7. Site-Directed-Mutagenesis and Generation of Stable Cell Lines

The wild type ORF expression clone for *NOP53* gene (NM_015710.4) and the mutant ORF expression clone for *NOP53* gene with p. Asp31His (GAC → CAC) mutation were purchased directly from GeneCopoeia (Rockville, MD, USA). Both the wild type and mutant constructs were cloned in a pReceiver-Lv120 vector, a proprietary of Genecopoeia, Inc. The negative empty control vector (without wild type or mutant sequence) for pReceiver-Lv120 was used as a control for the experiments.

We added 50 ng of plasmid (control, wild type and mutant) into competent *E. Coli* cells following the transformation heat shock protocol. After growing overnight in a 100 µg/mL ampicillin containing LB-agar plate, we picked one colony from each control, wild type, and mutant-transformed cells. We inoculated these colonies into a LB-broth with ampicillin at 37 °C for approximately 24 h, and then we proceeded to isolate the plasmids from the transformed bacteria through Qiagen plasmid protocol (Hilden, Germany).

For the generation of stable control, wild type, and p. Asp31His variant cell lines, TPC1, FTC133 and BCPAP cells were transfected with 2.5 µg of the previously obtained plasmid DNAs in six wells with Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Frederick, MD, USA). After 48 h of transfection, cells were selected with 1 µg/mL of puromycin containing growth medium for two weeks. During the selection of stably transfected cells, fresh growth medium containing the puromycin antibiotic was replaced every two days. After two weeks of selection, the transfected cells were analyzed for overexpression of wild type *NOP53*/ D31H-*NOP53* by real time-quantitative PCR (qPCR) and Western blot.

2.8. Clonogenicity and Proliferation Studies

We performed clonogenicity and proliferation assays using (a) the transient knockdown of wild type *NOP53* 48 h after transfection, and (b) the stable wild type and p. Asp31His variant overexpression, in TPC1, FTC133 and BCPAP cell lines. For the proliferation assay, 48 h after transfection, 200 cells/well were plated in quadruplets in six 96-well plates, and incubated at 37 °C in the previously described medium. Starting the following day, and every 24 h, one plate was frozen at −80 °C (from day 1 until day 6). After one week, the proliferation assay was performed with the six plates, using the Cyquant Cell Proliferation Kit with the manufacturer's protocol (Invitrogen, Waltham, MA, USA). Fluorescence was measured using a Spectramax i3X, and cell proliferation was expressed as the number of cells, or fold change in number of cells normalizing by seeding at day 1. For clonogenicity assays, 48 h after transfection, cells were split and seeded onto the 6 well plates in duplicates. Prior to seeding the cells, the 6 well plates were coated with a previously autoclaved 0.1% gelatin in phosphate buffered saline (PBS). After 30 min, gelatin solution was aspirated and the cells were then plated. For TPC1, FTC133 and BCPAP, 600 cells were seeded and incubated at 37 °C for 7–15 days. The cells were fixed with 4% Paraformaldehyde (PFA) for 20 min and then stained with 0.05% crystal violet for 30 min. Images of the cells were captured using microscopy.

2.9. Western Blot Analysis

RIPA buffer was used for lysis of cultured cells. The protein concentration in samples/lysates was measured using The Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). Total protein lysates (25 µg for TPC1 cell line; or 30 µg in the case of FTC133 and BCPAP cell lines) were subjected to sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), transferred to nitrocellulose membranes, and immunostained overnight at 4 °C, using the antibody of interest. Anti-*NOP53* (1:1.000, #73225) was purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Anti-human β-actin (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) was used as a loading control. Membranes were incubated with appropriate secondary horseradish peroxidase conjugated IgG (anti-rabbit 1:3.000, Cell Signaling Technology; or anti-mouse 1:3.000, Santa Cruz Biotechnology). To prevent non-specific background binding of the primary and/or secondary antibodies to the membrane, we used 5% Bovine serum albumin (BSA) in 10× Tris Buffered Saline (TBS) with 0.1% Tween-20 for 60 min, as a blocking

solution. Proteins were detected using enhanced chemiluminescence (ECL, Pierce Biotechnology, Waltham, MA, USA).

2.10. Tissue Samples

We collected tissue samples from the four affected members of Kindred 2 (Figure 1), after informed consent. All diagnoses were evaluated and confirmed by an Anatomical Pathology Consultant in thyroid cancer.

2.11. Immunohistochemistry Studies

We collected tumor samples from the four affected family members in Kindred 2 (Figure 1), containing both tumoral tissue and histologically normal tissue adjacent to the thyroid cancer. Tumor tissue samples were formalin fixed, embedded in paraffin, and 5-micron thick sections, that included both tumor and adjacent normal thyroid tissue, were cut for immunostaining. Sections were deparaffinized using standard procedures and immunostaining was performed using Dako EnVision kits, according to the manufacturer's protocol (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Primary anti-NOP53 rabbit monoclonal antibody was used at 1:200 dilution and incubated overnight at 4 °C (ab131002, antigen: synthetic peptide- aa 380–429; (Abcam, Cambridge, UK). The entire slides were magnified 200× using a ScanScope XT digital slide scanner and viewed using ImageScope software (Aperio Technologies, Vista, CA, USA). Manual counting of staining intensities in tumor tissue relative to control—the adjacent histologically normal thyroid tissue—was performed using the image processing package ImageJ [20].

2.12. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 7.0 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). An unpaired student t-test was used for comparison between groups and analysis of variance for multiple group comparison. Values are shown as mean ± standard error of the mean (SEM) or mean ± standard deviation (SD). Asterisks denote the following significance levels: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

3. Results

3.1. Whole Exome Sequencing and Identification of a Variant in NOP53

We performed WES using peripheral blood DNA from four affected individuals from a kindred, with five cases of nonsyndromic FNMTc (Kindred 1). We did not find mutations in: genes previously described in syndromic FNMTc (*APC*, *PTEN*, *WRN*, *DICER1* and *PRKAR1A*), rearranged genes (*NTRK*, *PPARG*), DNA repair genes (*XRCC1*, *XRCC3*), genes involved in the development of the thyroid gland (*PAX8*, *JAG1*, *CDC42*, *GSTM1*, *GSTT1*, *SRGAP1*, *TERT*, *THRB*, *AKT1*, *SEC23B*, *ESR2*, *NKX2*, *TBL1X*), genes previously described in the literature in nonsyndromic FNMTc (*HABP2*, *TTF1*, *THADA*, *SEC23B*, *FOXO1*, *KLLN*, *MAP2K5*), oncogenes (*RET*, *MET*, *KIT*, *MERTK*), nor genes that have been found in TC with somatic mutations (*BRAF*, *NRAS*, *TP53*, *CDKN2A*, *ALK*, *ATF4*).

We executed stringent filtering criteria (Table 1) to identify SNVs and INDELS that segregated with all the affected members from Kindred 1, identifying 58 variants. Five out of the 58 were in genes described as tumor-suppressor genes or proto-oncogenes in the literature, or genes possibly involved in cancer pathways. These five variants, located in different genes, were selected for further analysis. After Sanger sequencing, only two variants were confirmed: p. Thr190Met in *SH3BP1*; and p. Asp31His in *NOP53* (also known as *GLTSCR2*). The three remaining predicted changes were located in repetitive sequences in exonic flanking regions, but they were not confirmed by Sanger. The two final variants were studied by Sanger sequencing in 44 additional families with FNMTc (37 with two affected members, and seven with three or more affected members), as well as in an independent control group of 100 subjects.

The variant p. Thr190Met in *SH3BP1* is described in the non-Finnish European population with an allele frequency of 0.007. We did not find this variant in any other kindred, but it was present in 3% of our control group (100 anonymous samples from blood donation bank), so we discarded it due to the high frequency in our population (>2%).

We found the c.91G > C; p. Asp31His (D31H) variant (dbSNP: rs78530808) in *NOP53* gene (Figure 2). This variant was present in heterozygosis and segregated with all affected members in three families (Figure 1): in Kindred 1 (five out of five affected members), in Kindred 2 (four out of four), and in Kindred 3 (two out of two). This variant was not present in the non-affected (NA) spouse control II.1 (Kindred 1), nor in the NA spouse control II.3 (Kindred 2), who did not have any thyroid problem. This variant has been reported in ExAC, with an MAF of 1.8% in the European non-Finnish population. The Asp31 position is well-conserved across different species (Figure 3).

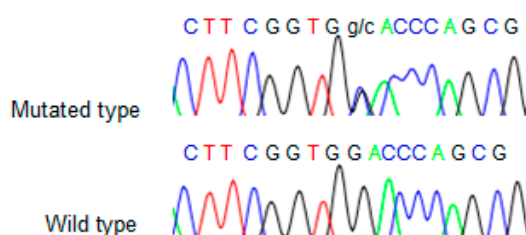


Figure 2. Sequence obtained from Sanger sequencing from one representative wild type and mutant sample.



Figure 3. Protein domain architecture of *NOP53* (GLTSCR2) and conservation of the p.Asp31 position across species. The red frame highlights the amino acid aspartic acid (D) at position 31.

We also checked the predicted effect of this variant in additional “in silico” algorithms (PolyPhen-2, mutation-taster), obtaining a probable damaging effect result in both (0.936 and 0.999 respectively). We also validated this variant by Sanger sequencing in our control population, and we found it with an allele frequency of 1.5% in our database (three out of 200 alleles presented the variant). None of the family members in Kindreds 1, 2 and 3 had a history of other primary cancers or clinical features suggestive of a syndromic FNMTC (Table 2).

Finally, we decided to study the functional role of *NOP53* gene and the identified p. Asp31His variant.

3.2. Knockdown of *NOP53* Using siRNAs Reduces Cell Proliferation and Clonogenicity

In order to understand the role of *NOP53* in TC cell lines, we performed functional studies upon transient knockdown experiments using siRNAs in these three TC cell lines. We validated the knockdown efficiency by qPCR and Western blot, both of which showed a significant decrease in *NOP53* mRNA and protein expression (Figure 4, panels a and b, respectively). We also observed that knockdown of wild-type *NOP53* resulted in a significant reduction in cell proliferation and colony formation compared to the scrambled control. Accordingly, these results suggest that the suppression of *NOP53* reduces the growth in all the three tested cell lines (Figure 4, panels c, d).

Table 2. Clinical characteristics, pathological findings, and treatment in familial non-medullary thyroid cancer (FNMTc) affected members from Families 1, 2 and 3.

Kindred	K1	K1	K1	K1	K1	K1	K2	K2	K2	K2	K2	K2	K3	K3
Patient	Patent II.2	Patent II.3	Patent II.4	Patent II.5	Patent III.1	Patent II.1	Patent II.2	Patent III.1	Patent III.2	Patent II.1	Patent II.2	Patent III.1	Patent III.2	Patent II.1
Index Case	No	Yes	No	No	No	No	Yes	No	No	Yes	No	No	No	Yes
Age at Diagnosis	53	57	51	50	36	41	37	30	24	35	34			
Presentation	Toxic MNG	MNG	MNG	Toxic MNG	Nodule on US screening	Thyroid nodule	Thyroid nodule	Thyroid nodule	Nodule on US screening	Thyroid nodule	Thyroid nodule	Nodule on US screening	Thyroid nodule	Thyroid nodule
Histology	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	Hürthle cell carcinoma	PTC
Multicentricity	No	No	Yes	No	Yes	No	No	No	Yes	No	Yes	No	No	Yes
Bilateralism	No	No	Yes	No	Yes	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Local Invasion	No	Yes	Yes	No	Yes	No	Yes	No	No	No	No	No	No	Yes
Stage ¹ (TNM)	T1N0M0	T1N0M0	T2N0M0	T1N0M0	T1aN1bM0	T1N0M0	T2N0M0	T2N0M0	T2N0M0	T2N0M0	T2N0M0	T2N0M0	T2N0M0	T1N1M0
Surgery	TT + LN dissection	TT + LN dissection	TT + LN dissection	TT + LN dissection	TT + LN dissection	TT + LN dissection	TT + LN dissection	TT + LN dissection	TT + LN dissection	TT + LN dissection	TT + LN dissection	TT + LN dissection	TT + LN dissection	TT + LN dissection
Radioiodine Ablation (mCu)	Yes (311)	Yes (199)	Yes (118)	Yes (113)	Yes (28)	Yes (100)	Yes (300)	Yes (100)	Yes (100)	Yes (100)	Yes (100)	Yes (100)	Yes (unknown)	Yes (unknown)
Radiotherapy	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Disease Status ²	NED	NED	NED	NED	NED	NED	NED	NED	NED	NED	NED	NED	NED	NED

US, Ultrasound; PTC, Papillary-thyroid cancer; TT, Total thyroidectomy; LN, Lymph node; NED, No Evidence of Disease; MNG, Multinodular Goiter. ¹ Staging was based on the tumor-node-metastasis (TNM) classification of the American Joint Committee on Cancer 2016. ² Disease status was assessed based on follow-up cervical ultrasonography, radioiodine scanning, and the stimulated serum thyroglobulin level.

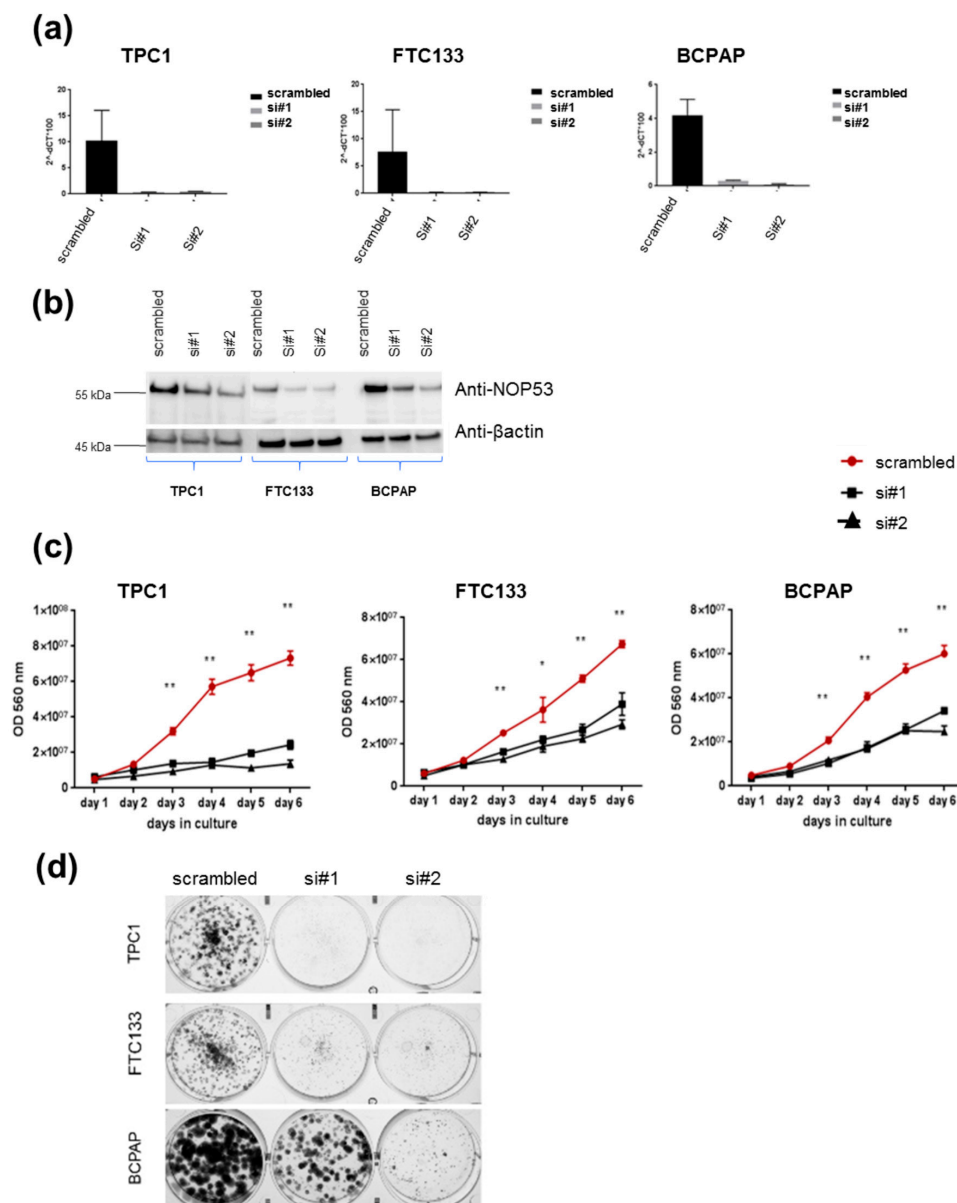


Figure 4. Knockdown of wild-type *NOP53* reduces cell proliferation and clonogenicity: (a) Validation of two different siRNAs (si#1 and si#2) targeting *NOP53* gene expression in three different thyroid cancer cell lines (TPC1, FTC133 and BCPAP) using qPCR; (b) Validation of two different siRNAs (si#1 and si#2) targeting *NOP53* protein expression in three different thyroid cancer cell lines (TPC1, FTC133 and BCPAP) using Western blots. The total protein lysates used were 25 μ g for TPC1 cell line; and 30 μ g for FTC133 and BCPAP cell lines. GAPDH and β -actin were used as an internal and loading control for qPCR and Western blot, respectively; (c) Transient knockdown of *NOP53* in three different cell lines with two siRNAs significantly reduced cell proliferation compared to negative control (scrambled), suggesting a proto-oncogenic function of *NOP53*; (d) Transient knockdown of *NOP53* in three different cell lines with two siRNAs significantly reduced cell clonogenicity compared to negative control (scrambled), suggesting a proto-oncogenic function of *NOP53*. * indicates adjusted *p* value < 0.05 compared to control. ** indicate adjusted *p* value < 0.01 compared to control. Error bars indicate standard deviation.

3.3. Overexpression of *NOP53* Increases Cell Proliferation and Clonogenicity

We investigated the effect of overexpression through transfection of wild type *NOP53* gene and the p. Asp31His variant in the three cell lines. We confirmed the overexpression by qPCR and Western

blot (Figure 5, panels a,b). Overexpression of *NOP53* significantly increased cell proliferation and colony formation in all three cell lines, compared to the empty-vector control, supporting a growth promoting role, which is consistent with the mentioned knockdown results (Figure 5, panels c,d). However, we did not detect significant differences in cell proliferation and clonogenicity between transfected *NOP53* wild-type and transfected p. Asp31His variant, except in FTC133 and BCPAP cell lines, where we observed more clones in transfected p. Asp31His cells.

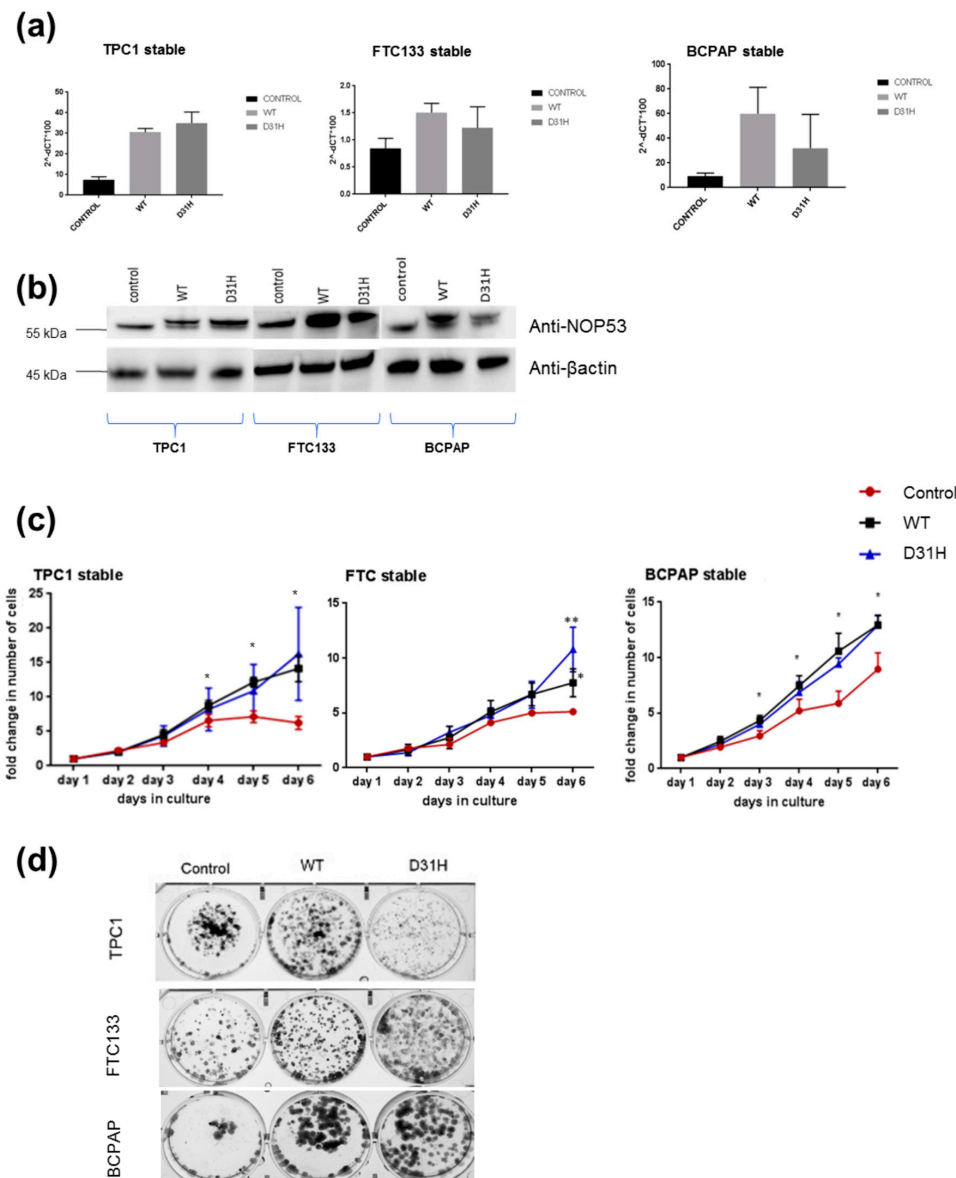


Figure 5. Effects of stable overexpression of *NOP53* in three cell lines (TPC1, FTC133, BCPAP): (a) Validation of stable overexpression of wild type (WT) and D31H mutant *NOP53* in three cell lines by qPCR; (b) Validation by Western blot. The lower band corresponds to the endogenous protein expression, whereas the upper band represents the exogenous overexpressed protein. The total protein lysates used were 25 μ g for TPC1 cell line, and 30 μ g for FTC133 and BCPAP cell lines. GAPDH and β -actin were used as an internal and loading control for qPCR and Western blot, respectively; (c) Overexpression of WT and D31H mutant *NOP53* significantly increased the cell proliferation in thyroid cancer cell lines compared to the vector control; (d) Overexpression of WT and D31H mutant *NOP53* significantly increased the cell clonogenicity in thyroid cancer cell lines compared to the vector control. * indicates adjusted *p* value < 0.05 compared to control. ** indicate adjusted *p* value < 0.01 compared to control. Error bars indicate standard deviation.

3.4. NOP53 Immunohistochemistry in Tumor Samples

We also analyzed NOP53 protein expression in tumor samples from the four affected family members in Kindred 2 using immunohistochemistry, as described previously. We noted that the tumor tissue from the samples showed more staining intensity and, therefore, higher expression of NOP53, compared to adjacent normal thyroid tissue—e.g., cells located amongst thyroid follicles—and negative controls (Figure 6, panels a–d). These findings suggest that NOP53 may be overexpressed in tumor tissue of patients with FNMTc.

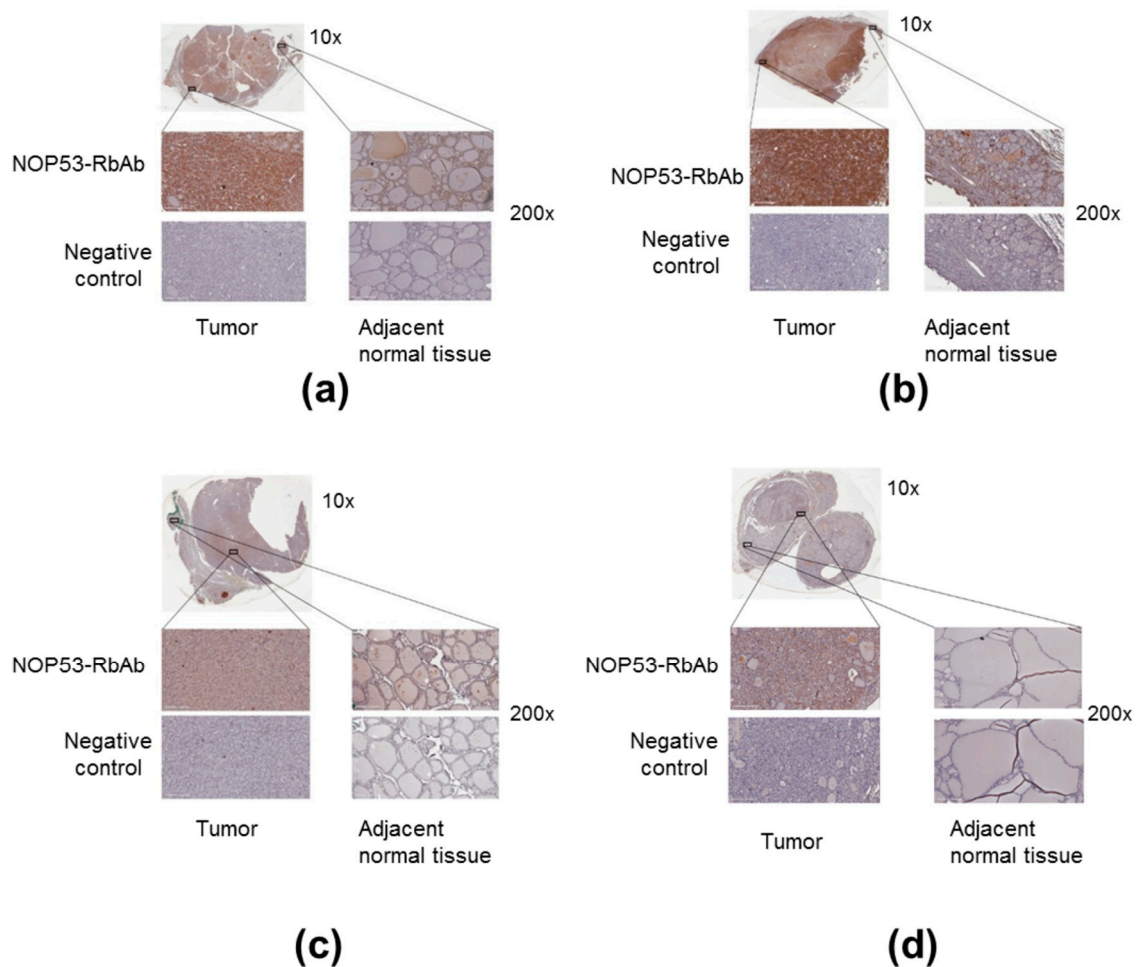


Figure 6. Overexpression of NOP53 in tumors from patients with FNMTc. Panels A through D show representative immunohistochemical staining for NOP53 in thyroid cancer samples from the four affected members of Kindred 2: (a) Corresponds to Patient III.1.; (b) Patient II.2.; (c) Patient III.2.; and (d) Patient II.1. Each panel contains an inlet (zoom 10×); two separate regions—from tumor tissue and adjacent normal thyroid tissue—of higher magnification images (zoom 200×); and two higher magnification images (zoom 200×) from a negative control specimen at a similar location. The top left represents tumor staining with NOP53-RbAb, the top right shows adjacent normal tissue staining with NOP53-RbAb, and the two bottom images are negative controls. We observed that the tumor tissue showed a higher expression of NOP53 compared to the adjacent normal thyroid tissue in the four patients studied.

4. Discussion

Several genes have been suggested to be implicated in non-syndromic FNMTc, however, until now, the results have not been conclusive or reproducible in additional families or studies [6,21,22]. We selected a kindred with five FNMTc-affected members (Kindred 1) to perform WES. We focused

on variants with a predictable effect on the protein, that segregated with all affected members of the kindred, and was not present in spouse controls. We selected a population prevalence cut-off that was higher than the usual ($\leq 2\%$), because the frequencies described in the general population do not always correlate with the real frequencies in our population, thus, we wanted to be more permissive with this filtering step, in order to not rule out possible interesting variants. We rigorously checked for each variant candidate, to find the real allele frequency in our control group. We also selected the variants that were present in genes described before in the literature as involved in cancer, because there were more chances they were implicated in thyroid cancer. Nevertheless, we cannot completely exclude the potential of the discarded variants, that were not studied further in the development of FNMTTC. Establishing these filters makes the use of exome data biased, which would limit our study.

We only found the candidate variant c.91G > C; p. Asp31His in *NOP53* gene to accomplish every filtering criteria, and it was present in all affected members of three different families with nonsyndromic FNMTTC.

NOP53 gene is located in 19q13.33. It encodes a nucleolar protein which is involved in ribosome biogenesis [23]. It regulates the activation of p53/*TP53* in response to ribosome biogenesis perturbation, DNA damage and other stress conditions [24]. The participation of *NOP53* in the maintenance of nuclear morphology, chromosomal stability and mitotic integrity during nuclear division has been described, suggesting that *NOP53* expression may be a critical event in carcinogenesis [25]. It has been theorized that *NOP53* function depends on the cell type. Thus, several studies suggest that *NOP53* may have a tumor-suppressive function, since its expression was downregulated in renal cell carcinomas, and brain and breast cancer [26]. In contrast, high *NOP53* expression was associated with poor prognosis in colon and esophageal cancers, suggestive of a growth-promoting or oncogenic function [27]. Interestingly, it has already been reported that *NOP53* (*GLTSCR2*) had higher expression in aggressive follicular carcinomas than in non-aggressive ones [28]. Among its main related pathways is PI3K/AKT signaling, and this pathway, together with the RAF/RAS/MEK/ERK signaling pathway, are the most commonly activated in thyroid cancer, leading to cancer initiation and/or progression [29].

NOP53 gene is well conserved between different species, particularly the aspartic amino acid at position 31 (Figure 3), suggesting that variants in that position may have a deleterious effect. In addition, three “in silico” mutation algorithms—SIFT, PolyPhen-2, and mutation-taster—qualify this variant as probably damaging. This change is described in the non-Finish European population in ExAC and in The Genome Aggregation Database (gnomAD) v2.1 (non-cancer) with an allele frequency of 1.8%, and all the subjects in our study were Southern European. In our 100 person control group the variant appeared with an allele frequency of 1.5% (3/200). Hence, we have found an enrichment in families with FNMTTC, compared to the general population or our control sample; it was observed in 6.7% of our families (3/45). Despite the high frequency of this variant in the general population, we have demonstrated that it co-segregates in all affected members of the three families, and it is not present in spouse controls. Furthermore, we calculated the likelihood of a random association between this mutation and thyroid affected patients, when considering the three families together, to be approximately 2 out of 1000 (1/512).

In our knockdown experiments (Figure 4, panels c, d), we observed that, when we knock down *NOP53*, cell proliferation and clonogenicity clearly decrease, suggesting an oncogenic behaviour of *NOP53* in the three cell lines. In the overexpression experiments (Figure 5, panel c), we observed in the three cell lines that the wild-type and the mutant proliferate significantly more than the control, without significant differences between the wild-type and the mutant themselves. Thus, we hypothesize that, more than the specific p. Asp31His variant, *NOP53* may have an oncogenic role in thyroid cancer, and that this variant could be a mild-oncogenic mutation that has little surplus mitogenic effect when this gene is overexpressed. We should consider that not all the mutations present in a proto-oncogene are highly oncogenic. It is well known that the p. Val804M *RET* mutation, present in heterozygosis in the *RET* proto-oncogene, is rarely causative of medullary thyroid carcinoma, presenting high penetrance only when it is present in homozygosis [30]. A similar situation has been recently reported, implying a

mild gain-of-function mutation in the *CaSR* gene [31]. If we assume that the p. Asp31His mutation is a mild gain-of-function mutation, it would only present its oncogenic potential if other genetic variants are present, representing a risk factor for the development of FNMTC.

Moreover, our immunochemistry studies (Figure 6) showed that NOP53 was overexpressed in tumor, as compared to adjacent normal tissue. In The Human Protein Atlas database [32], we found that, for NOP53 (GLTSCR2), the immunohistochemical staining in normal thyroid gland is mainly found in glandular cells, and with a medium antibody staining. By contrast, in our study, we observed that the tumor tissue from the affected samples showed higher expression of NOP53 (intense staining), compared to adjacent normal thyroid tissue.

Altogether, our functional studies are consistent with an oncogenic function of *NOP53* in TPC1, FTC133 and BCPAP cell lines. We hypothesize that the *NOP53* gene could be involved in FNMTC, with an oncogenic role when presented in association with other genetic events in a polygenic scenario, and that p. Asp31His variant, and perhaps others in *NOP53*, may be mild mutations with no high penetrance, acting as a risk factor for development of TC. For example, the penetrance of *BRCA2* mutations in males is about 6% [33], therefore, it cannot be considered causative, but it multiplies the risk of developing the neoplasm. We have to remember that in most hereditary cancers, the number of high penetrance causative genes is usually only two or three—e.g., *BRCA1* and *BRCA2* in breast cancer, or *APC*, *MLH1* and *MSH2* in colon cancer—but many studies have tried unsuccessfully to discover a causative gene with a high penetrance for FNMTC. This could be because it is mainly a polygenic hereditary entity, and, in this context, it would be feasible that *NOP53* has an oncogenic role in some (but not all) families with FNMTC.

In conclusion, our findings suggest that *NOP53* could be a candidate modifier locus for FNMTC, although more studies are needed to deduce if the p. Asp31His variant or other variants are present in more families affected with FNMTC, as well as the pathways in which *NOP53* is involved in thyroid cancer. We think that our findings are interesting, as they can open research of the potential oncogenic role of *NOP53* in FNMTC for the first time, improving our understanding of the genetic mechanisms underlying this disease. However, we should consider that, as well as the *NOP53* gene, other genes are most likely involved in FNMTC.

Author Contributions: Conceptualization was mainly developed by E.K. and J.O.; Methodology was performed by A.O. and S.K.G.; Validation proceedings by A.O. and S.K.G.; Formal Analysis was done by A.O. and S.K.G.; Investigation was mainly performed by A.O. and S.K.G.; Resources acquired in restrict collaboration by E.K. and J.O.; Data Curation, J.O.; Writing—Original Draft Preparation, A.O.; Writing—Review and Editing, S.K.G., M.M., I.H., S.M., R.A., E.K. and J.O.; Visualization has been prepared by A.O.; Supervision of this project J.O.; Project Administration, M.M. and J.O.; Funding Acquisition, A.O., M.M., I.H. and J.O.

Funding: This research was funded by The Catalan Society of Endocrinology and Nutrition (Fellowship 2015/2016), Hospital Clínic de Barcelona (End-of-Residence Award 2016/2017), and The Spanish Society of Endocrinology and Nutrition (Beca Morreale-Escobar 2017/2018). We had the collaboration of the Intramural Research Program of the Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD (USA).

Acknowledgments: We are grateful to the patients and their families for their participation; and to their physicians for providing samples and clinical histories: F.Hanzu, J.Blanco, A. de Hollanda, and E.Ortega (H.Clínic); S.Chicharro (H.Mollet); C.Villabona, J.Otero, and A.Simó (H. Bellvitge); M.C.Vilardell, and A.M.Gutiérrez (H.Manresa); E.Pizarro (H.Mataró); A.Sitges (H.Mar); C.Zafón, and A.Ortiz (H.Vall d’Hebron); P.Casano (H. San Joan de Déu); J.J.Diez and P. Iglesias (H. Ramón y Cajal); J.Biarnés, and M.Recasens (H.Trueta); R.Casañ (H. de Xàtiva); B. León (H.de la Plana); J.L.Reverter (H.Germans Trias i Pujol) and C. Quirós (H. Mútua de Terrassa).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Sahasrabudhe, R.; Stultz, J.; Williamson, J.; Lott, P.; Estrada, A.; Bohorquez, M.; Palles, C.; Polanco-Echeverry, G.; Jaeger, E.; Martin, L.; et al. The HABP2 G534E variant is an unlikely cause of familial non-medullary thyroid cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2016**, *10*, 1098–1103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

2. Moses, W.; Weng, J.; Kebebew, E. Prevalence, clinicopathologic features, and somatic genetic mutation profile in familial versus sporadic nonmedullary thyroid cancer. *Thyroid* **2011**, *21*, 367–371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Rowland, K.J.; Moley, J.F. Hereditary thyroid cancer syndromes and genetic testing. *J. Surg. Oncol.* **2015**, *111*, 51–60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Kebebew, E. Hereditary non-medullary thyroid cancer. *World J. Surg.* **2008**, *32*, 678–682. [[CrossRef](#)]
5. Vriens, M.R.; Suh, I.; Moses, W.; Kebebew, E. Clinical features and genetic predisposition to hereditary non-medullary thyroid cancer. *Thyroid* **2009**, *19*, 1343–1349. [[CrossRef](#)]
6. Hińcza, K.; Kowalik, A.; Kowalska, A. Current knowledge of germline genetic risk factors for the development of non-medullary thyroid cancer. *Genes* **2019**, *10*, 482. [[CrossRef](#)]
7. Wang, X.; Cheng, W.; Li, J.; Su, A.; Wei, T.; Liu, F.; Zhu, J. Familial nonmedullary thyroid carcinoma is a more aggressive disease: A systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Endocrinol.* **2015**, *172*, R253–R262. [[CrossRef](#)]
8. Charkes, N.D. On the prevalence of familial nonmedullary thyroid cancer in multiply affected kindreds. *Thyroid* **2006**, *16*, 181–186. [[CrossRef](#)]
9. Malchoff, C.; Sarfarazi, M.; Tendler, B.; Forouhar, F.; Whalen, G.; Joshi, V.; Arnold, A.; Malchoff, D. Papillary thyroid carcinoma associated with papillary renal neoplasia: genetic linkage analysis of a distinct heritable tumor syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2000**, *85*, 1758–1764. [[CrossRef](#)]
10. Suh, I.; Filetti, S.; Vriens, M.; Guerrero, M.; Tumino, S.; Wong, M.; Shen, W.; Kebebew, E.; Duh, Q.; Clark, O. Distinct loci on chromosome 1q21 and 6q22 predispose to familial nonmedullary thyroid cancer: A SNP array-based linkage analysis of 38 families. *Surgery* **2009**, *146*, 1073–1080. [[CrossRef](#)]
11. Gudmundsson, J.; Sulem, P.; Gudbjartsson, D.; Jonasson, J.; Sigurdsson, A.; Bergthorsson, J.; He, H.; Blondal, T.; Geller, F.; Jakobsdottir, M.; et al. Common variants on 9q22.33 and 14q13.3 predispose to thyroid cancer in European populations. *Nat. Genet.* **2009**, *41*, 460–464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Gara, S.K.; Jia, L.; Merino, M.; Agarwal, S.; Zhang, L.; Cam, M.; Patel, D.; Kebebew, E. Germline HABP2 mutation causing familial nonmedullary thyroid cancer. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 448–455. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Ye, F.; Gao, H.; Xiao, L.; Zuo, Z.; Liu, Y.; Zhao, Q.; Chen, H.; Feng, W.; Fu, B.; Sun, L.; et al. Whole exome and target sequencing identifies MAP2K5 as novel susceptibility gene for familial non-medullary thyroid carcinoma. *Int. J. Cancer* **2018**, *144*, 1321–1330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Pereira, J.; da Silva, J.; Tomaz, R.; Pinto, A.; Bugalho, M.; Leite, V.; Cavaco, B. Identification of a novel germline foxe1 variant in patients with familial non-medullary thyroid carcinoma (FNMTTC). *Endocrine* **2015**, *49*, 204–214. [[CrossRef](#)]
15. Weeks, A.L.; Wilson, S.G.; Ward, L.; Goldblatt, J.; Hui, J.; Walsh, J.P. HABP2 germline variants are uncommon in familial nonmedullary thyroid cancer. *BMC Med. Genet.* **2016**, *17*, 60. [[CrossRef](#)]
16. Colombo, C.; Fugazzola, L.; Muzza, M.; Proverbio, M.; Cirello, V. Letter regarding the article: “Multiple HABP2 variants in familial papillary thyroid carcinoma: Contribution of a group of “thyroid-checked” controls” by Kern et al. *Eur. J. Med. Genet.* **2018**, *61*, 104–105. [[CrossRef](#)]
17. Broad Institute. GATK|Home. Version 3.4.0. Available online: http://www.broadinstitute.org/gsa/wiki/index.php/The_Genome_Analysis_Toolkit (accessed on 15 May 2017).
18. ExAC Browser. Available online: <http://exac.broadinstitute.org> (accessed on 20 August 2017).
19. 1000 Genomes|A Deep Catalog of Human Genetic Variation. Available online: <http://www.internationalgenome.org/home> (accessed on 20 August 2017).
20. ImageJ. Available online: <https://imagej.net/Welcome> (accessed on 20 May 2018).
21. Peiling, S.; Ngeow, J. Familial non-medullary thyroid cancer: Unraveling the genetic maze. *Endocr. Relat. Cancer.* **2016**, *23*, 577–595. [[CrossRef](#)]
22. Valdes-Socin, H.; Palmeira, L.; Burlacu, M.C.; Daly, A.F.; Bours, V.; Beckers, A. A familial non medullary thyroid carcinoma (FNMTTC): Clinical and genetic update. *Rev. Med. Liege* **2016**, *71*, 557–561.
23. Sloan, K.E.; Bohnsack, M.T.; Watkins, N.J. The 5S RNP couples p53 homeostasis to ribosome biogenesis and nucleolar stress. *Cell Rep.* **2013**, *5*, 237–247. [[CrossRef](#)]
24. Kim, J.Y.; Seok, K.O.; Kim, Y.J.; Bae, W.K.; Lee, S.; Park, J.H. Involvement of GLTSCR2 in the DNA damage response. *Am. J. Pathol.* **2011**, *179*, 1257–1264. [[CrossRef](#)]

25. Lee, S.; Ahn, Y.M.; Kim, J.Y.; Cho, Y.E.; Park, J.H. Downregulation of NOP53 ribosome biogenesis factor leads to abnormal nuclear division and chromosomal instability in human cervical cancer cells. *Pathol. Oncol. Res.* **2018**, *13*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Moon, A.; Lim, S.J.; Jo, Y.H.; Lee, S.; Kim, J.Y.; Lee, J.; Park, J.H. Downregulation of GLTSCR2 expression is correlated with breast cancer progression. *Pathol. Res. Pract.* **2013**, *209*, 700–704. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Sasaki, M.; Kawahara, K.; Nishio, M.; Mimori, K.; Kogo, R.; Hamada, K.; Itoh, B.; Wang, J.; Komatsu, Y.; Yang, Y.; et al. Regulation of the MDM2-P53 pathway and tumor growth by PICT1 via nucleolar RPL11. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 944–951. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Williams, M.D.; Zhang, L.; Elliott, D.D.; Perrier, N.D.; Lozano, G.; Clayman, G.L.; El-Naggar, A.K. Differential gene expression profiling of aggressive and nonaggressive follicular carcinomas. *Hum. Pathol.* **2011**, *42*, 1213–1220. [[CrossRef](#)]
29. Kotian, S.; Zhang, L.; Boufraqueh, M.; Gaskins, K.; Gara, S.; Quezado, M.; Nilubol, N.; Kebebew, E. Dual inhibition of HDAC and tyrosine kinase signaling pathways with CUDC-907 inhibits thyroid cancer growth and metastases. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23*, 5044–5054. [[CrossRef](#)]
30. Loveday, C.; Josephs, K.; Chubb, D.; Gunning, A.; Izatt, L.; Tischkowitz, M.; Ellard, S.; Turnbull, C. p.Val804Met, the most frequent pathogenic mutation in RET, confers a very low lifetime risk of medullary thyroid cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2018**, *103*, 4275–4282. [[CrossRef](#)]
31. Cavaco, B.; Canaff, L.; Nolin-Lapalme, A.; Vieira, M.; Silva, T.; Saramago, A.; Domingues, R.; Rutter, M.; Hudon, J.; Gleason, J.; et al. Homozygous calcium-sensing receptor polymorphism R544Q presents as hypocalcemic hypoparathyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2018**, *103*, 2879–2888. [[CrossRef](#)]
32. The Human Protein Atlas. Available online: [17/www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org) (accessed on 15 July 2018).
33. Evans, D.G.; Susnerwala, I.; Dawson, J.; Woodward, E.; Maher, E.R.; Lalloo, F. Risk of breast cancer in male BRCA2 carriers. *J. Med. Genet.* **2010**, *47*, 710–711. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ORIGINAL 2



Lack of Mutations in *POT1* Gene in Selected Families with Familial Non-Medullary Thyroid Cancer

Aida Orois^{1,2} · Celia Badenas^{3,4,5} · Jordi L. Reverter⁶ · Verónica López^{3,4,5} · Miriam Potrony^{3,4,5} · Mireia Mora^{1,4,7,8} · Irene Halperin¹ · Josep Oriola^{3,4,7}

Received: 24 December 2019 / Accepted: 4 March 2020
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

To date, the genes involved in familial non-medullary thyroid cancer (FNMTc) remain poorly understood, with the exception of syndromic cases of FNMTc. It has been proposed that germline mutations in telomere-related genes, such as *POT1*, described in familial melanoma might also predispose individuals to thyroid cancer, requiring further research. We aimed to identify germline mutations in *POT1* in selected FNMTc families (with at least three affected members) without a history of other cancers or other features, and to describe the clinical characteristics of these families. Sequencing of the 5'UTR and coding regions of *POT1* was performed in seven affected people (index cases) from seven families with FNMTc. In addition, we performed whole-exome sequencing (WES) of DNA from 10 affected individuals belonging to four of these families. We did not find germline variants of interest in *POT1* by Sanger sequencing or WES. We neither found putative causative mutations in genes previously described as candidate genes for FNMTc in the 4 families studied by WES. In our study, no germline potentially pathogenic mutations were detected in *POT1*, minimizing the possibilities that this gene could be substantially involved in non-syndromic FNMTc.

Keywords *POT1* · Germline · Telomere · Familial non-medullary thyroid cancer

Introduction

Thyroid cancer (TC) is one of the most frequent cancers, and its prevalence is increasing in the last years [1]. TC may originate from follicular or parafollicular cells, referred as non-medullary thyroid carcinoma (NMTC) or medullary thyroid carcinoma (MTC), respectively. A majority of thyroid cancer cases (80–90%) originate from follicular cells, and 3–9% of them present first-degree relatives with NMTC [2, 3].

Familial non-medullary thyroid cancer (FNMTc) is defined by the presence of thyroid cancer originating from follicular cells in two or more first-degree relatives, in the absence of predisposing environmental factors. Five percent of all FNMTc cases are syndromic and the susceptibility genes involved in syndromic FNMTc are known: *APC* in familial adenomatous polyposis (MIM: 175100), *PTEN* in Cowden's disease (MIM: 158350), *PRKARIA* in Carney complex type 1 (MIM: 160980), *WRN* in Werner's syndrome (MIM: 277700),

✉ Aida Orois
aorois@clinic.cat

¹ Department of Endocrinology and Nutrition, ICMDM, Hospital Clínic de Barcelona, C/Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain

² Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Universitari Mútua de Terrassa, 08221 Terrassa, Spain

³ Department of Biochemistry and Molecular Genetics, CDB, Hospital Clínic de Barcelona, 08036 Barcelona, Spain

⁴ Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain

⁵ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), 28029 Madrid, Spain

⁶ Department of Endocrinology and Nutrition, Germans Trias i Pujol Health Science Research Institute and Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, 08196 Badalona, Spain

⁷ Faculty of Medicine, University of Barcelona, 08007 Barcelona, Spain

⁸ Centro de Investigación Biomédica en Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), 28029 Madrid, Spain

and *DICER1* in the *DICER1* syndrome (MIM: 606241) [4]. However, most cases of FNMTTC (95%) are non-syndromic and the genetic causes are still unknown [5]. Thus far, different strategies have been carried out in order to find out the genes involved in the development of FNMTTC: linkage [6, 7], GWAS [8], and next-generation sequencing studies [9, 10]. Several candidate regions such as PRN (1q21), NMTC1 (2q21), FTEN (8p23), MNG1 (14q32), and TCO (19p13.2), as well as candidate genes like *SRGAPI*, *NKX2*, *FOXE1*, *HABP2*, or *MAP2K5*, have been suggested, but none clearly validated as causative of FNMTTC [11–13].

It has long been known that somatic mutations in the *TERT* promoter gene are involved in the development of TC [14], suggesting that genes associated with, or taking part of the telomerase complex, could be involved in the development of non-syndromic FNMTTC. Some studies have already been carried out in TC, e.g., *TERC* gene [15], showing no germline mutations in this gene.

POT1 (protection of telomeres 1) gene is located in chromosome 7 and it is a member of the shelterin complex, encoding a nuclear protein involved in telomere maintenance. Germline variants in *POT1* have been described mainly not only in families with melanoma [16], but also in familial gliomas and Li-Fraumeni-like familial cancer syndromes [17, 18]. Recently, it has been suggested that germline mutations in *POT1* gene could be implicated in TC, specifically the new variant p.(Lys90Glu) of *POT1* identified by whole-exome sequencing (WES) in a family with multiple family members affected with melanoma as well as thyroid, kidney, and breast cancers [19]. In another family with melanoma, a case of TC has been recently reported in an individual with the p.(Ile78Thr) mutation [20]. On the other hand, it has been described that the spectrum of cancers caused by mutations in the *POT1* gene is more diverse than it seemed at first [21]. Therefore, with the purpose of reinforcing or not if TC is part of the mutational *POT1* phenotype spectrum, it would be interesting to know if mutations in these gene could lead to non-syndromic FNMTTC. In order to elucidate this possibility, we analyzed the *POT1* gene in seven selected families, each of them with three or more affected cases to minimize the possibility that thyroid cancer could have been due to chance in these families.

Methods

Patients

We designed a multicentric study in Spain to collect blood specimens (15 ml of whole blood in potassium EDTA tubes), and clinical data from families with at least three first-degree relatives affected with NMTC, confirmed by histology, without history of other malignancies, and without clinical

characteristics suggestive of syndromic FNMTTC. We obtained blood samples and clinical data from the affected individuals belonging to seven families with non-syndromic FNMTTC, from seven hospitals in Spain (Fig. 1). Patients gave written informed consent before undergoing evaluation and testing.

DNA Extraction and Gene Sequencing

Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples using conventional salt-precipitation protocol. The whole coding region and 5'UTR regions of *POT1* gene (NM_015450.2), as well as intron-exon boundaries, were studied.

PCR followed by Sanger sequencing was performed. PCR conditions were as follows: denaturation at 95 °C for 5 min, 10 cycles (95 °C for 1 min, 65–60 °C for 1 min, 72 °C for 1 min), followed by 25 cycles (95 °C for 1 min, 55 °C for 1 min, 72 °C for 1 min), and extension at 72 °C (10 min). Sanger sequencing was performed using universal M13 primers by GENEWIZ (Takeley, UK). Sequences were analyzed using the SeqPilot 4.0.1 software (JSI Medical Systems, Ettenheim, Germany). *POT1* sequencing was performed in seven affected individuals (the index cases) from seven different pedigrees with FNMTTC.

Exome Capture and Next-Generation Sequencing

Whole-exome sequencing (WES) was performed in 10 affected individuals (marked with an asterisk in Fig. 1) from the first four families we recruited (kindreds 1, 2, 3, and 4).

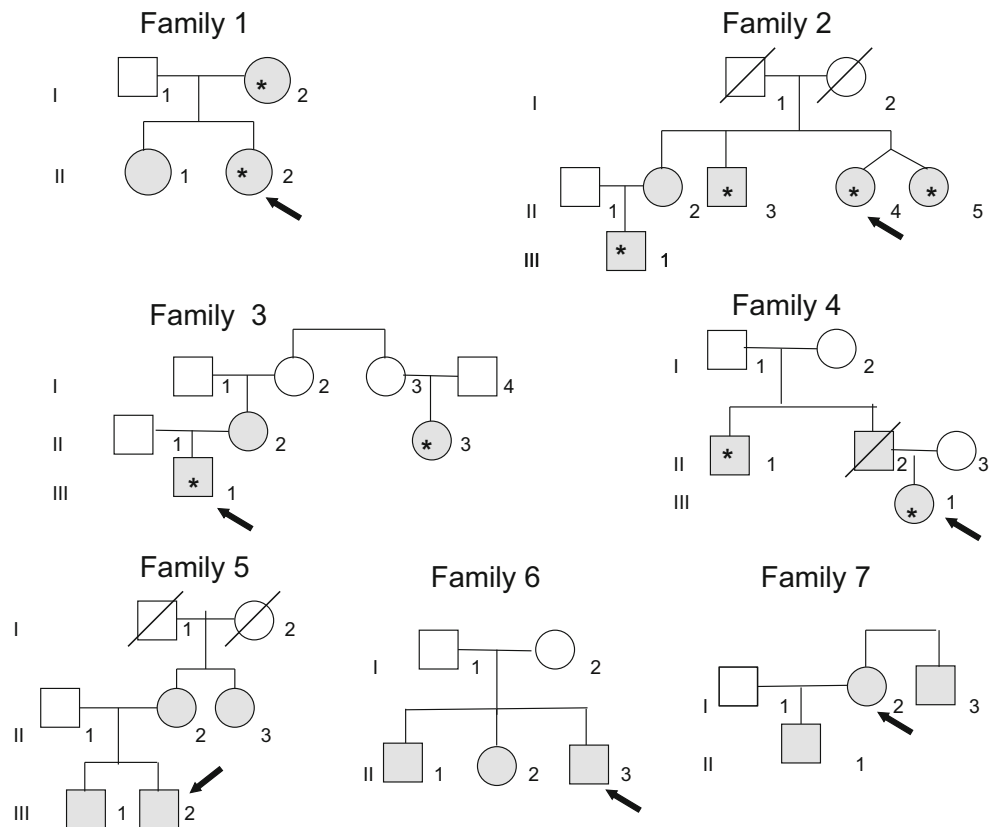
The DNA library was prepared using the SureSelect exon v5-post kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) that enables the capture of target sequence of exonic regions in the human genome. The libraries were sequenced using the Illumina HiSeq 2000 sequencer (Macrogen, Seoul, South Korea) with 101-base pair (bp) average read length.

Results

Families

Regarding the whole data (Table 1) for the 7 pedigrees (in total, 24 FNMTTC-affected members), their median age at diagnosis was 41 years (range 23–61 years), 54% female. Twenty out of 24 (83%) patients presented classic papillary thyroid cancer (PTC), and 17% follicular variant PTC. Tumor multifocality was present in 46% of cases and not present in 37% (in the remaining 17%, we did not have this data). In total, 29% of tumors were bilateral (46% unilateral) and 37% of tumors presented gross extrathyroidal extension and local invasion. Lymph node metastasis was found in 10 cases (41.6%), and distant metastasis was present in 2 cases (8.3%). One of the patients with distant metastasis died of

Fig. 1 Families with non-syndromic FNMTC recruited. Index cases are indicated with black arrows. Asterisk: Affected individuals where the WES was performed. Gray circles: Patients affected with thyroid cancer



thyroid cancer. All patients received radioactive iodine therapy (range 30–450 mCi), and to date 29% presented recurrences and persistence of the disease.

POT1 Analysis

None of the seven index members from FNMTC was found to be a carrier of *POT1* mutations that could be interpreted as causative of TC or other neoplasia. During the analysis, only the following well-known benign changes were found: rs6959712, rs6977407, rs7794637, rs3815221, and rs142780416. All of them are located in intronic regions.

Whole-Exome Sequencing

Confirming the previously described sequencing results, none of the 10 subjects studied by WES was found to be a carrier of germline *POT1* mutations. In addition, we looked for mutations in other genes related to FNMTC. According to the literature, we examined genes responsible for syndromic FNMTC (*APC*, *PTEN*, *WRN*, *DICER1*, and *PRKARIA*), rearranged genes (*NTRK*, *PPARG*), genes involved in DNA repair (*XRCC1*, *XRCC3*, *ATM*), or in the development of the thyroid gland (*PAX8*, *JAG1*, *CDC42*, *GSTM1*, *GSTT1*, *SRGAP1*, *TERT*, *THRB*, *AKT1*, *SEC23B*, *ESR2*, *NKX2*, *TBLIX*), genes previously described that may predispose to

non-syndromic FNMTC (*HABP2*, *TTF1*, *THADA*, *SEC23B*, *FOXE1*, *KLLN*, *MAP2K5*, *CHEK2*, *MYH9*, *SRRM2*), proto-oncogenes (*RET*, *MET*, *KIT*, *MERTK*), and genes with somatic mutations in TC (*BRAF*, *NRAS*, *TP53*, *CDKN2A*, *ALK*, *ATF4*). We did not find any genetic variant that could be considered causative of thyroid cancer.

Discussion

Regarding the rising incidence of TC in general, and familial TC in particular, there is an unmet need to identify the genetic risk factors associated with this disease. Many studies have been carried out in order to identify susceptibility genes involved in non-syndromic FNMTC. Numerous reports have found private mutations in specific genes in isolated families, suggesting them to be causative of FNMTC [22], but none of them has been validated across different research articles [23].

TC and melanoma are in a way genetically connected cancers since they share some features: both can be triggered by environmental factors such as radiation or ultraviolet exposure, suggesting that DNA repair genes may be involved in their pathophysiology [24]. Furthermore, the elevation of TC risk in patients with melanoma has been described [25], and both are observed in a syndrome such as *PTEN* hamartomatous tumor syndrome (Cowden disease). Interestingly, like melanoma, TC often

Table 1 Clinical characteristics, pathological findings, and outcome of 7 families with FNMTC (members according to Fig. 1)

Family	Member	Age (years)/sex	Disease presentation	Type	Tumor multifocality	Bilaterality	Gross ETE	LN	Distant M1	Outcome
1	I.2.	26/F	Unknown	CPTC	No	No	Yes	No	No	Unknown
	II.1.	29/F	Nodule	CPTC	UK	UK	UK	No	No	Remission
	II.2.	31/F	Nodule	CPTC	Yes	Yes	No	No	No	Persistence
2	II.2.	53/F	Multinodular goiter	CPTC	No	No	No	No	No	Remission
	II.3.	57/M	Multinodular goiter	CPTC	No	No	Yes	No	No	Remission
	II.4.	51/F	Multinodular goiter	CPTC	Yes	Yes	Yes	No	No	Remission
	II.5.	50/F	Multinodular goiter	CPTC	No	No	No	No	No	Remission
	III.1.	36/M	screening	CPTC	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Remission
3	II.2.	48/M	Nodule	CPTC	Yes	No	No	UK	No	Remission
	II.3.	41/F	Nodule	CPTC	No	No	Yes	Yes	No	Persistence
	III.1.	23/M	Nodule	FPTC	UK	UK	UK	UK	No	Remission
4	II.1.	55/M	Adenopathy	CPTC	UK	UK	UK	Yes	No	Remission
	II.2.	61/H	Adenopathy	CPTC	UK	UK	UK	Yes	Yes	Exitus
	III.1.	37/F	Nodule	CPTC	Yes	No	UK	Yes	No	Persistence
5	II.2.	37/F	Nodule	CPTC	No	No	Yes	No	No	Remission
	II.3.	41/F	Nodule	FPTC	No	No	No	No	No	Remission
	III.1.	24/M	Screening	CPTC	Yes	No	No	No	No	Remission
	III.2.	30/M	Nodule	FPTC	No	No	No	No	No	Remission
6	II.1.	29/M	Nodule	CPTC	Yes	UK	Yes	Yes	No	Persistence
	II.2.	45/F	Nodule	CPTC	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Remission
	II.3.	43/M	Nodule	FPTC	No	No	Yes	No	No	Remission
7	I.2.	46/F	Multinodular goiter	CPTC	Yes	Yes	No	Yes	No	Persistence
	I.3.	45/M	Adenopathy	CPTC	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Persistence
	II.1.	36/M	Nodule	CPTC	Yes	Yes	No	Yes	No	Remission

F, female; M, male; CPTC, classic papillary thyroid cancer; FPTC, follicular variant papillary thyroid cancer; ETE, extrathyroidal extension; LN, lymph node metastasis; M1, metastasis; UK, unknown

harbors somatic promotor mutations in the *TERT* gene [26] or the p.Val600Glu mutation in the *BRAF* gene, both being important events in TC progression [27]. Moreover, it has been suggested that genes involved in telomere maintenance that predispose to develop melanomas may also be implicated in TC, as it has been described that patients with FNMTC have shorter telomeres, compared with unaffected family members, sporadic cases, and healthy controls [28]. He et al. [29] investigated the gene copy number and mRNA expression of different genes involved in telomere maintenance (*POT1* gene included) in 13 patients from six families with FNMTC observing no significant differences. Cantara et al. [15] studied *POT1* and *RAP1* genes by DHPLC in 66 patients from 38 families, implying that the majority of families had only two affected cases. Although they did not detect mutations in *POT1*, we consider it was not strong enough to rule out the implication of *POT1* as a gene implied in hereditary TC because the analysis was done by DHPLC and the study was carried out mostly in families with only two cases. Given the high prevalence of TC in the general population, Charkes [30] estimated that about 62% of families with two cases affected by FNMTC can be phenocopies (two sporadic cases associated by chance); therefore, only 38% would be truly hereditary.

However, if there are three affected cases, the probability of being hereditary rises to 96%. Consequently, we designed this multicentric study to analyze in selected FNMTC families (with 3 or more affected patients/family, and without any feature that made us suspect a well-known syndromic FNMTC) if the *POT1* gene could be a putative susceptibility gene for non-syndromic FNMTC. Our enrolled families are representative of non-syndromic FNMTC, with a very high probability of being hereditary, not only because of the important number of affected members, but also because they present similar clinical characteristics, as described before for other families with FNMTC, especially those with 3 or more affected members [31]: early age at diagnosis, lower female predominance, more tumor multifocality, more lymph node metastasis, and tumor aggressiveness and recurrence.

We performed WES analysis in four families and Sanger sequencing in the seven families. WES does not cover all the regions of *POT1* gene (e.g., 5'UTR regions or large intron-exon boundaries). On the other hand, WES analysis provided us complementary information, since it allowed us to rule out the presence of pathogenic mutations in other genes previously described as implicated in FNMTC.

In our study, no germline potentially pathogenic mutations were detected in *POT1* gene in seven families with FNMTc.

We did not find putative causative mutations in genes previously described as candidate genes for FNMTc in the four families studied by WES.

A limitation of the study is the relatively small number of families. However, it is difficult to recruit families with more than two members affected with NMTC, even with a multicentric collaboration. In fact, most scientific articles on this topic include a limited number of families analyzed, unless they include families with two affected members [15, 29].

In the multiple studies searching for causative genes of FNMTc in the literature, no reproducible results have been found. We hypothesize that FNMTc may be mainly a polygenic hereditary entity. This scenario would make it difficult to find a common link among the different affected families. Indeed, part of the families included in this study were included in a previous paper [32], where we suggest that non-syndromic FNMTc may be due to multiple mutations acting as risk alleles and modifier locus for FNMTc, in contrast with most hereditary cancers, in which only 2 or 3 high-penetrance causative genes have been described.

In conclusion, the absence of germline *POT1* mutations in our set of TC families studied here does not completely exclude the possibility that *POT1* mutations may be associated with an increased TC risk as part of the wide spectrum of *POT1* cancers. However, our results minimize the chances of *POT1* being a TC predisposition gene that would manifest itself in non-syndromic TC families.

Acknowledgments We are grateful to the patients and their families for their participation; and to their physicians for providing samples and clinical histories: F. Hanzu, J. Blanco, A. de Hollanda, and E. Ortega (H.Clinic); C. Villabona, J. Otero, and A. Simó (H. Bellvitge); M.C. Vilardell and A.M. Gutiérrez (H.Althaia de Manresa); R. Casañ (H. de Xàtiva); B. León (H.de la Plana); R. Alfayate (H. General de Alicante); S. Martínez (H. de Elda); and C. Quirós (H.Mútua de Terrassa).

Funding Information This work was funded by the Fellowship 2015/2016 from Catalan Society of Endocrinology and Nutrition (Spain) to Josep Oriola.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical Approval

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional research committee (Ethics Committee of the Hospital Clinic of Barcelona, Spain; Reg. HCB/2016/0200) and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed Consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

References

- Sahasrabudhe R, Stultz J, Williamson J et al (2016) The HAPB2 G534E variant is an unlikely cause of familial non-medullary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 10:1098–1103. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-3928>
- Moses W, Weng J, Kebebew E (2011) Prevalence, clinicopathologic features, and somatic genetic mutation profile in familial versus sporadic non-medullary thyroid cancer. *Thyroid* 21:367–371. <https://doi.org/10.1089/thy.2010.0256>
- Kebebew E (2008) Hereditary non-medullary thyroid cancer. *World J Surg* 32:678–682. <https://doi.org/10.1007/s00268-007-9312-z>
- Rowland KJ, Moley JF (2015) Hereditary thyroid cancer syndromes and genetic testing. *J Surg Oncol* 111:51–60. <https://doi.org/10.1002/jso.23769>
- Vriens MR, Suh I, Moses W, Kebebew E (2009) Clinical features and genetic predisposition to hereditary non-medullary thyroid cancer. *Thyroid* 19:1343–1349. <https://doi.org/10.1089/thy.2009.1607>
- Malchoff CD, Sarfarazi M, Tendler B et al (2000) Papillary thyroid carcinoma associated with papillary renal neoplasia: genetic linkage analysis of a distinct heritable tumor syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 85:1758–1764. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.5.6557>
- Suh I, Filetti S, Vriens MR et al (2009) Distinct loci on chromosome 1q21 and 6q22 predispose to familial non-medullary thyroid cancer: a SNP array-based linkage analysis of 38 families. *Surgery* 146:1073–1080. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2009.09.012>
- Gudmundsson J, Sulem P, Gudbjartsson DF et al (2009) Common variants on 9q22.33 and 14q13.3 predispose to thyroid cancer in European populations. *Nat Genet* 41:460–464. <https://doi.org/10.1038/ng.339>
- Gara SK, Jia L, Merino MJ et al (2015) Germline HAPB2 mutation causing familial nonmedullary thyroid cancer. *N Engl J Med* 373:448–455. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1502449>
- Ye F, Gao H, Xiao L et al (2019) Whole exome and target sequencing identifies MAP2K5 as novel susceptibility gene for familial non-medullary thyroid carcinoma. *Int J Cancer* 144:1321–1330. <https://doi.org/10.1002/ijc.31825>
- Pereira JS, da Silva JG, Tomaz RA et al (2015) Identification of a novel germline FOXE1 variant in patients with familial non-medullary thyroid carcinoma (FNMTc). *Endocrine* 49:204–214. <https://doi.org/10.1007/s12020-014-0470-0>
- Weeks AL, Wilson SG, Ward L, Goldblatt J, Hui J, Walsh JP (2016) HAPB2 germline variants are uncommon in familial nonmedullary thyroid cancer. *BMC Med Genet* 17:60. <https://doi.org/10.1186/s12881-016-0323-1>
- Colombo C, Fugazzola L, Muzza M et al (2018) Letter regarding the article: “Multiple HAPB2 variants in familial papillary thyroid carcinoma: contribution of a group of ‘thyroid-checked’ controls” by Kern et al. *Eur J Med Genet* 61:104–105. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2017.07.012>
- Liu R, Xing M (2016) TERT promoter mutations in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 23(3):143–155. <https://doi.org/10.1530/ERC-15-0533>
- Cantara S, Capuano S, Capezzone M et al (2012) Lack of mutations of the telomerase RNA component in familial papillary thyroid cancer with short telomeres. *Thyroid* 22(4):363–368. <https://doi.org/10.1089/thy.2011.0109>
- Wong K, Robles-Espinoza CD, Rodriguez D et al (2019) Association of the POT1 germline missense variant p.I78T with familial melanoma. *JAMA Dermatol* 155(5):604–609. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2018.3662>
- Baggechi S (2015) POT1: a genetic link for familial glioma. *Lancet Oncol* 16(1):2. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71178-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71178-7)
- Calvete O, Martínez P, García-Pavía P et al (2015) A mutation in the POT1 gene is responsible for cardiac angiosarcoma in TP53-

- negative Li-Fraumeni-like families. *Nat Commun* 6:8383. <https://doi.org/10.1038/ncomms9383>
19. Wilson TL, Hattangady N, Lerario AM et al (2017) A new POT1 germline mutation-expanding the spectrum of POT1-associated cancers. *Familial Cancer* 16(4):561–566. <https://doi.org/10.1007/s10689-017-9984-y>
 20. Potrony M, Puig-Butille JA, Ribera-Sola M et al (2019) POT1 germline mutations but not TERT promoter mutations are implicated in melanoma susceptibility in a large cohort of Spanish melanoma families. *Br J Dermatol* 181(1):105–113. <https://doi.org/10.1111/bjd.17443>
 21. Calvete O, Garcia-Pavia P, Domínguez F et al (2017) The wide spectrum of POT1 gene variants correlates with multiple cancer types. *Eur J Hum Genet* 25(11):1278–1281. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2017.134>
 22. Saporito D, Brock P, Hampel H et al (2018) Penetrance of a rare familial mutation predisposing to papillary thyroid cancer. *Familial Cancer* 17(3):431–434. <https://doi.org/10.1007/s10689-017-0048-0>
 23. Hińcza K, Kowalik A, Kowalska A (2019) Current knowledge of germline genetic risk factors for the development of non-medullary thyroid cancer. *Genes (Basel)* 10(7):E482. <https://doi.org/10.3390/genes10070482>
 24. Santos LS, Costa-Gomes B, Bastos HN et al (2019) Thyroid cancer: the quest for genetic susceptibility involving DNA repair genes. *Genes (Basel)* 10(8):E586. <https://doi.org/10.3390/genes10080586>
 25. Goggins W, Daniels GH, Tsao H (2006) Elevation of thyroid cancer risk among cutaneous melanoma survivors. *Int J Cancer* 118(1):185–188. <https://doi.org/10.1002/ijc.21300>
 26. Liu X, Bishop J, Shan Y et al (2013) Highly prevalent TERT promoter mutations in aggressive thyroid cancers. *Endocr Relat Cancer* 20(4):603–610. <https://doi.org/10.1530/ERC-13-0210>
 27. Marques IJ, Moura MM, Cabrera R et al (2017) Identification of somatic TERT promoter mutations in familial nonmedullary thyroid carcinomas. *Clin Endocrinol* 87(4):394–399. <https://doi.org/10.1111/cen.13375>
 28. Capezzone M, Cantara S, Marchisotta S et al (2008) Short telomeres, telomerase reverse transcriptase gene amplification, and increased telomerase activity in the blood of familial papillary thyroid cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab* 93:3950–3957. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-0372>
 29. He M, Bian B, Gesuwan K et al (2013) Telomere length is shorter in affected members of families with familial non-medullary thyroid cancer. *Thyroid* 23(3):301–307. <https://doi.org/10.1089/thy.2012.0270>
 30. Charkes ND (2006) On the prevalence of familial nonmedullary thyroid cancer in multiply affected kindreds. *Thyroid* 16:181–186. <https://doi.org/10.1089/thy.2006.16.181>
 31. Wang X, Cheng W, Li J et al (2015) Familial non-medullary thyroid carcinoma is a more aggressive disease: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Endocrinol* 172:253–262. <https://doi.org/10.1530/EJE-14-0960>
 32. Orois A, Gara SK, Mora M et al (2019) *NOP53* as a candidate modifier locus for familial non-medullary thyroid cancer. *Genes (Basel)* 10(11):E899. <https://doi.org/10.3390/genes10110899>

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

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. Selección de familias con FNMTC

El paso inicial y fundamental para indagar las causas genéticas del FNMTC, es una adecuada selección de familias. Como se ha comentado a lo largo de la presente tesis doctoral, dada la relativamente alta prevalencia del cáncer no medular de tiroides esporádico, resulta de vital importancia discriminar las familias en las que se sospecha un verdadero componente hereditario. En aquellas familias de tres miembros afectados, la probabilidad de que sea realmente hereditario sería de en torno al 96%. Sin embargo, en las de dos miembros se reduce tan solo a un 38% (15). Precisamente por ello, recientemente se plantea el cambio de definición del FNMTC (76), que nos parece acertado: Considerar FNMTC cuando haya presencia de esta neoplasia en tres o más familiares de primer grado. Por eso, en nuestros dos artículos originales el punto de partida de nuestra investigación fueron las familias más numerosas que pudimos reclutar. En otra revisión reciente (77), se pone en relieve que la definición de cáncer familiar es diferente atendiendo al tipo de neoplasia, y que sugieren que en el caso del FNMTC incluso más que el número de miembros afectados pesarían criterios como la edad al diagnóstico y la existencia de anticipación en la generación sucesiva. Por tanto, incluso la definición del FNMTC es motivo de controversia a día de hoy.

En el original 1, partimos del estudio del exoma de una familia de cinco miembros afectados, y las posibles variantes candidatas seleccionadas fueron investigadas en las restantes familias de dos o más miembros.

En el original 2, descartamos la presencia de mutaciones en línea germinal en *POT1* en los casos índice de siete familias de al menos 3 miembros afectados.

Por todo, consideramos que estas familias seleccionadas de 3 o más miembros afectados son representativas del FNMTC, con lo que los genes descritos y posteriormente estudiados en el resto de familias aportan datos interesantes para el estudio genético del cáncer de tiroides.

2. Características clínicas de las familias con FNMTC

Las familias reclutadas en el presente proyecto son una buena representación del FNMTC, no solo por el número de miembros afectos, sino también por sus características clínicas, similares a las descritas en otras publicaciones (16,19). Las familias con FNMTC tienen una edad al diagnóstico de cáncer de tiroides menor que los casos esporádicos, al igual que en el resto de cánceres hereditarios. Además, también observamos anticipación, al igual que en publicaciones previas (17). En nuestras familias con relación paterno-filial, la edad al diagnóstico de los hijos era llamativamente menor (media 32 años) a la de sus padres (media 51 años). Probablemente esto se debe a varios factores. Por un lado, se debería al aumento en la incidencia del cáncer de tiroides, motivado en parte por el mayor diagnóstico en contexto de pruebas de imagen realizadas por otros motivos, en una sociedad con superior acceso al sistema sanitario. Por otro lado, también contribuiría el posible mayor seguimiento de los familiares de pacientes con cáncer de tiroides, en ocasiones sometidos a screening de la patología, y que por lo general presentan una mayor preocupación por su salud tiroidea. De todos modos, cabe resaltar que en nuestra muestra solo en 3 casos de las 15 familias (justamente las de ≥ 3 miembros afectos), el diagnóstico del miembro de segunda generación fue en contexto de realización de ecografía de tiroides por screening familiar. De hecho, la segunda generación fue diagnosticada en promedio 6,6 años más tarde que la primera generación (rango 0-24 años), lo que sugiere aún más la presencia de un fenómeno de anticipación: transcurren unos años desde que se diagnostica de CDT a los padres hasta que aparece el nódulo tiroideo/BMN en los hijos y se diagnostican de CDT. Aunque llama la atención una diferencia de edad al diagnóstico tan amplia entre padres e hijos (19 años en promedio), los sesgos mencionados hacen que no podamos afirmar si efectivamente en la segunda generación el FNMTC sería más precoz y agresivo. En realidad, no pudimos demostrar otras diferencias significativas en cuanto a características histopatológicas u otras, probablemente debido al pequeño tamaño muestral.

Focalizando nuestro análisis en las familias de tres o más miembros afectos, observamos mayor tendencia a multifocalidad, bilateralidad, recurrencia y metástasis

ganglionares que en las de solo dos miembros. Sin embargo, solo pudimos demostrar diferencias significativas en cuanto a la invasión local, así como a la necesidad de mayores dosis de radioyodo en las familias de tres o más miembros afectos. Esto va en consonancia con la literatura, que sugiere mayor agresividad tumoral en las familias de al menos tres miembros (19,20). Sin embargo, la mayoría de los estudios se basan en análisis retrospectivos y con escaso tamaño muestral, como ocurre en el nuestro. Es por ello que se precisan estudios prospectivos que permitan aclarar cuestiones como la utilidad del cribado familiar, así como determinar el mejor abordaje diagnóstico y terapéutico en estos pacientes. Quedan muchas cuestiones por despejar, tales como: ¿A quiénes y cómo debemos realizar el screening familiar? ¿Cuándo debemos puncionar los nódulos tiroideos, en caso de haber antecedentes familiares de CDT? ¿Debemos practicar tiroidectomía total aunque se trate de nódulos tiroideos únicos infracentimétricos? ¿Es recomendable el vaciamiento ganglionar profiláctico? ¿Se deben administrar dosis más altas de radioyodo si existen antecedentes familiares de CDT? También conviene dilucidar si la persistencia y recurrencia de la enfermedad en estos pacientes es diferente a la de los pacientes con CDT esporádico, lo que cambiaría su manejo. Parece menos útil analizar posibles diferencias en la supervivencia, que serían muy difíciles de encontrar dado el buen pronóstico del CDT en general.

Por todo, y en la misma línea de lo que se comentó anteriormente, nuevamente parece mejor priorizar la homogeneidad y calidad de las familias reclutadas, y centrarse en las de al menos tres miembros afectos, para intentar dar respuesta a todas estas cuestiones todavía abiertas en futuras investigaciones.

3. Genes de susceptibilidad al FNMTC

El FNMTC representa el 3-9% de los CDT (7), que a su vez son la neoplasia endocrina más frecuente. Con este proyecto, pretendimos aplicar metodología recientemente incorporada al campo de la genética y biología molecular, para avanzar en el conocimiento de las bases genéticas del FNMTC no sindrómico. La identificación de factores genéticos de predisposición abriría la puerta no solo a la identificación de portadores y no portadores y al consejo genético, sino también a la caracterización de

vías de señalización celular implicadas en este tipo cáncer hereditario y quizás también en el esporádico.

Primeramente, investigamos la presencia de variantes en genes descritos en la literatura como de susceptibilidad al FNMTC. Como se ha desarrollado en el apartado de resultados, no replicamos los hallazgos de estudios previos ni pudimos corroborar que alguno de esos genes relatados previamente estuvieran implicados en el desarrollo de FNMTC en nuestras familias.

A continuación, centramos nuestros esfuerzos en el estudio de dos genes: Un potencial candidato descrito recientemente en un artículo científico (*POT1*); y un gen dibujado por primera vez como posiblemente involucrado en el FNMTC, fruto de la presente tesis doctoral (*NOP53*).

3.1.POT1 (Protection of telomeres 1)

POT1 está ubicado en el cromosoma 7, y codifica una proteína nucleolar implicada en el mantenimiento de los telómeros. Nos propusimos profundizar más en el conocimiento de dicho gen por diversos motivos.

En primer lugar, se sospecha que los genes del complejo telómero-telomerasa, dentro del cual se incluiría *POT1*, podrían estar implicados en el desarrollo del FNMTC no sindrómico. Existen varios genes implicados en el mantenimiento de los telómeros, tales como *TERT*, o los genes del complejo shelterina (*POT1*, *RAP1*, *TIN2*, *TPP1*, *TRF1* y *TRF2*) (57). Mutaciones somáticas en *TERT*, como hemos mencionado en la introducción, juegan un papel importante en el desarrollo del cáncer de tiroides, suponiendo un importante factor de mal pronóstico en el CDT (78). De hecho, la expresión de *TERT* es un marcador de transformación maligna, pues no hay evidencia de que se detecte en tumores benignos (58). Sin embargo, no se han encontrado mutaciones en línea germinal en *TERT* causantes de CDT (57). Sí se ha descrito que los pacientes con FNMTC tienen los telómeros más cortos que sus familiares no afectados, los controles sanos o casos esporádicos (59), aunque estos hallazgos no se han corroborado en otros estudios (61, 62). Tampoco se han observado diferencias en el

número de copias ni en la expresión de diversos genes del complejo telómero-telomerasa en seis familias con FNMTC (63). Por todo, la literatura todavía es poco consistente y es un campo abierto a la investigación.

En segundo lugar, se han descrito mutaciones germinales en *POT1* en varias patologías oncológicas (79), fundamentalmente en melanomas (80). En niños que han sobrevivido a un cáncer, se ha descubierto una variante intrónica en *POT1* asociada al desarrollo de CDT (81). También se ha identificado la variante p.(Lys90Glu) de *POT1* en una familia con múltiples miembros afectados con melanoma y cáncer de tiroides, riñón y mama (74). En otra familia con melanoma, se ha informado recientemente de un caso de CDT en un individuo con la mutación p. (Ile78Thr) (82). Por último, Srivastava et al. (83) describieron la variante p.V29L en *POT1*, que ocasionaba disfunción de los telómeros, en una familia con FNMTC sin otras neoplasias.

Cabe destacar que el melanoma y el cáncer de tiroides comparten varios rasgos que nos hacen sospechar que puedan tener una fisiopatología similar. Así, ambos pueden estar precipitados por la exposición a radiaciones ionizantes, lo que hace pensar que podrían estar implicados en su etiología genes reparadores de DNA. Además, otros genes tales como *BRAF* o el ya citado *TERT* juegan papeles clave en ambos procesos oncológicos tal y como se ha descrito en numerosas publicaciones (84). Por otro lado, se ha descrito un aumento de la incidencia de CDT en pacientes con melanoma (85); y ambas patologías se presentan asimismo en el síndrome de Cowden, originado por mutaciones en *PTEN* (8).

En realidad, existe una interrelación entre los dos puntos que acabamos de mencionar, pues se ha visto que mutaciones en proteínas involucradas en la reparación del DNA resultaban en disfunción de los telómeros e inestabilidad cromosómica, confirmándose la presencia de lazos estrechos entre el mantenimiento de los telómeros y los mecanismos de reparación del DNA (86).

En tercer y último lugar, aunque ya se han llevado estudios de *POT1* en familias con FNMTC, ninguno ha sido aplicando nuestra metodología: He et al. (63) reclutaron 13 pacientes afectos procedentes de 6 familias con FNMTC y analizaron varios genes implicados en el mantenimiento de los telómeros (incluido *POT1*). Aunque detectaron

que estas personas tenían una longitud de los telómeros relativa más corta que los miembros no afectados de las familias, no encontraron diferencias en el número de copias ni en la expresión de ARN mensajero de dichos genes. Cantara et al. (57) también estudiaron *POT1* y otros genes, en esta ocasión en un número mayor de familias (66 afectados procedentes de 38 familias con FNMTC), pero mediante Cromatografía Líquida Desnaturalizante de Alto Rendimiento (DHPLC), técnica inferior para detectar mutaciones a la secuenciación directa de Sanger, el gold standard.

A diferencia de estas publicaciones, nosotros hemos seleccionado familias con al menos 3 miembros afectados, con más probabilidades de tratarse de verdaderos casos hereditarios. Además, hemos secuenciado completamente el gen *POT1* mediante Sanger, el gold standard, incluyendo además regiones como las 5-UTR que la WES no cubriría.

Por todo ello, analizamos *POT1* en siete familias con FNMTC y sin otras patologías neoplásicas, sin encontrar mutaciones que pudieran considerarse asociadas al desarrollo del cáncer de tiroides. Nuestros resultados reducen las posibilidades de que *POT1* sea un gen de predisposición al FNMTC por sí mismo, aunque no puede descartarse por completo. Como hemos visto repetidamente a lo largo de esta tesis doctoral, las variantes en genes candidatos a ser causantes de FNMTC se han hallado exclusivamente en familias aisladas, y de manera no consistente en otras familias. Quizá porque en el fondo no son genes causantes, sino predisponentes o factores de riesgo para desarrollar el FNMTC. Así, mutaciones en *POT1* podrían predisponer o incrementar el riesgo de cáncer de tiroides dentro de un amplio espectro de otras neoplasias.

Por otro lado, en el mundo de la investigación es complicado encontrar publicaciones de resultados negativos, a pesar de que también incrementan nuestro conocimiento. Un artículo recomendable y que nos hizo meditar en ello y nos empujó a publicar el original 2 fue “The need for reporting negative results – a 90 year update” (87). Aparte de los estudios mencionados, no hemos identificado otros artículos que descarten específicamente la presencia de mutaciones en *POT1* en familias con FNMTC.

3.2. **NOP53** (NOP53 Ribosome Biogenesis Factor)

NOP53, también conocido como *GLTSCR2* o *PICT-1*, está localizado en el cromosoma 19q13.33 y codifica una proteína nucleolar implicada en la biogénesis ribosómica. Se sabe que el nucleolo es una estructura celular muy importante: Situado en el núcleo, su función es la formación de los ribosomas, y está implicado en la regulación del ciclo celular y la estabilidad cromosómica. Por tanto, la disregulación de proteínas nucleolares se asocia con patologías como el cáncer (88). *NOP53* podría participar en estas funciones nucleolares, y por tanto constituir un paso crítico en la carcinogénesis (89). En efecto, se ha visto que *NOP53* actuaría regulando la activación del gen supresor tumoral *p53* (90).

Además, se ha descrito que *NOP53* está implicado en la vía de señalización PI3K/AKT, que es una de las más importantes en cáncer de tiroides, junto con la vía de RAF/RAS/MEK/ERK/MAPK (91). Es conocido que mutaciones somáticas que conducen a la activación de la vía MAPK y de la vía PI3K / AKT son comunes en los cánceres de tiroides agresivos, como en los CDT metastásicos o recurrentes (92). Por ejemplo, la conocida mutación V600E en *BRAF* en el CPT conduce a una activación constitutiva de la vía de las MAPK (93) y se relaciona con características clínico-patológicas más agresivas. Y como hemos mencionado, se sospecha que el FNMTC podría ser una entidad más agresiva que el CDT esporádico, y una hipótesis plausible sería que sus bases genéticas podrían diferir de algún modo del CDT esporádico.

En un estudio de 5 familias con FNMTC mediante WES, hallaron variantes de interés en 210 genes, seleccionando 31 variantes por encontrarse en genes relacionados con el cáncer o con el metabolismo de la tiroides, tales como los mencionados *RET*, *CHEK2*, *POT1* y otros. Observaron que gran parte de estos genes “finalistas” estaban relacionados con vías de señalización tumoral mediadas por receptores de tirosín kinasa (94). Sin embargo, ninguna variante fue encontrada en más de una familia. Los autores concluyen que la vía de señalización PI3K/AKT y MAPK/ERK jugarían un papel fundamental en el desarrollo de FNMTC, y animan a realizar estudios funcionales con

los posibles genes candidatos que ellos proponen. Posteriormente, en un estudio de una familia con 3 miembros con FNTMC mediante NGS, se descubrieron tres genes de susceptibilidad (*PIK3CB*, *CAV2*, y *KANK1*) relacionados también con la tumorigénesis a través de la vía de PI3K/AKT (95). De manera relevante, Chen et al. (96), reportaron que *NOP53* condicionaba una inactivación de la vía de AKT en células humanas de glioblastoma y de cáncer de mama, de forma independiente a la disrupción nucleolar y de p53, promoviendo la autofagia celular. Defienden además que la autofagia celular podría condicionar tanto apoptosis como supervivencia de las células neoplásicas, dependiendo del tipo celular y las condiciones específicas.

Recordemos además que el gen supresor tumoral *PTEN* es el principal freno de la vía PI3K/AKT; y que *NOP53* fue descrito inicialmente como un gen que interactuaba con *PTEN* estabilizando la proteína PTEN (97,98). Precisamente, una de las principales manifestaciones del Síndrome de Cowden, causado por mutaciones en línea germinal de *PTEN*, es el FNMTTC sindrómico.

Por otra parte, y enlazando con lo comentado en el apartado anterior, el CDT, al igual que el melanoma, es un cáncer sensible a la radiación. Se ha descrito que *PTEN* y sus mecanismos reguladores (como *NOP53*) podrían estar implicados en el desarrollo de patologías cutáneas relacionadas con la radiación UVA. Concretamente, se observó un papel protector de *NOP53* para el desarrollo de queratosis seborreica (99). Además, el mismo grupo demostró que *NOP53* regulaba positivamente el gen *TERT* en células humanas de adenocarcinoma hepático (SK-Hep-1); y que la proteína *NOP53* inducía la actividad de la telomerasa, siendo los altos niveles de telomerasa una característica propia de las células neoplásicas (100). Así, concluyeron que otra de las funciones de *NOP53* sería la de codificar una proteína de respuesta al daño del DNA encargada de mantener la estabilidad cromosómica a través de la regulación de la telomerasa. Cabe señalar, además, que las mutaciones en el promotor de *TERT* son más prevalentes en los CDT portadores de la mutación *BRAF* V600E, potenciándose el mal pronóstico en las lesiones que presentan ambas mutaciones (101,102).

En conclusión, según la bibliografía, las mutaciones en *NOP53* podrían estar implicadas en la carcinogénesis bien por la vía de p53, o por la vía de PI3K/AKT –regulada por PTEN- o por su interacción con TERT y una desregulación de la actividad de la telomerasa. Todos estos mecanismos han sido descritos, igualmente, en la fisiopatología del cáncer de tiroides. En cuanto a la función oncogénica o supresora tumoral de *NOP53*, se hipotetiza que podría depender del tipo celular: Su expresión se ha visto regulada negativamente en carcinomas de células renales, de mama, cerebrales o de endometrio, sugiriendo una función supresora tumoral en la mayoría de estudios (103-105). Por el contrario, la sobreexpresión de *NOP53* en cánceres digestivos (colon, esófago), se ha asociado con peor pronóstico, yendo a favor de un comportamiento típico de oncogen (106).

En el presente proyecto de tesis doctoral, hemos identificado la variante Asp31His (rs78530808) en *NOP53*, que cosegregaba en todos los miembros afectados de tres familias con 5, 4 y 2 miembros afectados de CDT respectivamente, y no estaba presente en los familiares sanos. Por todo lo expuesto, *NOP53* sería un buen candidato a condicionar susceptibilidad al desarrollo de FNMTTC. Además, el aminoácido aspártico en la posición 31 en *NOP53* está bien conservado en las diferentes especies, lo que sugiere que las variantes en esa posición pueden tener un efecto patogénico. En la misma línea de pensamiento, tres programas de predicción "in silico" (SIFT, PolyPhen-2 y mutation taster) consideran esta variante como probablemente patogénica. Se trata de una variante descrita con una MAF del 1,8% en población europea no finlandesa, según las bases de datos de ExAC y The Genome Aggregation Database (gnomAD) (75,107). La MAF para esta variante en otras etnias es del 3,9% en el sur de Asia, 3,4% en Europa (población finlandesa), 1% en el este de Asia, 0,8% en África, 0,6% en judíos y 0,6% en población Latina. Todos los sujetos en nuestro estudio eran del sur de Europa (MAF 1,8%). Nosotros la encontramos presente en el 1,5% de nuestra población control (la detectamos en 3 alelos de 100 personas analizadas). Si bien es una variante relativamente frecuente en la población, llama la atención su presencia en el 5,9% de las familias reclutadas (3/51). Además, si calculamos las posibilidades de que todos los miembros afectados de esas familias presenten la variante debido al azar, la probabilidad es de aproximadamente el 2 ‰ (1/512).

Con la finalidad de comprobar el papel patogénico de *NOP53* desarrollamos estudios de funcionalidad en líneas celulares de cáncer de tiroides (original 1):

En los estudios de knockdown de *NOP53*, objetivamos una menor proliferación y formación de clones en las tres líneas celulares de cáncer de tiroides analizadas en comparación con los controles, sugiriendo una función protooncogénica de *NOP53*. Otros autores demostraron que cuando procedían al knockdown de *NOP53* en células HeLa (derivadas de cérvix), se producían defectos en la mitosis y en la citocinesis, incrementando el número de células con morfología anómala y provocando retrasos en la mitosis (89).

En los estudios de sobreexpresión de *NOP53*, observamos todo lo contrario: Mayor proliferación y clonogenicidad. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre las células con sobreexpresión de *NOP53* wild type (con su secuencia original) versus las células con sobreexpresión de *NOP53* mutante (con la variante p.Asp31His). Por eso, nuestra hipótesis sería que el propio gen *NOP53* tendría un papel oncogénico en el FNMTC, y que la variante específica p.Asp31His podría ser una mutación con un efecto oncogénico poco significativo cuando ya está sobreexpresado *NOP53*. Cabe mencionar un estudio previo en el que también se observó mayor expresión de *NOP53* en carcinomas foliculares agresivos (108). De hecho, si revisamos la literatura, deducimos que no todas las mutaciones presentes en un protooncogen son altamente oncogénicas: Por ejemplo, la mutación p.Val804Met en *RET*, cuando está presente en heterocigosis, rara vez es causante del CMT. Por el contrario, sí presenta alta penetrancia cuando está en homocigosis (109).

Los estudios de inmunohistoquímica revelaron mayor expresión de la proteína *NOP53* en tejido tumoral, en comparación con el tejido tiroideo normal circundante, sugiriendo que *NOP53* puede estar sobreexpresado en el tejido tumoral de pacientes con FNMTC.

Por todo ello, *NOP53* podría estar implicado en el FNMTC, probablemente como un gen de baja penetrancia, dado que nuestros hallazgos se restringen únicamente a tres

familias del total de las familias reclutadas, y aún no se han ratificado en ulteriores artículos. La variante p.Asp31His podría ser una mutación que condiciona leve ganancia de función, y que requeriría de otras variantes genéticas para desarrollar el FNMTTC, constituyendo un factor de riesgo para el desarrollo del FNMTTC.

Vistos los resultados poco consistentes entre los estudios sobre la genética del FNMTTC, que sugieren básicamente genes candidatos de baja penetrancia o incluso mutaciones únicas en algunas familias, podría ser que el FNMTTC fuese una enfermedad genéticamente heterogénea y poligénica, a diferencia de la mayoría de cánceres hereditarios, en los que se han identificado 1-3 genes causantes de alta penetrancia: *RET* en el cáncer medular de tiroides; *BRCA1* y *BRCA2* en el cáncer de mama; *APC*, *MLH1* y *MSH2* en el cáncer de colon, etc. Llama la atención que el FNMTTC sea uno de los cánceres con mayor riesgo de ser heredado, de hasta 6-10 veces para familiares de primer grado (110,111); y que sin embargo no encontremos un nexo común entre las diferentes familias. Podría pensarse que quizás es debido a algún factor ambiental que comparten los miembros de las familias, dado que la radiación u otros factores están implicados en la fisiopatología del CDT. Sin embargo, estudios sobre la incidencia de cáncer en parejas han demostrado que la tasa de incidencia estandarizada es de hasta un 1,4, mientras que la tasa de incidencia estandarizada del FNMTTC de un 3,3, solo por detrás del Linfoma de Hodgkin (4,8) y del cáncer testicular (4,2) (112,113). Esta notoria superioridad denota que el componente genético es mucho más importante que el ambiental en la agregación familiar en el FNMTTC (114). Nuestra hipótesis es que el FNMTTC no sindrómico podría deberse a múltiples mutaciones de baja a moderada penetrancia que actúen como factores de riesgo para desarrollar la enfermedad. Este contexto poligénico explicaría por qué no hallamos el nexo común entre las distintas familias, así como por qué es complicado encontrar familias con un grupo numeroso de miembros afectados (sería más común si las mutaciones fuesen de alta penetrancia). Por ejemplo, la penetrancia de mutaciones en *BRCA2* en hombres es del 6%, por lo que no puede considerarse causante de la neoplasia. Sin embargo, multiplica el riesgo de desarrollar la enfermedad (115).

4. Dificultades y limitaciones del estudio

Nuestro estudio presenta una serie de limitaciones, que describiremos a continuación:

En primer lugar, el relativamente pequeño número de familias en que llevamos a cabo la WES. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el reclutamiento de estas familias, especialmente de tres o más miembros afectados, es complejo y requiere una colaboración multicéntrica. De hecho, como hemos comentado en la introducción, la mayoría de las publicaciones maneja un número de familias similar o menor. De especial dificultad ha sido la consecución de muestras histológicas tumorales de estos pacientes, que requiere una colaboración no sólo entre centros sino también interdisciplinar.

En segundo lugar, la posibilidad que entre los casos estudiados en cada familia, alguno sea una fenocopia. Para minimizar este efecto, nuestro punto de partida fueron las familias con al menos tres miembros afectados (riesgo de un 4% de que alguno sea una fenocopia). Además, de cada familia estudiamos el exoma de dos de los miembros más alejados, pues a menor vínculo familiar menor cantidad de información genética comparten.

En tercer lugar, y aunque las técnicas de secuenciación masiva del exoma han supuesto un gran salto cualitativo en la bioquímica y genética molecular, y cada vez están más estandarizadas, todavía presentan sus limitaciones y requieren frecuentemente de validación mediante secuenciación de Sanger. Además, la necesaria aplicación de una serie de filtros sobre los datos de WES, de cara a seleccionar variantes de interés, implica que se descarten otras variantes cuya implicación en el desarrollo del FNMTC no puede excluirse completamente. Mencionar asimismo que uno de los filtros empleados fue que las variantes tuvieran una MAF <2% en población europea, punto de corte mayor que el habitual en otros estudios (<1%). Esto fue debido a que quisimos ser más permisivos con este filtro, para no descartar variantes potencialmente interesantes, ya que comprobamos que a menudo las frecuencias

descritas en población general distaban mucho de los datos observados en nuestra cohorte.

Por último, que el número de genes implicados en el FNMTC sea alto y con frecuencias de cada gen bajas. Si el FNMTC, a diferencia de la mayoría de cánceres hereditarios, es de etiología poligénica, no sería factible encontrar un nexo común entre las diferentes familias con nuestra aproximación. Esto podría explicar por qué hemos encontrado una variante de interés en *NOP53* presente exclusivamente en tres familias. Debemos considerar que aparte de *NOP53*, existen otros genes involucrados en el desarrollo de FNMTC.

A pesar de todo, creemos que los hallazgos de esta tesis son interesantes, ya que describimos, por primera vez en la literatura, la presencia de una variante en *NOP53* en línea germinal en varias familias con FNMTC. Estos resultados abrirían las puertas a la investigación del papel de *NOP53* en la oncogénesis del cáncer de tiroides. El estudio de las bases genéticas del FNMTC es un tema actual y candente, con múltiples publicaciones en los últimos años e incluso varias revisiones recientes (76,77). Esto supone una ventaja adicional, pues el proyecto nos ha permitido reunir una colección de muestras biológicas, que pueden ser de utilidad para comprobar inmediatamente la presencia o no de variantes en nuevos genes que se describan en futuros estudios.

En definitiva, hoy en día el FNTMC continúa siendo una patología heterogénea sin una causalidad genética establecida. Se han descrito algunos posibles genes de susceptibilidad, como *NOP53* en la presente tesis. Sin embargo, las variantes en estos genes se han encontrado únicamente en familias aisladas y los resultados no se han replicado en diferentes estudios. Por ello, no está indicado el estudio genético de las familias con FNMTC, al no haber ningún gen claramente establecido como causante del FNMTC, a excepción de los FNMTC asociados a síndromes genéticos hereditarios. No obstante, sí es de utilidad la recogida y registro de estas familias, incluyendo en la medida de lo posible la obtención de material genético germinal y tumoral, para poder llevar a cabo estudios de colaboración multicéntrica, y tratar de dilucidar las causas genéticas de esta enfermedad, así como sus características clínicas diferenciales.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En relación a los distintos objetivos, podemos exponer las siguientes conclusiones:

1. La recogida de datos clínicos y muestras biológicas de familias con FNMTC procedentes de diversos centros es un factor clave para seguir investigando la etiología genética del FNMTC.
2. Las características clínicas de las familias que hemos reclutado son similares a las descritas en estudios llevados a cabo en otros países: menor edad al diagnóstico y mayor anticipación padres-hijos. En las familias de tres o más miembros afectados, objetivamos mayor invasión local del CDT, así como necesidad de mayores dosis de radioyodo comparado con las familias de dos miembros afectados.
3. No hemos hallado mutaciones en oncogenes, genes reparadores, genes supresores tumorales u otros múltiples genes previamente descritos en la literatura como posiblemente causantes del FNTMC en las familias estudiadas.
4. No hemos encontrado mutaciones en el gen del complejo telómero-telomerasa *POT1* que puedan considerarse asociadas al desarrollo del FNMTC.
5. Hemos identificado la variante p.Asp31His en *NOP53* presente en todos los miembros afectados de cáncer de tiroides en tres familias con FNMTC de 5, 4 y 2 miembros. Esta variante no fue encontrada en los controles sanos de la familia estudiados. No hemos encontrado ninguna otra variante en otros genes que estuviera presente en todos los integrantes afectados de más de una familia.

6. Los estudios de funcionalidad sugieren que *NOP53* podría ser un gen de susceptibilidad para el FNMTC, aunque se requieren más estudios para conocer los mecanismos y vías implicadas, así como para saber si su variante p.Asp31His está presente en otras familias afectas de FNMTC.

7. Consideramos que a día de hoy y con los datos existentes previamente y fruto de esta tesis doctoral, no estaría indicado el estudio genético de las familias con FNMTC, al no haber ningún gen claramente establecido como causante del FNMTC, a excepción de los FNMTC asociados a síndromes genéticos hereditarios.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

(La inclusión finaliza a fecha 18/10/2020).

1. Kasper D, Fauci A, Stephen H, Longo D, Jameson JL, Loscalzo J, editors. Harrison. Principios de Medicina Interna [Internet]. 19 ed. Madrid: McGraw Hill; 2016.
2. Atlas de histología [Internet]. Universidad de Zaragoza;2020 [citado 2 jul 2020]. Disponible en: http://wzar.unizar.es/acad/histologia/paginas/Atlas_inicio.htm
3. Udelsman R, Zhang Y. The epidemic of thyroid cancer in the united states: The role of endocrinologists and ultrasounds. *Thyroid*. 2014;24(3):472–9.
4. Frank C, Fallah M, Sundquist J, Hemminki A, Hemminki K. Population Landscape of Familial Cancer. *Sci Rep*. 2015 Aug 10;5:12891.
5. Eng C. Familial papillary thyroid cancer--many syndromes, too many genes?. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(5):1755-7.
6. Newey PJ. Clinical genetic testing in endocrinology: Current concepts and contemporary challenges. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2019; 91(5):587-607.
7. Vriens MR, Suh I, Moses W, Kebebew E. Clinical features and genetic predisposition to hereditary nonmedullary thyroid cancer. *Thyroid*. 2009;19(12):1343–9.
8. Klubo-Gwiedzinska J, Kushchayeva Y, Gara SK, Kebebew E. In: Mallick UK, Harmer C, Mazzaferri EL, Kendall-Taylor P, editors. *Practical Management of Thyroid Cancer: a multidisciplinary approach*. 2nd ed. London: Springer; 2008, p. 241-70.
9. Ngeow J, Mester J, Rybicki LA, Ni Y, Milas M, Eng C. Incidence and clinical characteristics of thyroid cancer in prospective series of individuals with cowden and cowden-like syndrome characterized by germline PTEN, SDH, or KLLN alterations. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(12):2063–71.
10. Orloff MS, He X, Peterson C, Chen F, Chen JL, Mester JL, et al. Germline PIK3CA and AKT1 mutations in cowden and cowden-like syndromes. *Am J Hum Genet*. 2013;92(1):76–80.
11. Ngeow J, Ni Y, Tohme R, Chen FS, Bebek G, Eng C. Germline alterations in

- RASAL1 in Cowden syndrome patients presenting with follicular thyroid cancer and in individuals with apparently sporadic epithelial thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(7):1316–21.
12. Yehia L, Niazi F, Ni Y, Ngeow J, Sankunny M, Liu Z, et al. Germline heterozygous variants in SEC23B are associated with cowden syndrome and enriched in apparently sporadic thyroid cancer. *Am J Hum Genet* 2015;97(5):661–76.
 13. Wasserman JD, Sabbaghian N, Fahiminiya S, Chami R, Mete O, Acker M, et al. DICER1 Mutations Are Frequent in Adolescent-Onset Papillary Thyroid Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;103(5):2009–15.
 14. Cancer of the Thyroid. *Cancer Stat Facts*, <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/thyro.html/>; 2016 [consultada el 7 de abril de 2020].
 15. Charkes ND. On the prevalence of familial nonmedullary thyroid cancer in multiply affected kindreds. *Thyroid.* 2006;16(2):181–6.
 16. Moses W, Weng J, Kebebew E. Prevalence, clinicopathologic features, and somatic genetic mutation profile in familial versus sporadic nonmedullary thyroid cancer. *Thyroid.* 2011;21(4):367–71.
 17. Cao J, Chen C, Chen C, Wang QL, Ge MH. Clinicopathological features and prognosis of familial papillary thyroid carcinoma - A large-scale, matched, case-control study. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2016;84(4):598–606.
 18. Zhou YM, Luo H, Gou JX, Zhao WJ, Dai WY, Zhu J, et al. Second generation of familial nonmedullary thyroid carcinoma: A meta-analysis on the clinicopathologic features and prognosis. *Eur J Surg Oncol.* 2017; 43(12):2248-56.
 19. Wang X, Cheng W, Li J, Su A, Wei T, Liu F, et al. Familial nonmedullary thyroid carcinoma is a more aggressive disease: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Endocrinol.* 2015;172(6):R253–62.
 20. Zhang YB, Wang XX, Zhang XW, Li ZJ, Liu J, Xu ZG, et al. Familial Nonmedullary Thyroid Carcinoma: A Retrospective Analysis of 117 Families. *Chin Med J (Engl).* 2018;131(4):395-401.
 21. Muallem Kalmovich L, Jabarin B, Koren S, Or K, Marcus E, Tkacheva I, et al. Is

- Familial Nonmedullary Thyroid Cancer A More Aggressive Type of Thyroid Cancer? *Laryngoscope*. 2020 Aug 6. doi: 10.1002/lary.28989. Epub ahead of print.
22. Merino MJ, Merkel R, Yang L, Nilubol N, Sadowski SM, Kebebew E, et al. Results of Screening in Familial Non-Medullary Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2017; 27(8):1017-24.
 23. Fallah M, Pukkala E, Tryggvadottir L, Olsen JH, Tretli S, Sundquist K, et al. Risk of thyroid cancer in first-degree relatives of patients with non-medullary thyroid cancer by histology type and age at diagnosis: A joint study from five nordic countries. *J Med Genet*. 2013;50(6):373–82.
 24. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty G, Mandel SJ, Nikiforov YE, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2016;26(1):1-133.
 25. Triponez F, Wong M, Sturgeon C, Caron N, Ginzinger DG, Segal MR, et al. Does familial non-medullary thyroid cancer adversely affect survival? *World J Surg*. 2006;30(5):787–93.
 26. Lee YM, Jeon MJ, Kim WW, Chung KW, Baek JH, Shong YK, et al. Comparison Between Familial and Sporadic Non-medullary Thyroid Carcinoma: A Retrospective Individual Risk Factor-Matched Cohort Study. *Ann Surg Oncol*. 2020 Aug 14. doi: 10.1245/s10434-020-09025-0. Epub ahead of print.
 27. Lakis M El, Giannakou A, Nockel PJ, Gara SK, Patel D, Sater ZA, et al. HHS Public Access. 2019;165(1):50–7.
 28. Kim YS, Seo M, Park SH, Ju SY, Kim ES. Should Total Thyroidectomy Be Recommended for Patients with Familial Non-medullary Thyroid Cancer? *World J Surg*. 2020;44(9):3022-3027.
 29. Sippel RS, Caron NR, Clark OH. An evidence-based approach to familial nonmedullary thyroid cancer: screening, clinical management, and follow-up. *World J Surg*. 2007;31(5):924–33.
 30. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, et al. Revised American thyroid association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid*. 2009;19(11):1167–

- 214.
31. Vriens MR, Sabanci Ü, Epstein HD, Ngai S, Duh QY, Siperstein AE, et al. Reliability of fine-needle aspiration in patients with familial nonmedullary thyroid cancer. *Thyroid*. 1999;9(10):1011–6.
 32. Nixon IJ, Suárez C, Simo R, Sanabria A, Angelos P, Rinaldo A, et al. The Impact of Family History on Non-Medullary Thyroid Cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2016;42(10):1455–63.
 33. Bevan S, Pal T, Greenberg CR, Green H, Wixey J, Bignell G, et al. A comprehensive analysis of MNG1, TCO1, fPTC, PTEN, TSHR, and TRKA in familial nonmedullary thyroid cancer: Confirmation of linkage to TCO1. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(8):3701–4.
 34. Yang SP, Ngeow J. Familial non-medullary thyroid cancer: Unraveling the genetic maze. *Endocr Relat Cancer*. 2016;23(12):R577-R595.
 35. Gudmundsson J, Sulem P, Gudbjartsson DF, Jonasson JG, Sigurdsson A, Bergthorsson JT, et al. Common variants on 9q22.33 and 14q13.3 predispose to thyroid cancer in European populations. *Nat Genet*. 2009;41(4):460–4.
 36. Saenko VA, Rogounovitch TI. Genetic polymorphism predisposing to differentiated thyroid cancer: A review of major findings of the genome-wide association studies. *Endocrinol Metab*. 2018;33(2):164–74.
 37. Pereira JS, da Silva JG, Tomaz RA, Pinto AE, Bugalho MJ, Leite V, et al. Identification of a novel germline FOXE1 variant in patients with familial non-medullary thyroid carcinoma (FNMTTC). *Endocrine*. 2015;49(1):204–14.
 38. Kumar A, Bandapalli OR, Paramasivam N, Giangioffe S, Diquigiovanni C, Bonora E, et al. Familial Cancer Variant Prioritization Pipeline version 2 (FCVPPv2) applied to a papillary thyroid cancer family. *Sci Rep*. 2018;8(1):11635.
 39. Hińcza K, Kowalik A, Kowalska A. Current knowledge of germline genetic risk factors for the development of non-medullary thyroid cancer. *Genes (Basel)*. 2019;10(7):E482.
 40. Wójcicka A, Czetwertyńska M, Świerniak M, Dlugosińska J, Maciag M, Czajka A, et al. Variants in the ATM-CHEK2-BRCA1 axis determine genetic predisposition and clinical presentation of papillary thyroid carcinoma. *Genes*

- Chromosom Cancer. 2014;53(6):516–23.
41. Gu Y, Yu Y, Ai L, Shi J, Liu X, Sun H, et al. Association of the ATM gene polymorphisms with papillary thyroid cancer. *Endocrine*. 2014;45(3):454–61.
 42. Siótek M, Cybulski C, Gąsior-Perczak D, Kowalik A, Kozak-Klonowska B, Kowalska A, et al. CHEK2 mutations and the risk of papillary thyroid cancer. *Int J Cancer*. 2015;137(3):548–52.
 43. Ryu RA, Tae K, Min HJ, Jeong JH, Cho SH, Lee SH, et al. XRCC1 polymorphisms and risk of papillary thyroid carcinoma in a Korean sample. *J Korean Med Sci*. 2011;26(8):991–5.
 44. Akulevich NM, Saenko VA, Rogounovitch TI, Drozd VM, Lushnikov EF, Ivanov VK, et al. Polymorphisms of DNA damage response genes in radiation-related and sporadic papillary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer*. 2009;16(2):491–503.
 45. Ngan ESW, Lang BHH, Liu T, Shum CKY, So MT, Lau DKC, et al. A germline mutation (A339V) in thyroid transcription factor-1 (TTF-1/NKX2.1) in patients with multinodular goiter and papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(3):162–75.
 46. Cantara S, Capuano S, Formichi C, Pisu M, Capezzone M, Pacini F. Lack of germline A339V mutation in thyroid transcription factor-1 (TTF-1/NKX2.1) gene in familial papillary thyroid cancer. *Thyroid Res*. 2010;3(1):4.
 47. Bonora E, Rizzato C, Diquigiovanni C, Oudot-Mellakh T, Campa D, Vargiolu M, et al. The FOXE1 locus is a major genetic determinant for familial nonmedullary thyroid carcinoma. *Int J Cancer*. 2014;134(9):2098–107.
 48. Wong K, Ren XR, Huang YZ, Xie Y, Liu G, Saito H, et al. Signal transduction in neuronal migration: Roles of GTPase activating proteins and the small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway. *Cell*. 2001;107(2):209–21.
 49. He H, Bronisz A, Liyanarachchi S, Nagy R, Li W, Huang Y, et al. SRGAP1 is a candidate gene for papillary thyroid carcinoma susceptibility. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(5):973–80.
 50. Choi-Miura NH, Yoda M, Saito K, Takahashi K, Tomita M. Identification of the substrates for plasma hyaluronan binding protein. *Biol Pharm Bull*. 2001;24(2):140–3.

51. Gara SK, Jia L, Merino MJ, Agarwal SK, Zhang L, Cam M, et al. Germline HBP2 Mutation Causing Familial Nonmedullary Thyroid Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(5):448–55.
52. Zhang T, Xing M. HBP2 G534E Mutation in Familial Nonmedullary Thyroid Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2016;108(6):7–9.
53. Alzahrani AS, Murugan AK, Qasem E, Al-Hindi H. HBP2 Gene Mutations Do Not Cause Familial or Sporadic Non-Medullary Thyroid Cancer in a Highly Inbred Middle Eastern Population. *Thyroid*. 2016;26(5):667–71.
54. Cazabat L, Terray A, de Mazancourt P, Ropers J, Groussin L, Raffin-Sanson ML. Next Generation Sequencing and Association Studies in Familial Nonmedullary Thyroid Carcinoma: Let's Choose Appropriate Controls. *Eur Thyroid J*. 2017;6(4):221-4.
55. Tomsic J, He H, Akagi K, Liyanarachchi S, Pan Q, Bertani B, et al. A germline mutation in SRRM2, a splicing factor gene, is implicated in papillary thyroid carcinoma predisposition. *Sci Rep*. 2015;5:10566:1-13.
56. De Lange T. Telomere-related genome instability in cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2005;70:197–204.
57. Cantara S, Capuano S, Capezzone M, Benigni M, Pisu M, Marchisotta S, et al. Lack of mutations of the telomerase RNA component in familial papillary thyroid cancer with short telomeres. *Thyroid*. 2012;22(4):363–8.
58. Liu R, Xing M. TERT promoter mutations in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2016;23(3):143-55.
59. Capezzone M, Cantara S, Marchisotta S, Filetti S, De Santi MM, Rossi B, et al. Short telomeres, telomerase reverse transcriptase gene amplification, and increased telomerase activity in the blood of familial papillary thyroid cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(10):3950–7.
60. Wang Y, Liyanarachchi S, Miller KE, Nieminen TT, Comiskey DF Jr, Li W, et al. Identification of Rare Variants Predisposing to Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2019;29(7):946-55.
61. He H, Li W, Comiskey DF, Liyanarachchi S, Nieminen TT, Wang Y, et al. A Truncating Germline Mutation of TINF2 in Individuals with Thyroid Cancer or Melanoma Results in Longer Telomeres. *Thyroid*. 2020;30(2):204-13.

62. Jendrzewski J, Tomsic J, Lozanski G, Labanowska J, He H, Liyanarachchi S, et al. Telomere length and telomerase reverse transcriptase gene copy number in patients with papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(11):1876–80.
63. He M, Bian B, Gesuwan K, Gulati N, Zhang L, Nilubol N, et al. Telomere length is shorter in affected members of families with familial nonmedullary thyroid cancer. *Thyroid.* 2013;23(3):301–7.
64. Liu C, Yu Y, Yin G, Zhang J, Wen W, Ruan X, et al. C14orf93 (RTFC) is identified as a novel susceptibility gene for familial nonmedullary thyroid cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;482(4):590–6.
65. Ye F, Gao H, Xiao L, Zuo Z, Liu Y, Zhao Q, et al. Whole exome and target sequencing identifies MAP2K5 as novel susceptibility gene for familial non-medullary thyroid carcinoma. *Int J Cancer.* 2019;144(6):1321–30.
66. Cirello V, Colombo C, Persani L, Fugazzola L. Absence of the MAP2K5 germline variants c.G961A and c.T1100C in a wide series of familial nonmedullary thyroid carcinoma Italian families. *Int J Cancer.* 2019;145(2):600.
67. Bann D V., Jin Q, Sheldon KE, Houser KR, Nguyen L, Warrick JI, et al. Genetic variants implicate dual oxidase-2 in familial and sporadic nonmedullary thyroid cancer. *Cancer Res.* 2019;79(21):5490–9.
68. Luzón-Toro B, Fernández RM, Villalba-Benito L, Torroglosa A, Antiñolo G, Borrego S. Influencers on Thyroid Cancer Onset: Molecular Genetic Basis. *Genes (Basel).* 2019;10(11):913.
69. Pishkari S, Paryan M, Hashemi M, Baldini E, Mohammadi-Yeganeh S. The role of microRNAs in different types of thyroid carcinoma: a comprehensive analysis to find new miRNA supplementary therapies. *J Endocrinol Invest.* 2018;41(3):269–83.
70. Xiong Y, Zhang L, Holloway AK, Wu X, Su L, Kebebew E. MiR-886-3p regulates cell proliferation and migration, and is dysregulated in familial non-medullary thyroid cancer. *PLoS One.* 2011;6(10):1–11.
71. Pinheiro M, Lupinacci FCS, Santiago KM, Drigo SA, Marchi FA, Fonseca-Alves CE, et al. Germline Mutation in MUS81 Resulting in Impaired Protein Stability is Associated with Familial Breast and Thyroid Cancer. *Cancers (Basel).*

- 2020;12(5):1289.
72. Sarquis M, Moraes DC, Bastos-Rodrigues L, Azevedo PG, Ramos AV, Reis FV, et al. Germline Mutations in Familial Papillary Thyroid Cancer. *Endocr Pathol.* 2020;31(1):14-20.
 73. Pasquali D, Torella A, Accardo G, Esposito D, Del Vecchio Blanco F, Salvatore D, et al. BROX haploinsufficiency in familial nonmedullary thyroid cancer. *J Endocrinol Invest.* 2020 May 8. doi: 10.1007/s40618-020-01286-6.
 74. Wilson TL, Hattangady N, Lerario AM et al (2017) A new POT1 germline mutation-expanding the spectrum of POT1-associated cancers. *Fam Cancer.* 2017;16(4):561-6.
 75. ExAC Browser [Internet]. 2020 [citado 2 jul 2020]. Disponible en: <http://exac.broadinstitute.org/>
 76. Ammar SA, Alobuia WM, Kebebew E. An update on familial nonmedullary thyroid cancer. *Endocrine.* 2020;68(3):502-7.
 77. Capezzone M, Robenshtok E, Cantara S, Castagna MG. Familial non-medullary thyroid cancer: a critical review. *J Endocrinol Invest.* 2020 Oct 6. doi: 10.1007/s40618-020-01435-x. Epub ahead of print.
 78. Donati B, Ciarrocchi A. Telomerase and Telomeres Biology in Thyroid Cancer. *Int J Mol Sci.* 2019;20(12):2887.
 79. Calvete O, Garcia-Pavia P, Domínguez F, Bougeard G, Kunze K, Braeuninger A, et al. The wide spectrum of POT1 gene variants correlates with multiple cancer types. *Eur J Hum Genet.* 2017;25(11):1278-81.
 80. Wong K, Robles-Espinoza CD, Rodriguez D, Rudat SS, Puig S, Potrony M, et al. Association of the POT1 germline missense variant p.I78T with familial melanoma. *JAMA Dermatol.* 2019;155(5):604-9.
 81. Richard MA, Lupo PJ, Morton LM, Yasui YA, Sapkota YA, Arnold MA, et al. Genetic variation in POT1 and risk of thyroid subsequent malignant neoplasm: A report from the Childhood Cancer Survivor Study. *PLoS One.* 2020;15(2):e0228887.
 82. Potrony M, Puig-Butille JA, Ribera-Sola M, Iyer V, Robles-Espinoza CD, Aguilera P, et al. POT1 germline mutations but not TERT promoter mutations are implicated in melanoma susceptibility in a large cohort of Spanish melanoma

- families. *Br J Dermatol*. 2019;181(1):105-13.
83. Srivastava A, Miao B, Skopelitou D, Kumar V, Kumar A, Paramasivam N, et al. A Germline Mutation in the POT1 Gene Is a Candidate for Familial Non-Medullary Thyroid Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020;12(6):E1441.
84. Rusinek D, Pfeifer A, Krajewska J, Oczko-Wojciechowska M, Handkiewicz-Junak D, Pawlaczek A, et al. Coexistence of TERT Promoter Mutations and the BRAF V600E Alteration and Its Impact on Histopathological Features of Papillary Thyroid Carcinoma in a Selected Series of Polish Patients. *Int J Mol Sci*. 2018;19(9):2647.
85. Goggins W, Daniels GH, Tsao H. Elevation of thyroid cancer risk among cutaneous melanoma survivors. *Int J Cancer*. 2006;118(1):185-8.
86. Kim JY, An YM, Park JH. Role of GLTSCR2 in the regulation of telomerase activity and chromosome stability. *Mol Med Rep*. 2016;14(2):1697-703.
87. Earp BD. The need for reporting negative results - a 90 year update. *J Clin Transl Res*. 2017;3(Suppl 2):344-7.
88. Takada H, Kurisaki A. Emerging roles of nucleolar and ribosomal proteins in cancer, development, and aging. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(21):4015-25.
89. Lee S, Ahn YM, Kim JY, Cho YE, Park JH. Downregulation of NOP53 Ribosome Biogenesis Factor Leads to Abnormal Nuclear Division and Chromosomal Instability in Human Cervical Cancer Cells. *Pathol Oncol Res*. 2020;26(1):453-9.
90. Lee S, Kim JY, Kim YJ, Seok KO, Kim JH, Chang YJ, et al. Nucleolar protein GLTSCR2 stabilizes p53 in response to ribosomal stresses. *Cell Death Differ*. 2012;19(10):1613-22.
91. Kotian S, Zhang L, Boufraquech M, Gaskins K, Gara SK, Quezado M, et al. Dual Inhibition of HDAC and Tyrosine Kinase Signaling Pathways with CUDC-907 Inhibits Thyroid Cancer Growth and Metastases. *Clin Cancer Res*. 2017;23(17):5044-54.
92. Xing M. Genetic alterations in the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Thyroid*. 2010;20(7):697-706.
93. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417(6892):949-54.
94. Srivastava A, Kumar A, Giangioffe S, Bonora E, Hemminki K, Försti A, et al.

- Whole Genome Sequencing of Familial Non-Medullary Thyroid Cancer Identifies Germline Alterations in MAPK/ERK and PI3K/AKT Signaling Pathways. *Biomolecules*. 2019;9(10):605.
95. Zhu J, Wu K, Lin Z, Bai S, Wu J, Li P, et al. Identification of susceptibility gene mutations associated with the pathogenesis of familial nonmedullary thyroid cancer. *Mol Genet Genomic Med*. 2019;7(12):e1015.
96. Chen H, Duo Y, Hu B, Wang Z, Zhang F, Tsai H, et al. PICT-1 triggers a pro-death autophagy through inhibiting rRNA transcription and AKT/mTOR/p70S6K signaling pathway. *Oncotarget*. 2016;7(48):78747-63.
97. Okahara F, Ikawa H, Kanaho Y, Maehama T. Regulation of PTEN phosphorylation and stability by a tumor suppressor candidate protein. *J Biol Chem* 2004;279:45300-03
98. Yim JH, Kim YJ, Ko JH, Cho YE, Kim SM, Kim JY, et al. The putative tumor suppressor gene GLTSCR2 induces PTEN-modulated cell death. *Cell Death Differ*. 2007;14(11):1872-9.
99. Kim JY, Kim HS, Lee S, Park JH. The expression of GLTSCR2, a candidate tumor suppressor, is reduced in seborrheic keratosis compared to normal skin. *Pathol Res Pract*. 2010;206(5):295-9.
100. Kim JY, Seok KO, Kim YJ, Bae WK, Lee S, Park JH. Involvement of GLTSCR2 in the DNA Damage Response. *Am J Pathol*. 2011;179(3):1257-64.
101. Liu X, Qu S, Liu R, Sheng C, Shi X, Zhu G, et al. TERT promoter mutations and their association with BRAF V600E mutation and aggressive clinicopathological characteristics of thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(6):E1130-6.
102. Marques IJ, Moura MM, Cabrera R, Pinto AE, Simões-Pereira J, Santos C, et al. Identification of somatic TERT promoter mutations in familial nonmedullary thyroid carcinomas. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2017;87(4):394-9.
103. Yoshimoto M, Tokuda A, Nishiwaki K, Sengoku K, Yaginuma Y. Abnormal Expression of PICT-1 and Its Codon 389 Polymorphism Is a Risk Factor for Human Endometrial Cancer. *Oncology*. 2018;95(1):43-51.
104. Cho YE, Lee HL, Lim SJ, Kim YW, Choe BK, Lee S, et al. Suppression of GLTSCR2 expression in renal cell carcinomas. *Pathol Res Pract*. 2016;212(2):120-4.
105. Moon A, Lim SJ, Jo YH, Lee S, Kim JY, Lee J, et al. Downregulation of GLTSCR2

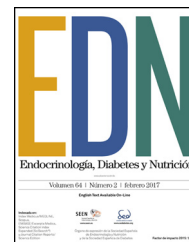
- expression is correlated with breast cancer progression. *Pathol Res Pract.* 2013;209(11):700-4.
106. Uchi R, Kogo R, Kawahara K, Sudo T, Yokobori T, Eguchi H, et al. PICT1 regulates TP53 via RPL11 and is involved in gastric cancer progression. *Br J Cancer.* 2013;109(8):2199-206.
107. Genome aggregation database [Internet]. 2020 [citado 2 jul 2020]. Disponible en: <https://gnomad.broadinstitute.org/>
108. Williams MD, Zhang L, Elliott DD, Perrier ND, Lozano G, Clayman GL, et al. Differential gene expression profiling of aggressive and nonaggressive follicular carcinomas. *Hum Pathol.* 2011;42(9):1213-20.
109. Loveday C, Josephs K, Chubb D, Gunning A, Izatt L, Tischkowitz M, et al. p.Val804Met, the Most Frequent Pathogenic Mutation in RET, Confers a Very Low Lifetime Risk of Medullary Thyroid Cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;103(11):4275-82.
110. Bauer AJ. Clinical behavior and genetics of nonsyndromic, familial nonmedullary thyroid cancer. *Front Horm Res.* 2013;41:141-8.
111. Hemminki K, Eng C, Chen B. Familial risks for nonmedullary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(10):5747-53.
112. Hemminki K, Li X, Czene K. Familial risk of cancer: data for clinical counseling and cancer genetics. *Int J Cancer.* 2004;108(1):109-14.
113. Hemminki K, Eng C. Clinical genetic counselling for familial cancers requires reliable data on familial cancer risks and general action plans. *J Med Genet.* 2004;41(11):801-7.
114. Dammann M, Weber F. Personalized medicine: caught between hope, hype and the real world. *Clinics (Sao Paulo).* 2012;67(Suppl 1):91-7.
115. Evans DG, Susnerwala I, Dawson J, Woodward E, Maher ER, Lalloo F. Risk of breast cancer in male BRCA2 carriers. *J Med Genet.* 2010;47(10):710-1.

ANEXO 1



Endocrinología, Diabetes y Nutrición

www.elsevier.es/endo



REVISIÓN

Carcinoma diferenciado de tiroides familiar: más allá de las formas sindrómicas

Aida Orois^{a,b,*}, Mireia Mora^{b,c,d,e}, Irene Halperin^b y Josep Oriola^{c,d,f}

^a Servicio de Endocrinología y Nutrición, Hospital Universitari Mútua de Terrassa, Terrassa, Barcelona, España

^b Servicio de Endocrinología y Nutrición, ICMDM, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, España

^c Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, España

^d Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona, Barcelona, España

^e Centro de Investigación Biomédica en Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, España

^f Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, CDB, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, España

Recibido el 7 de abril de 2020; aceptado el 17 de agosto de 2020

PALABRAS CLAVE

Cáncer de tiroides;
Familiar;
Genética;
Mutaciones
germinales;
No medular

Resumen El carcinoma diferenciado de tiroides familiar se define como la presencia de cáncer de tiroides no medular en dos o más familiares de primer grado, en ausencia de otros factores predisponentes. Representa hasta el 9% de los cánceres diferenciados de tiroides, y solo una minoría aparece en el seno de síndromes hereditarios bien conocidos que asocian el cáncer de tiroides, entre otras múltiples manifestaciones clínicas. Sin embargo, en más del 95% de los casos, el cáncer de tiroides aparece de manera aislada, y sus causas genéticas aún están por dilucidar. En esta revisión resumimos el estado actual del conocimiento de las bases genéticas de esta patología, así como sus características clínicas. La comprensión de los mecanismos genéticos implicados ayudaría a esclarecer las vías metabólicas involucradas, con la consiguiente potencial aplicación terapéutica. Además, permitiría ofrecer consejo genético y focalizar nuestros esfuerzos en los pacientes susceptibles de padecer la patología.

© 2020 SEEN y SED. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Thyroid cancer;
Familial;
Genetics;
Germline mutations;
Non-medullary

Familial non medullary thyroid carcinoma: Beyond the syndromic forms

Abstract Familial non-medullary thyroid cancer is defined as the presence of non-medullary thyroid cancer in two or more first-degree relatives, in the absence of other predisposing factors. It represents up to 9% of differentiated thyroid cancers, and only a minority appears in well-known hereditary syndromes that associate thyroid cancer among many other clinical

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: aorois@clinic.cat (A. Orois).

manifestations. However, in more than 95% of cases, thyroid cancer appears isolated, and its genetic causes have yet to be elucidated. We review here the current knowledge of the genetic basis of this pathology, as well as its clinical characteristics. Understanding the genetic mechanisms implied would help to comprehend the metabolic pathways involved, with the consequent potential therapeutic application. In addition, it would allow genetic counseling and to focus our efforts on patients at risk of developing this disorder.

© 2020 SEEN y SED. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

El cáncer de tiroides es la neoplasia endocrina más común, representando actualmente el quinto cáncer más frecuente en mujeres en EE. UU.¹ El 95% de las neoplasias de tiroides son carcinomas diferenciados de tiroides (CDT), derivados de las células foliculares: los carcinomas papilares (aproximadamente el 80% de los casos), los carcinomas foliculares (15%) y otros tipos de cáncer menos frecuentes (< 5%). El 5% de neoplasias de tiroides restantes derivan de las células C o parafoliculares, productoras de calcitonina, ocasionando los carcinomas medulares de tiroides (CMT)².

Existen familias en las que concurren varios pacientes afectados de cáncer de tiroides. Su abordaje asistencial integral, que posiblemente incluye asesoramiento genético, requiere conocer las bases genéticas de la enfermedad. En el caso del CMT familiar (hasta un 25% de los CMT), se sabe que el protooncogén RET es el principal protagonista implicado³. La presencia de mutaciones germinales en RET se asocia con el CMT hereditario o la neoplasia endocrina múltiple tipo 2, con un patrón de herencia autosómica dominante (HAD). En los últimos años, se ha avanzado mucho en el conocimiento genético de esta patología, e incluso se ha podido establecer una estrecha correlación genotipo-fenotipo⁴. Sin embargo, en esta revisión nos centraremos en el carcinoma familiar no medular, cuya base hereditaria conocemos mucho menos.

El primer paso es definir esta entidad: el carcinoma diferenciado (o no medular) de tiroides familiar, también conocido como FNMTC (*familial non-medullary thyroid cancer*), se define por la presencia de esta neoplasia en dos o más familiares de primer grado, siempre y cuando no haya otros factores predisponentes como radiación o deficiencia de yodo⁵.

En segundo lugar, debemos saber que la prevalencia de FNMTC no es desdeñable: se estima que hasta el 9% de los carcinomas no medulares de tiroides presentan un componente hereditario⁵. Por tanto, es lo suficientemente frecuente como para que identifiquemos algunos casos en nuestro ámbito clínico; y al mismo tiempo es tan infrecuente como para que debamos aunar esfuerzos multicéntricos con el fin de reunir una casuística que permita avanzar en su investigación.

En tercer lugar, una vez identificados los posibles FNMTC, debemos distinguir entre los casos síndromicos y no síndromicos. Es decir, ¿el FNMTC se presenta de manera aislada, o bien es parte del espectro fenotípico de un síndrome? En el

95% de los casos estaremos ante un FNMTC no síndromico. No obstante, alrededor del 5% de los casos de FNMTC aparece en el seno de síndromes genéticos bien caracterizados⁶, que debemos conocer por sus posibles repercusiones sistémicas, que exigen un abordaje multidisciplinar. El objetivo de la presente revisión es resumir el conocimiento que existe hasta la actualidad sobre las bases genéticas del FNMTC, centrándonos en el no síndromico. Para ello, se procedió a la búsqueda bibliográfica en la base de datos MEDLINE, y se seleccionaron las revisiones o artículos originales más relevantes publicados durante los últimos 20 años (1999-2020), en relación con este tema. Las palabras clave empleadas en la búsqueda fueron «*thyroid cancer*», «*familial*», «*genetics*», «*germline mutations*» y «*non-medullary*».

Carcinoma no medular de tiroides familiar síndromico

Hoy en día se reconocen los siguientes cinco síndromes que cursan con FNMTC, cuyos genes involucrados ya han sido descritos y que repasaremos a continuación someramente (tabla 1). En otros síndromes como el McCune-Albright, el Peutz-Jeghers o el de ataxia-telangiectasia, se ha sugerido asimismo una predisposición al cáncer diferenciado de tiroides no medular, pero ésta no se encuentra claramente establecida.

Síndrome de Gardner [MIM: 175100]

El síndrome de Gardner es un síndrome de HAD, causado por mutaciones germinales en el gen supresor tumoral APC (cromosoma 5q21). Se trata de una variante de la poliposis adenomatosa familiar, en la que además concurren manifestaciones extracolónicas. Clínicamente cursa con poliposis/neoplasia colónica, osteomas, quistes epidermoides y tumores dermoides, entre otros. Entre un 2-12% de los pacientes pueden desarrollar CDT, habitualmente a edades jóvenes, y como primera manifestación del síndrome hasta en un tercio de los casos. Concretamente se asocia a la variante cribiforme-morular del carcinoma papilar, por lo que ante cualquier paciente con dicha histología debemos descartar que no se trate de la manifestación inicial de un síndrome de Gardner⁷.

Tabla 1 Síndromes hereditarios asociados con FNMTC

Síndrome	Gen causante (locus)	Herencia	Manifestaciones tiroideas	Penetrancia del cáncer de tiroides	Manifestaciones extratiroideas fundamentales
Síndrome de Gardner	<i>APC</i> (5q21)	HAD	CPT (variante cribiforme-morular)	≈ 2-12%	Poliposis/neoplasia colónica, osteomas, quistes epidermoides
Síndrome de Cowden	<i>PTEN</i> (10q22)	HAD	BMN, CDT (sobre todo CFT)	≈ 14% (hasta el 66% con patología benigna)	Cáncer de endometrio y mama
Complejo de Carney	<i>PRKAR1A</i> (17q22-24)	HAD	Adenomas foliculares y CDT	≈ 5% (hasta el 15% con patología benigna)	Hiperpigmentación cutánea, mixomas múltiples, otras patologías endocrinas
Síndrome de DICER1	<i>DICER1</i> (14q32)	HAD	CDT en la infancia, también BMN	Muy infrecuente	Blastoma pleuropulmonar, nefroma, tumores ováricos
Progeria o Síndrome de Werner	<i>WRN</i> (8p11-12)	HAR	CDT	≈ 20%	Envejecimiento prematuro, talla baja

BMN: bocio multinodular; CDT: carcinomas diferenciados de tiroides; CFT: carcinomas foliculares de tiroides; CPT: carcinomas papilares de tiroides; HAD: herencia autosómica dominante; HAR: herencia autosómica recesiva.

Síndrome de Cowden [MIM: 158350]

Éste es un síndrome de HAD asociado a mutaciones inactivadoras en línea germinal en el gen supresor *PTEN* (cromosoma 10q22). Los pacientes padecen múltiples hamartomas y mayor riesgo de cáncer de endometrio y mama, y hasta 2/3 de los pacientes tienen patología tiroidea, principalmente bocio multinodular (BMN) y CDT (este último en un 3-14% de los casos, y fundamentalmente de estirpe folicular)⁷. En pacientes en los que no se hallan mutaciones en *PTEN* (hasta un 15%), deberían considerarse otros genes más infrecuentemente asociados al síndrome de Cowden, tales como *SDHB-D*, la hipermetilación del promotor de *KLLN*⁸; *PIK3CA* y *AKT1*⁹; *RASAL1*¹⁰ y *SEC23B*¹¹.

Complejo de Carney [MIM: 160980]

Se trata de un síndrome de HAD debido a mutaciones germinales en el gen supresor *PRKAR1A* (cromosoma 17q22-24), que provoca hiperpigmentación cutánea (a destacar léntigos y nevus azules), mixomas en múltiples localizaciones y patología endocrina hipofisaria, suprarrenal, gonadal, y/o tiroidea. Hasta un 15% de los afectados pueden presentar adenomas y más raramente carcinomas de tiroides. No ha de confundirse con el término «tríada de Carney» (asociación de tumor del estroma gastrointestinal [GIST] + condroma pulmonar + paraganglioma)⁷.

Síndrome de *DICER1* [MIM: 606241]

De HAD, y de descripción más reciente, se relaciona con mutaciones germinales en *DICER1* (cromosoma 14q32), que codifica una ribonucleasa, predisponiendo a múltiples tumores en la infancia como el blastoma pleuropulmonar, así

como al bocio multinodular (BMN) y CDT. Es un gen a tener en cuenta fundamentalmente en las neoplasias tiroideas en edad pediátrica¹².

Progeria o síndrome de Werner [MIM: 277700]

Es el único de estos síndromes de herencia autosómica recesiva (HAR), originado por mutaciones en el gen *WRN* (cromosoma 8p11-12), que codifica una helicasa implicada en el mantenimiento de los telómeros. Sus características clínicas incluyen talla baja, múltiples neoplasias (entre ellas de tiroides, hasta en un 20% de los casos), y lo más distintivo: un envejecimiento prematuro. Es muy infrecuente fuera de Japón⁷.

Carcinoma no medular de tiroides familiar, no sindrómico

La mayoría de nuestros pacientes con cáncer de tiroides presentan subtipos histológicos no medulares (mayoritariamente carcinomas papilares o foliculares), que en aproximadamente el 9% presentan antecedentes familiares. Excluyendo los pocos que aparecen en el seno de los síndromes comentados, el resto son no sindrómicos, y su genética está aún por dilucidar. Seguidamente, revisaremos las características clínicas de los FNMTC no sindrómicos, para posteriormente centrarnos en los genes de susceptibilidad descritos hasta la fecha.

Características clínicas

Hace más de 10 años que el FNMTC es reconocido como una enfermedad con entidad propia, que representa aproximadamente el 3,2-6,2% de todos los cánceres de tiroides⁵. Sin

embargo, y dada la alta prevalencia e incidencia de cáncer de tiroides en la población general (se diagnostican 15,8 nuevos casos/100.000 habitantes/año¹³), surge la duda de si en realidad la presencia de dos o más casos de cáncer no medular de tiroides en una misma familia no podrían deberse al azar. Tras un complejo análisis estadístico, Charkes¹⁴ concluyó que alrededor del 62% de las familias con dos casos pueden tratarse de fenocopias (dos casos esporádicos asociados por azar). En cambio, si hay tres miembros afectados, la probabilidad de que sea realmente hereditario es del 96%.

Se ha observado que el FNMTTC presenta HAD, con expresividad variable y penetrancia incompleta. La mayoría de los FNMTTC son carcinomas papilares ($\approx 90\%$), seguidos de foliculares, al igual que en los carcinomas no medulares esporádicos. Dentro de la misma familia pueden coexistir diferentes variantes histológicas. Respecto a alteraciones moleculares a nivel somático, al comparar las muestras de tiroidectomía/punción aspiración con aguja fina (PAAF) de los pacientes con FNMTTC con las de los pacientes con CDT sin antecedentes familiares, no se observaron diferencias significativas en cuanto a frecuencia, ni tipo de mutaciones somáticas, con presencia de la mutación *BRAF* Val600Glu o mutaciones en *NRAS* o reordenamientos *RET/PTC* en un porcentaje muy similar de casos⁶. Esto va en favor de que las causantes de la enfermedad sean mutaciones en línea germinal, sin que las mutaciones somáticas jueguen un papel crucial en la tumorigénesis.

Globalmente, las características clínicas son similares, con una predominancia femenina en algunos estudios (proporción 2-3/1). Como rasgos diferenciales, el FNMTTC suele presentarse con una edad menor al diagnóstico, en torno a los 43 años –versus los 48 años del CDT esporádico–⁶. Incluso estudios recientes sugieren que la segunda generación de afectados por el FNMTTC podría presentar un «fenómeno de anticipación», con un diagnóstico a edad más temprana y una enfermedad más agresiva que en sus antecesores, sin descartar que en parte pueda ser debido a una más pronta observación de estas personas debido a sus antecedentes familiares. También habría mayor proporción de varones afectados^{15,16}.

Además, en el FNMTTC se ha descrito una mayor agresividad tumoral, según un metaanálisis de 2015 que incluyó 12 estudios con resultados bastante dispares¹⁷. Concretamente, se observó mayor presencia de adenopatías y extensión extratiroidea, mayor tasa de multifocalidad y de recurrencia, y menor supervivencia libre de progresión, especialmente en los estudios que incluyeron familias con al menos tres miembros afectados; las diferencias en las familias con sólo dos miembros afectados eran menos claras. En la misma línea, Ya-Bing Zhang et al.¹⁸ describen mayor agresividad en familias con tres o más miembros con FNMTTC, sugiriendo que posiblemente los estudios deberían focalizarse en estas familias con mayor número de pacientes afectados.

Se ha investigado la utilidad de llevar a cabo un cribado de CDT en personas con familiares que sufren esta enfermedad¹⁹. En este estudio prospectivo de cinco años, el CDT fue detectado por cribado en un 4,6% de los individuos en riesgo de familias de dos miembros afectados, mientras que en las familias de ≥ 3 miembros afectados, el cribado detectó un 22,7% de CDT, concluyéndose que esta búsqueda activa debería ser considerada en estas últimas. Es decir,

cuantas más personas afectas, mayor es el riesgo de que más miembros de la familia padezcan la patología, y estaría más indicado plantear una búsqueda activa²⁰. También documentaron que los FNMTTC detectados por cribado tenían menor tamaño tumoral, menor tasa de adenopatías y un tratamiento quirúrgico y de radioyodo menos agresivo que los casos índice¹⁹. Pese a todo, en las últimas guías de manejo del CDT de la *American Thyroid Association (ATA)*²¹, no se posicionan en favor o en contra del cribado familiar, ya que la reducción de la morbi-mortalidad no está demostrada. En realidad, esta demostración es poco factible en una enfermedad con una supervivencia a los 10 años del 95-97%. Triponez et al.²² compararon la supervivencia de pacientes con FNMTTC con la de sus familiares no afectados y con población general, y observaron una supervivencia más corta en los pacientes cuyas familias eran de tres o más miembros afectados. Sin embargo, no compararon con CDT esporádicos.

En cualquier caso, la mayoría de las publicaciones reconocen que la mayor agresividad del FNMTTC sigue siendo hoy un tema de debate debido a la heterogeneidad de los estudios, fundamentalmente retrospectivos. Esta controversia se extrapola al seguimiento y tratamiento de dichos tumores. Recientemente, se ha sugerido que el tratamiento quirúrgico inicial del FNMTTC debería ser más agresivo, una vez más, en familias con ≥ 3 miembros afectados²³. De hecho, en las últimas guías de manejo del CDT²¹ se aboga por la tiroidectomía total y la terapia con radioyodo en pacientes con antecedentes familiares de CDT. Algún estudio sugiere además que, dado que estos pacientes podrían tener más adenopatías, habría que considerar la realización de linfadenectomía central junto a la tiroidectomía total²⁴. Lo que no estaría indicado es la tiroidectomía total profiláctica, pues aún no hemos identificado las causas genéticas de la enfermedad que permitan detectar a los portadores, y además no existe una penetrancia completa. En cuanto a la PAAF, actualmente se recomienda en lesiones nodulares por encima de 1 cm²⁵ (en las anteriores guías de la ATA de 2009, se recomendaba también en nódulos subcentimétricos). Se ha descrito que la PAAF en los pacientes con FNMTTC podría tener más falsos negativos, dado que estos pacientes suelen tener una alta incidencia de enfermedad maligna multifocal, coexistente con nódulos benignos²⁶.

En resumen, parece razonable considerar la presencia de un componente familiar como un factor de riesgo más a tener en cuenta en el manejo personalizado del cáncer de tiroides²⁷, especialmente en familias con ≥ 3 miembros afectados, dada la alta probabilidad de que sea hereditario, y no por asociación casual; así como a la vista de los estudios que en este subgrupo han demostrado mayor agresividad tumoral y mayor beneficio de un cribado precoz.

Bases genéticas

Si bien el FNMTTC es una enfermedad relativamente poco prevalente, representa un esfuerzo de recursos significativo para el sistema nacional de salud, principalmente por el actual desconocimiento de sus determinantes hereditarios, y de sus posibles diferencias clínicas respecto a la enfermedad esporádica. Estas circunstancias dificultan su diagnóstico precoz (en estadios en los que el tratamiento es más resolutivo), y hace inviable el consejo genético que,

Tabla 2 Genes/familias de genes descritos en el FNMTc no sindrómico

Gen/es ^a	Locus	Conclusiones de los estudios más destacados
Reparadores de DNA: <i>ATM</i> , <i>CHEK2</i> , <i>XRCC1</i> , <i>XRCC3</i> <i>TITF-1</i> <i>FOXE1</i>	11q22.3, 22q12, 19q13.31, 14q32 respectivamente 14q13 9q22.33	rs17879961 en <i>CHEK2</i> (34), y el rs373759 en <i>ATM</i> (35) podrían conferir susceptibilidad a FNMTc Parece más relacionado con el BMN que con CDT (39,40) Hasta 23 SNPs que conferirían riesgo (41)→ Gen de susceptibilidad a FNMTc de baja penetrancia
<i>SRGAP1</i>	12q14	4 mutaciones <i>missense</i> que conferirían riesgo en 4 familias (43)→ Gen de susceptibilidad a FNMTc de baja penetrancia en algunas familias
<i>HABP2</i>	10q25.3	Variante Gly534GluE en una familia de 7 afectos (45)→ Posible gen de susceptibilidad, no demostrado en otras poblaciones
<i>SRRM2</i> Genes del complejo telomere-telomerase complex: TERT etc. <i>RTFC (C14orf93)</i>	16p13.3 varios 14q11.2	Controvertido (48) Poca consistencia entre estudios (50,53)
<i>MAP2K5</i>	15q23	Variante Val205Met en una familia de 5 afectos (55)→ Posible gen de susceptibilidad, no validado en otros estudios
<i>DUOX2</i>	15q21.1	Variante Ala321Thr y Met367Thr presentes en 2 familias (56) → resultados no replicados (57)
<i>NOP53</i>	19q13.33	Variante TyrY1203His en una familia de 6 afectos (58)→ Posible gen de susceptibilidad, no validado en otros estudios
		Variante AspD31His en 3 familias con FNMTc (61)→ Posible gen de susceptibilidad, no validado en otros estudios

^a Existen otros *loci* que se han asociado a FNMTc en los que aún no se han identificado los genes responsables, así como algunos microRNA que podrían estar relacionados con la aparición de FNMTc.

además del impacto sanitario, es una demanda creciente de la sociedad actual. Conocer la mutación implicada en una neoplasia genética tendría como consecuencia directa permitir el estudio familiar, identificar a las personas portadoras de la mutación, concentrar en estas personas los esfuerzos diagnósticos y terapéuticos, y poder incidir precozmente en el curso de estas neoplasias. Asimismo, se evitaría tener que seguir clínicamente a todos los familiares no portadores. Por otra parte, la historia científica reciente nos señala que la identificación de genes causales de neoplasias hereditarias ha permitido un enorme avance en el conocimiento de la oncogénesis en los casos esporádicos (mucho más prevalentes), en la identificación de componentes y vías de señalización celulares implicadas, y en el diseño de moléculas capaces de modular estas vías y ejercer acciones terapéuticas específicas. Por todo, el conocimiento de las bases genéticas de una patología como el FNMTc resulta relevante por las implicaciones directas que puede tener en la práctica asistencial.

Se han empleado distintas estrategias de búsqueda de los genes implicados en esta patología, que detallamos a continuación. En la [tabla 2](#) se resumen los principales genes candidatos identificados en la actualidad, y que describiremos posteriormente.

Estrategias de búsqueda empleadas

Se han desarrollado diversas estrategias para la búsqueda de genes candidatos responsables del FNMTc. Previamente

a la aparición de las técnicas de secuenciación modernas, se habían llevado a cabo:

a) Estudios de ligamiento (*linkage*). En genética se denomina ligamiento a la asociación física entre dos *loci* (esto es, su cercanía en una misma hebra de ADN, lo que repercute en una baja frecuencia de recombinación entre ellos durante la meiosis, y, por tanto, a una mayor probabilidad de herencia conjunta). En individuos con parentesco se mapean *loci* genéticos para encontrar alelos que se hereden ligados a la enfermedad de interés y determinar de manera indirecta la localización cromosómica del gen asociado a FNMTc. Es decir, este tipo de estudios son un método indirecto que usa marcadores genéticos (por ejemplo, microsátélites), ligados al gen de la enfermedad.

Los *loci* descritos hasta la fecha incluyen *TCO28* (19q13.2), *fPTC/PRN* (1q21), *FTEN* (8p23.1-p22), *NMTC1* (2q21), *MNG1* (14q32), 6q22, 8q24 y 4q32²⁹. Sin embargo, los genes candidatos ubicados en estos *loci* permanecen desconocidos.

b) Estudios de GWA (*genome-wide association*). Se estudian miles de polimorfismos comparando controles versus pacientes, a fin de encontrar polimorfismos de predisposición. Mediante esta técnica se han identificado, por ejemplo, dos polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), asociados a riesgo de FNMTc: rs944289 (localizado en 14q13.3, cerca de *NKX2-1*) y rs965513 (localizado en 9q22.33, cerca del gen candidato *FOXE1*)³⁰. Sin embargo, la mayoría de los estudios están realizados en CDT no familiar³¹.

c) Estudios dirigidos a genes candidatos o vías metabólicas específicas. Por ejemplo, Pereira et al.³² estudiaron directamente *FOXE1* en 60 familias con FNMTc en Portugal, encontrando una asociación entre variantes en línea germinal de este gen y la aparición de FNMTc en estas familias.

Sin embargo, en todos estos estudios los resultados han sido poco fructíferos, describiendo genes que podrían estar implicados en la etiología del FNMTc con baja penetrancia, y únicamente en algunas familias. Además, los resultados no se han replicado en sucesivas investigaciones.

d) Técnicas de secuenciación masiva. En los últimos años, se ha producido un gran avance en el campo de la genómica gracias a la mayor factibilidad, tanto técnica como económica, para realizar la secuenciación masiva del genoma. La secuenciación masiva (*next generation sequencing* [NGS]) ha conllevado un gran salto ya que ha supuesto pasar de examinar genes específicos a explorar genomas completos. Todo ello, además, de forma mucho más eficiente y rápida que con la secuenciación clásica de Sanger. De este modo se puede comparar, por ejemplo, cómo difiere el genoma de pacientes con una determinada patología frente al genoma de individuos sanos. Desde la incorporación de las nuevas técnicas de secuenciación, se han multiplicado los estudios que tratan de dilucidar las causas genéticas del FNMTc, identificando nuevos genes recogidos en una revisión reciente³³. A continuación revisaremos los conocimientos que tenemos acerca de los genes asociados con vulnerabilidad al FNMTc descritos hasta la fecha.

Genes candidatos descritos

Genes implicados en la reparación de DNA: ATM (ATM serine/threonine kinase, locus 11q22.3), CHEK2 (checkpoint kinase 2, locus 22q12), XRCC1 (X-Ray repair cross complementing 1, locus 19q13.31) y XRCC3 (X-Ray repair cross complementing 3, locus 14q32).

El hecho de que factores como la radiación ionizante aumenten el riesgo de cáncer de tiroides, sugiere que genes reparadores de DNA podrían estar implicados en su fisiopatología. Por ello, se han estudiado genes como *ATM*, *CHEK2*, *XRCC1* y *XRCC3*. En varios estudios se ha descrito que determinados polimorfismos en estos genes podrían asociarse con mayor susceptibilidad a CDT, como el rs17879961 en *CHEK2*³⁴, y el rs373759 en *ATM*³⁵. Además, mutaciones en *CHEK2* podrían ser más frecuentes en casos de CDT³⁶. Por el contrario, Ryu et al.³⁷ describieron que el cambio Arg194Trp en *XRCC1* confería menor susceptibilidad a CDT en población coreana. Dichas investigaciones se han realizado básicamente comparando pacientes con CDT esporádico versus controles³⁸, no pudiendo establecerse por el momento una clara relación con el FNMTc.

***TTF-1* (thyroid transcription factor 1, también conocido como *NKX2.1*)**

Ubicado en 14q13, es un factor de transcripción tiroideo. En 2009, se describió la mutación germinal Ala339Val en *TTF-1* en cuatro pacientes con historia de BMN y carcinoma

papilar de tiroides, dos de los cuales tenían antecedentes familiares de BMN, con o sin cáncer papilar de tiroides³⁹. Un año después, Cantara et al.⁴⁰ no encontraron en su serie de pacientes con carcinomas papilares de tiroides (CPT), la presencia de esta variante en *TTF-1*. Por ello no se descarta que esta variante esté asociada con el BMN, pero no puede afirmarse que esté relacionada con el CPT y menos aún con el FNMTc.

***FOXE1* (forkhead box E1)**

Ubicado en 9q22.33, codifica un factor de transcripción tiroideo (*TTF-2*), que participa en la morfogénesis y migración de la glándula tiroidea. Determinados polimorfismos en este gen se han asociado al FNMTc de manera más robusta. Como hemos comentado, en el estudio de GWA de 2009 de Gudmundsson et al.³⁰ se describieron los polimorfismos rs944289 (localizado en 14q13.3, cerca de *NKX2-1*) y rs965513 (en 9q22.33, cerca de *FOXE1*), como predisponentes al cáncer de tiroides en población europea. Bonora et al.⁴¹ genotiparon estos y otros 21 SNPs identificados por GWAS en 11 genes candidatos en 672 sujetos pertenecientes a 133 familias con FNMTc de dos o más miembros afectados. Hallaron dos SNPs (rs965513 y rs10759944) en 9q22.33 (cerca de *FOXE1*), que se asociaban de manera estadísticamente consistente con FNMTc; no así el SNP rs944289. Pereira et al.³² secuenciaron entonces *FOXE1* en 60 familias con FNMTc y en 80 casos esporádicos de CPT, encontrando una nueva variante en línea germinal (Ala248Gly) con segregación en una única familia con FNMTc, y que en los estudios funcionales promovía la tumorigénesis.

Por todo, aunque los resultados no son completamente consistentes, *FOXE1* podría considerarse un gen de susceptibilidad a FNMTc de baja penetrancia.

***SRGAP1* (SLIT-ROBO Rho GTPase-activating protein 1)**

SRGAP1 (locus 12q14) codifica una proteína que inactiva a CDC42, una pequeña proteína GTPasa de la familia Rho, implicada en la migración neuronal y la tumorigénesis⁴². Mediante estudios de ligamiento, se identificó el locus 12q14 en 21/38 familias con FNMTc, por lo que posteriormente se procedió a la secuenciación de todos los exones de *SRGAP1*, ubicados en ese nivel⁴³. Encontraron cuatro mutaciones *missense* en línea germinal (Gln149His, Ala275Thr, Arg617Cys y His875Arg), cada una en una única familia. Los estudios funcionales demostraron que las variantes Gln149His y Arg617Cys condicionaban pérdida de función de la proteína *SRGAP1*, que sería incapaz de inactivar a CDC42. Este trabajo sugiere que *SRGAP1* podría ser un gen de baja penetrancia asociado a FNMTc. Sin embargo, es necesaria su validación como gen candidato en una cohorte más amplia de familias con FNMTc.

***HABP2* (Hyaluronan-Binding Protein 2)**

HABP2 se localiza en 10q25.3, y codifica una proteasa que se une al ácido hialurónico y participa en la fibrinólisis y la integridad vascular⁴⁴.

En 2015, aparece el primer estudio que aplica la secuenciación masiva del exoma para el estudio de las bases genéticas del FNMTTC. El grupo de Gara⁴⁵ describió un cambio genético constitucional Gly534Glu en el gen *HABP2*, que cosegregaba en una familia con siete miembros con CPT, como posible causante de la enfermedad. También describieron este cambio en un 4,7% de 423 casos con CDT esporádico, versus en 0,7% de la población control, lo que indicaba una frecuencia 6,71 veces mayor en pacientes con cáncer de tiroides. Asimismo, demostraron sobreexpresión de la proteína *HABP2* en tejido tumoral de los pacientes con FNMTTC, en comparación con los de controles y casos esporádicos; además, en los estudios de funcionalidad la presencia de la variante Gly534Glu condicionaba pérdida de función supresora tumoral. Todo ello indicaba que *HABP2* podría tener una función supresora tumoral y que el cambio Gly534Glu supondría una predisposición al cáncer de tiroides con penetrancia incompleta. Otro grupo encontró 4/29 familias con FNMTTC que también presentaban la misma variante germinal Gly534Glu⁴⁶. Sin embargo, el papel de *HABP2* como gen de susceptibilidad a FNMTTC es aún controvertido, dado que estos resultados no se han replicado en otros estudios y la frecuencia poblacional del cambio Gly534Glu podría ser muy variable atendiendo a su origen geográfico⁴⁷.

SRRM2 (serine/arginine repetitive matrix 2)

SRRM2 (locus 16p13.3) codifica una proteína implicada en el *splicing*. Este gen fue propuesto como candidato en el FNMTTC a raíz del estudio de Tomsic en 2015⁴⁸, en el que se sugiere que variantes en esta proteína podrían afectar al *splicing* de genes implicados en la tumorigénesis tiroidea. Concretamente, llevaron a cabo NGS de dos miembros de una familia de seis afectados de FNMTTC, encontrando la variante en heterocigosis c.1037C > T (Ser346Phe,rs149019598), que cosegregaba con el CDT en la familia. Por el contrario, este cambio no fue encontrado cuando analizaron otras 138 familias con CDT y requiere validación ulterior.

Genes del complejo telómero-telomerasa

Los telómeros son secuencias repetitivas de ADN no codificante que se encuentran en los extremos de los cromosomas. Su función es dar estabilidad cromosómica, y cuando estas secuencias se acortan, se produce una inestabilidad que favorece la oncogénesis⁴⁹. Existen varios genes implicados en el mantenimiento de los telómeros, tales como TERT (*telomerase reverse transcriptase*), o los genes del complejo shelterina (*POT1*, *RAP1*, *TIN2*, *TPP1*, *TRF1* y *TRF2*)⁵⁰.

Sabemos que mutaciones somáticas en el promotor de TERT juegan un papel importante en el desarrollo del cáncer de tiroides. Por ello, se ha sugerido que los genes implicados en el mantenimiento de los telómeros podrían estar implicados en CDT, y en el FNMTTC en particular. De hecho, se ha descrito que los pacientes con FNMTTC tienen los telómeros más cortos que sus familiares no afectados, los controles sanos o casos esporádicos⁵¹. Sin embargo, Jendrzewski et al.⁵² no encontraron diferencia en la longitud de los telómeros entre CDT esporádicos y FNMTTC. Tampoco se han observado diferencias en el número de copias ni en la expresión de

diversos genes del complejo telómero-telomerasa en seis familias con FNMTTC⁵³, ni se han hallado mutaciones en TERT u otros genes del complejo shelterina en línea germinal en familias con FNMTTC^{50,54}. Por tanto, los resultados en la literatura son aún poco consistentes y requieren más investigaciones.

RTFC o C14orf93 (chromosome 14 open reading frame 93)

En un estudio de 2017 en China⁵⁵, combinando análisis de ligamiento y NGS, encontraron la variante Val205Met) en *RTFC* (locus 14q11.2) en una única familia con cinco miembros con FNMTTC. En los estudios funcionales, esta variante promovía la oncogénesis. No se han validado estos resultados en otros estudios independientes.

MAP2K5 (mitogen-activated protein kinase kinase 5)

MAP2K5 (también conocido como MEK5), se localiza en 15q23 y codifica una proteína de la familia de las MAP kinasa. En un artículo reciente en población china⁵⁶, estudiaron a 34 familias de más de \geq tres miembros afectados de FNMTTC mediante NGS, y hallaron dos variantes en el gen *MAP2K5* presentes en dos familias: Ala321Thr y Met367Thr). Estas variantes son muy infrecuentes en población sana. Los resultados de los estudios funcionales también sugirieron que *MAP2K5* podría ser un gen de susceptibilidad al FNMTTC. Sin embargo, otro grupo italiano no replicó estos resultados en 33 familias⁵⁷, permaneciendo incierta la implicación de *MAP2K5* en esta patología.

DUOX2 (dual oxidase 2)

Ubicado en 15q21.1, este gen codifica una glicoproteína que participa en el metabolismo del peróxido de hidrógeno (H₂O₂), necesario para la actividad de las enzimas tiroideas que participan en la síntesis de hormonas tiroideas. Recientemente, se ha descrito una nueva variante germinal en *DUOX2* (la variante *missense* Tyr1203His), identificada mediante NGS en una familia de seis miembros con FNMTTC, y que podría asociarse a susceptibilidad a éste⁵⁸. La presencia de esta variante aumentaría la fabricación de peróxido de hidrógeno, tóxico para el DNA, promoviendo la tumorigénesis. De manera interesante, la expresión de *DUOX2* está aumentada en pacientes homocigotos para el polimorfismo rs965513 en *FOXE1*, con lo que ambos mecanismos podrían estar conectados, sugiriendo los autores que la desregulación de proteínas implicadas en el metabolismo del H₂O₂ podría relacionarse con la susceptibilidad al FNMTTC.

NOP53 (ribosome biogenesis factor)

NOP53 está localizado en 19q13.33 y codifica una proteína nucleolar implicada en la biogénesis ribosómica, regulando la activación de p53⁵⁹. Está implicado en la vía de señalización PI3K/AKT, una de las más importantes en cáncer de tiroides. De hecho, en un estudio de una familia con tres miembros con FNMTTC mediante NGS, se descubrieron tres

genes de susceptibilidad (*PIK3CB*, *CAV2* y *KANK1*), relacionados con la tumorigénesis a través de la vía de PI3K/AKT⁶⁰.

Con base en un estudio multicéntrico realizado en España de 45 familias con FNMTc, se ha descrito *NOP53* como otro gen candidato en el FNMTc. Concretamente, se encontró la variante Asp31His (rs78530808), que cosegregaba en todos los miembros afectados de tres familias con cinco, cuatro y dos miembros afectados de CDT, respectivamente, y no estaba presente en los familiares sanos. Además, los estudios funcionales mostraron una función oncogénica de *NOP53*⁶¹. De hecho, en un estudio previo se había observado mayor expresión de *NOP53* en carcinomas foliculares agresivos⁶².

Por todo ello, *NOP53* podría estar implicado en el FNMTc, probablemente como un gen de baja penetrancia, si bien hasta el momento estos recientes hallazgos no se han corroborado en otros estudios.

MicroRNAs

También se ha hipotetizado que los microRNA, pequeños segmentos de RNA capaces de regular la expresión de otros genes podrían estar implicados en el desarrollo del cáncer de tiroides. En una revisión de 2018⁶³, se recogen los distintos microRNA relacionados hasta entonces con los diferentes subtipos de cáncer de tiroides. Destacamos el artículo de Xiong et al.⁶⁴, por focalizarse en el estudio del perfil de microRNAs del FNMTc, encontrando una desregulación del miR-886-3p y miR-20-a.

Limitaciones

Tras todo lo expuesto, se pone de manifiesto la complejidad del estudio de la genética del FNMTc por varias razones:

En primer lugar, la dificultad de reclutar datos clínicos y muestras biológicas (sangre y tejido histológico tumoral) de familias que presentan varios casos afectados exige una colaboración multicéntrica. En esta línea, desde la SEEN existe un registro en el que se pueden introducir los FNMTc que encontremos en nuestra práctica clínica (<http://www.regcancerdiferenciadofamiliar.es/>). Teniendo en cuenta los estudios mencionados, parece que nuestros esfuerzos deberían centrarse en las familias con \geq tres miembros afectados, para maximizar el componente hereditario. Como hemos comentado, algunas características como la agresividad tumoral y la edad menor al diagnóstico, o la utilidad del cribado, son mucho más claras en las familias de al menos tres personas afectas. Por tanto, parece mejor priorizar la homogeneidad y calidad de las familias reclutadas que la cantidad. Además, dada la alta prevalencia del cáncer de tiroides en población general, no hay que descartar que dentro de una familia con FNMTc pueda haber algún caso de CDT esporádico, es decir, una fenocopia.

En segundo lugar, y vistos los resultados poco consistentes entre los estudios, que sugieren básicamente genes candidatos de baja penetrancia o incluso mutaciones únicas en algunas familias, podría ser que el FNMTc fuese una enfermedad genéticamente heterogénea y poligénica, a diferencia de la mayoría de cánceres hereditarios, donde los genes causantes son habitualmente uno o dos. Esto explicaría por qué no encontramos un nexo común entre las diferentes familias.

Por último, aunque las técnicas de secuenciación masiva del exoma han supuesto un gran salto cualitativo en la bioquímica y genética molecular, y cada vez están más estandarizadas, todavía presentan sus limitaciones y requieren frecuentemente de validación mediante secuenciación de Sanger. Además, los resultados y variantes de interés obtenidas dependen mucho de la estrategia de búsqueda y de los filtros empleados, que son imprescindibles por el volumen ingente de información; esto a la vez implica un sesgo de selección al poder perder por ello variantes potencialmente candidatas que no pueden excluirse completamente⁶⁵.

Conclusiones

Hoy en día, el FNMTc continúa siendo una patología heterogénea sin una causalidad genética establecida. No está indicado el estudio genético de las familias con FNMTc al no haber ningún gen claramente establecido como causante del FNMTc, salvo en el caso de los FNMTc asociados a síndromes genéticos hereditarios. Sin embargo, sí es de utilidad la recogida y registro de estas familias para poder llevar a cabo estudios de colaboración multicéntrica y tratar de dilucidar las causas genéticas de su enfermedad.

Financiación

Este trabajo no ha recibido ningún tipo de financiación.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Udelsman R, Zhang Y. The epidemic of thyroid cancer in the united states: The role of endocrinologists and ultrasounds. *Thyroid*. 2014;24(3):472–9.
2. Kasper D, Fauci A, Stephen H, Longo D, Jameson JL, Loscalzo J. Harrison. Principios de Medicina Interna [Internet]. 19 Ed. Madrid: McGraw Hill; 2016.
3. Eng C. Familial papillary thyroid cancer-many syndromes, too many genes? *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(5):1755–7.
4. Newey PJ. Clinical genetic testing in endocrinology: Current concepts and contemporary challenges. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2019;91(5):587–607.
5. Vriens MR, Suh I, Moses W, Kebebew E. Clinical features and genetic predisposition to hereditary nonmedullary thyroid cancer. *Thyroid*. 2009;19(12):1343–9.
6. Moses W, Weng J, Kebebew E. Prevalence, clinicopathologic features, and somatic genetic mutation profile in familial versus sporadic nonmedullary thyroid cancer. *Thyroid*. 2011;21(4):367–71.
7. Klubo-Gwiedzinska J, Kushchayeva Y, Kumar Gara S, Kebebew E. Familial Non-Medullary Thyroid Cancer. En: Mallick UK, Harmer C, Mazzaferri EL, Kendall-Taylor P, editors. *Practical Management of Thyroid Cancer: a multidisciplinary approach*, 2nd Ed. London: Springer; 2008. p. 241–70.
8. Ngeow J, Mester J, Rybicki LA, Ni Y, Milas M, Eng C. Incidence and clinical characteristics of thyroid cancer in prospective series of individuals with cowden and cowden-like syndrome

- characterized by germline PTEN SDH, or KLLN alterations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(12):2063–71.
9. Orloff MS, He X, Peterson C, Chen F, Chen JL, Mester JL, et al. Germline PIK3CA and AKT1 mutations in Cowden and Cowden-like syndromes. *Am J Hum Genet.* 2013;92(1):76–80.
 10. Ngeow J, Ni Y, Tohme R, Chen FS, Bebek G, Eng C. Germline alterations in RASAL1 in Cowden syndrome patients presenting with follicular thyroid cancer and in individuals with apparently sporadic epithelial thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(7):1316–21.
 11. Yehia L, Niazi F, Ni Y, Ngeow J, Sankunmy M, Liu Z, et al. Germline heterozygous variants in SEC23B are associated with Cowden syndrome and enriched in apparently sporadic thyroid cancer. *Am J Hum Genet.* 2015;97(5):661–76.
 12. Wasserman JD, Sabbaghian N, Fahiminiya S, Chami R, Mete O, Acker M, et al. DICER1 Mutations Are Frequent in Adolescent-Onset Papillary Thyroid Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;103(5):2009–15.
 13. National Institutes of Health/National Cancer Institute. Cancer Stat Facts: Thyroid Cancer. 2016, <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/thyro.html/> [consultada el 7 de abril de 2020].
 14. Charkes ND. On the prevalence of familial nonmedullary thyroid cancer in multiply affected kindreds. *Thyroid.* 2006;16(2):181–6.
 15. Cao J, Chen C, Chen C, Wang QL, Ge MH. Clinicopathological features and prognosis of familial papillary thyroid carcinoma - A large-scale, matched, case-control study. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2016;84(4):598–606.
 16. Zhou YM, Luo H, Gou JX, Zhao WJ, Dai WY, Zhu J, et al. Second generation of familial nonmedullary thyroid carcinoma: A meta-analysis on the clinicopathologic features and prognosis. *Eur J Surg Oncol.* 2017;43(12):2248–56.
 17. Wang X, Cheng W, Li J, Su A, Wei T, Liu F, et al. Familial nonmedullary thyroid carcinoma is a more aggressive disease: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Endocrinol.* 2015;172(6):R253–62.
 18. Zhang YB, Wang XX, Zhang XW, Li ZJ, Liu J, Xu ZG, et al. Familial Nonmedullary Thyroid Carcinoma: A Retrospective Analysis of 117 Families. *Chin Med J (Engl).* 2018;131(4):395–401.
 19. Merino MJ, Merkel R, Yang L, Nilubol N, Sadowski SM, Kebebew E, et al. Results of Screening in Familial Non-Medullary Thyroid Cancer. *Thyroid.* 2017;27(8):1017–24.
 20. Fallah M, Pukkala E, Tryggvadottir L, Olsen JH, Tretli S, Sundquist K, et al. Risk of thyroid cancer in first-degree relatives of patients with non-medullary thyroid cancer by histology type and age at diagnosis: A joint study from five nordic countries. *J Med Genet.* 2013;50(6):373–82.
 21. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty G, Mandel SJ, Nikiforov YE, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid.* 2016;26(1):1–133.
 22. Triponez F, Wong M, Sturgeon C, Caron N, Ginzinger DG, Segal MR, et al. Does familial non-medullary thyroid cancer adversely affect survival? *World J Surg.* 2006;30(5):787–93.
 23. Lakis ME, Giannakou A, Nockel PJ, Gara SK, Patel D, Sater ZA, et al. HHS Public Access. 2019;165(1):50–7.
 24. Sippel RS, Caron NR, Clark OH. An evidence-based approach to familial nonmedullary thyroid cancer: screening, clinical management, and follow-up. *World J Surg.* 2007;31(5):924–33.
 25. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, et al. Revised American thyroid association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid.* 2009;19(11):1167–214.
 26. Vriens MR, Sabanci Ü, Epstein HD, Ngai S, Duh QY, Siperstein AE, et al. Reliability of fine-needle aspiration in patients with familial nonmedullary thyroid cancer. *Thyroid.* 1999;9(10):1011–6.
 27. Nixon IJ, Suárez C, Simo R, Sanabria A, Angelos P, Rinaldo A, et al. The Impact of Family History on Non-Medullary Thyroid Cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2016;42(10):1455–63.
 28. Bevan S, Pal T, Greenberg CR, Green H, Wixey J, Bignell G, et al. A comprehensive analysis of MNG1, TCO1, fPTC PTEN, TSHR, and TRKA in familial nonmedullary thyroid cancer: Confirmation of linkage to TCO1. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(8):3701–4.
 29. Yang SP, Ngeow J. Genetic unraveling the genetic maze. *Endocr Relat Cancer.* 2016;23(12):R577–95.
 30. Gudmundsson J, Sulem P, Gudbjartsson DF, Jonasson JG, Sigurdsson A, Bergthorsson JT, et al. Common variants on 9q22.33 and 14q13.3 predispose to thyroid cancer in European populations. *Nat Genet.* 2009;41(4):460–4.
 31. Saenko VA, Rogounovitch TI. Genetic polymorphism predisposing to differentiated thyroid cancer: A review of major findings of the genome-wide association studies. *Endocrinol Metab.* 2018;33(2):164–74.
 32. Pereira JS, Da Silva JG, Tomaz RA, Pinto AE, Bugalho MJ, Leite V, et al. Identification of a novel germline FOXE1 variant in patients with familial non-medullary thyroid carcinoma (FNMTTC). *Endocrine.* 2015;49(1):204–14.
 33. Hińcza K, Kowalik A, Kowalska A. Current knowledge of germline genetic risk factors for the development of non-medullary thyroid cancer. *Genes (Basel).* 2019;10(7):E482.
 34. Wójcicka A, Czetwertyńska M, Świerniak M, Długosińska J, Maciag M, Czajka A, et al. Variants in the ATM-CHEK2-BCR1 axis determine genetic predisposition and clinical presentation of papillary thyroid carcinoma. *Genes Chromosom Cancer.* 2014;53(6):516–23.
 35. Gu Y, Yu Y, Ai L, Shi J, Liu X, Sun H, et al. Association of the ATM gene polymorphisms with papillary thyroid cancer. *Endocrine.* 2014;45(3):454–61.
 36. Siołek M, Cybulski C, Gąsior-Perczak D, Kowalik A, Kozak-Klonowska B, Kowalska A, et al. CHEK2 mutations and the risk of papillary thyroid cancer. *Int J Cancer.* 2015;137(3):548–52.
 37. Ryu RA, Tae K, Min HJ, Jeong JH, Cho SH, Lee SH, et al. XRCC1 polymorphisms and risk of papillary thyroid carcinoma in a Korean sample. *J Korean Med Sci.* 2011;26(8):991–5.
 38. Akulevich NM, Saenko VA, Rogounovitch TI, Drozd VM, Lushnikov EF, Ivanov VK, et al. Polymorphisms of DNA damage response genes in radiation-related and sporadic papillary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer.* 2009;16(2):491–503.
 39. Ngan ESW, Lang BHH, Liu T, Shum CKY, So MT, Lau DKC, et al. A germline mutation (A339V) in thyroid transcription factor-1 (TTF-1/NKX2.1) in patients with multinodular goiter and papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(3):162–75.
 40. Cantara S, Capuano S, Formichi C, Pisu M, Capezzone M, Pacini F. Lack of germline A339V mutation in thyroid transcription factor-1 (TTF-1/NKX2.1) gene in familial papillary thyroid cancer. *Thyroid Res.* 2010;3(1):4.
 41. Bonora E, Rizzato C, Diquigiovanni C, Oudot-Mellakh T, Campa D, Vargiolu M, et al. The FOXE1 locus is a major genetic determinant for familial nonmedullary thyroid carcinoma. *Int J Cancer.* 2014;134(9):2098–107.
 42. Wong K, Ren XR, Huang YZ, Xie Y, Liu G, Saito H, et al. Signal transduction in neuronal migration: Roles of GTPase activating proteins and the small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway. *Cell.* 2001;107(2):209–21.
 43. He H, Bronisz A, Liyanarachchi S, Nagy R, Li W, Huang Y, et al. SRGAP1 is a candidate gene for papillary thyroid carcinoma susceptibility. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(5):973–80.
 44. Choi-Miura NH, Yoda M, Saito K, Takahashi K, Tomita M. Identification of the substrates for plasma hyaluronan binding protein. *Biol Pharm Bull.* 2001;24(2):140–3.

45. Gara SK, Jia L, Merino MJ, Agarwal SK, Zhang L, Cam M, et al. Germline HABP2 Mutation Causing Familial Nonmedullary Thyroid Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(5):448–55.
46. Zhang T, Xing M. HABP2 G534E Mutation in Familial Nonmedullary Thyroid Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2016;108(6):7–9.
47. Alzahrani AS, Murugan AK, Qasem E, Al-Hindi H. HABP2 Gene Mutations Do Not Cause Familial or Sporadic Non-Medullary Thyroid Cancer in a Highly Inbred Middle Eastern Population. *Thyroid*. 2016;26(5):667–71.
48. Tomsic J, He H, Akagi K, Liyanarachchi S, Pan Q, Bertani B, et al. A germline mutation in SRRM2, a splicing factor gene, is implicated in papillary thyroid carcinoma predisposition. *Sci Rep*. 2015;5(10566):1–13.
49. De Lange T. Telomere-related genome instability in cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2005;70:197–204.
50. Cantara S, Capuano S, Capezzone M, Benigni M, Pisu M, Marchisotta S, et al. Lack of mutations of the telomerase RNA component in familial papillary thyroid cancer with short telomeres. *Thyroid*. 2012;22(4):363–8.
51. Capezzone M, Cantara S, Marchisotta S, Filetti S, De Santi MM, Rossi B, et al. Short telomeres, telomerase reverse transcriptase gene amplification, and increased telomerase activity in the blood of familial papillary thyroid cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(10):3950–7.
52. Jendrzewski J, Tomsic J, Lozanski G, Labanowska J, He H, Liyanarachchi S, et al. Telomere length and telomerase reverse transcriptase gene copy number in patients with papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(11):1876–80.
53. He M, Bian B, Gesuwan K, Gulati N, Zhang L, Nilubol N, et al. Telomere length is shorter in affected members of families with familial nonmedullary thyroid cancer. *Thyroid*. 2013;23(3):301–7.
54. Orois A, Badenas C, Reverter JL, López V, Potrony M, Mora M, et al. Lack of Mutations in POT1 Gene in Selected Families with Familial Non-Medullary Thyroid Cancer. *Horm Cancer*. 2020;11(2):111–6.
55. Liu C, Yu Y, Yin G, Zhang J, Wen W, Ruan X, et al. C14orf93 (RTFC) is identified as a novel susceptibility gene for familial nonmedullary thyroid cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;482(4):590–6.
56. Ye F, Gao H, Xiao L, Zuo Z, Liu Y, Zhao Q, et al. Whole exome and target sequencing identifies MAP2K5 as novel susceptibility gene for familial non-medullary thyroid carcinoma. *Int J Cancer*. 2019;144(6):1321–30.
57. Cirello V, Colombo C, Persani L, Fugazzola L. Absence of the MAP2K5 germline variants c.G961A and c.T1100C in a wide series of familial nonmedullary thyroid carcinoma Italian families. *Int J Cancer*. 2019;145(2):600.
58. Bann DV, Jin Q, Sheldon KE, Houser KR, Nguyen L, Warrick JI, et al. Genetic variants implicate dual oxidase-2 in familial and sporadic nonmedullary thyroid cancer. *Cancer Res*. 2019;79(21):5490–9.
59. Sloan KE, Bohnsack MT, Watkins NJ. The 5S RNP Couples p53 Homeostasis to Ribosome Biogenesis and Nucleolar Stress. *Cell Rep*. 2013;5(1):237–47.
60. Srivastava A, Kumar A, Giangioffe S, Bonora E, Hemminki K, Försti A, et al. Whole genome sequencing of familial non-medullary thyroid cancer identifies germline alterations in MAPK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways. *Biomolecules*. 2019;9(10):1–20.
61. Orois A, Gara S, Mora M, Halperin I, Martínez S, Alfayate R, et al. *NOP53* as A Candidate Modifier Locus for Familial Non-Medullary Thyroid Cancer. *Genes (Basel)*. 2019;10:1–15.
62. Williams MD, Zhang L, Elliott DD, Perrier ND, Lozano G, Clayman GL, et al. Differential gene expression profiling of aggressive and nonaggressive follicular carcinomas. *Hum Pathol*. 2011;42(9):1213–20.
63. Pishkari S, Paryan M, Hashemi M, Baldini E, Mohammadi-Yeganeh S. The role of microRNAs in different types of thyroid carcinoma: a comprehensive analysis to find new miRNA supplementary therapies. *J Endocrinol Invest*. 2018;41(3):269–83.
64. Xiong Y, Zhang L, Holloway AK, Wu X, Su L, Kebebew E. MiR-886-3p regulates cell proliferation and migration, and is dysregulated in familial non-medullary thyroid cancer. *PLoS One*. 2011;6(10), e24717 e247211.
65. Gerhard GS, Bann DV, Broach J, Goldenberg D. Pitfalls of exome sequencing: a case study of the attribution of HABP2 rs7080536 in familial non-medullary thyroid cancer. *NPJ Genom Med*. 2017;2(8):1–7.