

## 갑상선암의 분자표지자들에 관한 고찰

한재준 · 홍기숙<sup>1</sup>

국립재활원 내과, <sup>1</sup>이화여자대학교 의학전문대학원 진단검사의학교실

### Review of Molecular Markers for Thyroid Cancer

Jae-Joon Han, Ki-Sook Hong<sup>1</sup>

Department of Internal Medicine, National Rehabilitation Hospital, <sup>1</sup>Department of Laboratory Medicine, Ewha Womans University School of Medicine, Seoul, Korea

The incidence of thyroid cancer has been rapidly increased in Korea. Although fine needle aspiration cytology is recommended for diagnosis of cancer, there are some limitations. Patients with indeterminate or suspicious cytology category in which malignancy cannot be ruled out usually undergone a thyroidectomy, however, only 10~25% of them finally diagnosed as cancer. According to the progress in understanding molecular mechanism, some mutations or other molecular alterations have been studied for the diagnostic and prognostic markers for thyroid cancer. The majority of papillary thyroid cancers have *BRAF* and *RAS* mutations or *RET/PTC* rearrangement, and approximately 80% of follicular thyroid cancers harbor a *RAS* mutation or *PAX8/PPAR $\gamma$*  rearrangement. These genetic alterations are mostly studied and current clinical guidelines suggested that these molecular markers may help management for patients with indeterminate cytology. In addition, recent studies demonstrated the high sensitivity and specificity of thyroid-stimulating hormone receptor mRNA in diagnosing cancer in patients with indeterminate cytology. For the detection of recurrent or residual thyroid cancer, serum thyroglobulin is the only circulating marker in clinical practice. However, it lacks sensitivity and is unreliable specifically in the presence of antibodies to thyroglobulin. Recent studies demonstrated a significant role of measuring the mRNA of thyroglobulin, thyroid peroxidase, thyroid-stimulating hormone receptor, and sodium/iodine symporter in peripheral blood for monitoring of the recurrence of thyroid cancer. (**Ewha Med J 2012;35(1):3-10**)

**Key Words:** Thyroid neoplasms; *BRAF*; *RAS*; Recurrence

## 서론

갑상선암은 내분비계에 발생하는 가장 흔한 악성 종양으로 여성이 남성에 비해 3배 정도 많이 발생하는 것으로 알려져 있다. 최근 전 세계적으로 갑상선암의 발생률이 급증하는 것으로 보고되고 있으며, 우리

나라의 경우 그 증가율이 매우 높아서 2008년 현재 여성암 발생률 1위를 보이고 있다[1]. 또한, 우리나라의 갑상선암은 다른 나라에 비해 유두암의 빈도가 높고 *BRAF*<sup>V600E</sup> 양성률이 높은 특징을 보인다[2]. 갑상선결절은 초음파유도 세침흡인세포검사를 통해 진단하는 것이 가장 정확하고 비용-효율적으로 알려져 있으며, 결절의 5% 정도가 악성으로 진단된다[3]. 분자생물학 기법의 발달로 다양한 생물학적 표지자가 갑상선암을 진단하고 예후를 예측하며, 수술 후 경과를 관찰 하는 데에 연구되고 있다. 특히, 대한갑상선학회 2010년 ‘대한갑상선학회 갑상선결절 및 암 진료 권고

Received: January 26, 2012, Accepted: February 28, 2012

Corresponding author: Ki-Sook Hong, Department of Laboratory Medicine, Seoul Seonam Hospital, 20 Sinjeongipen 1-ro, Yangcheon-gu, Seoul 158-170, Korea  
Tel: 82-2-6300-7652, Fax: 82-2-6300-7660  
E-mail: kshong@ewha.ac.kr

안 개정안'과 미국갑상선학회의 2009년 '갑상선결절 및 암 진료 권고안의 개정안'에서는 갑상선결절의 진단 정확성을 높이기 위하여 *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 (BRAF)*, *rat sarcoma viral oncogene homolog (RAS)*, *rearranged during transfection/papillary thyroid cancer (RET/PTC)*, *paired box gene 8/peroxisome proliferator-activated receptor (PAX8/PPAR $\gamma$ )*, galectin-3, cytokeratin 등의 분자표지자 검사를 전문가 의견에 따른 권고사항으로 분류하고 있다 [4,5]. 이번 종설에서는 갑상선암에서 발견되는 유전자변이와 이를 이용한 진단과 추적관찰에 대해 다루고자 한다.

## 본 론

### 1. 갑상선암에서의 주요 유전자변화

갑상선암은 조직학적으로 갑상선 분화암, 갑상선 미분화암 및 갑상선 수질암으로 분류되며, 갑상선 분화암은 다시 유두암과 여포암으로 분류된다. 갑상선 분화암과 관련된 4개의 주된 돌연변이로 *BRAF*, *RAS*, *RET/PTC*, *PAX8/PPAR $\gamma$* 가 알려져 있다.

#### 1) 유두암

유두암의 약 75%에서 *BRAF*, *RAS*, 또는 *RET/PTC* 돌연변이가 관찰되며 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 경로를 활성화 시킨다[6]. 특히, *BRAF* 돌연변이와 *RET/PTC* 돌연변이는 상호 보완적으로 발견된다 [7].

(1) *BRAF*: *BRAF* 돌연변이는 유두암에서 가장 흔하며 *BRAF* kinase와 MAPK/extracellular signal-regulated kinase (ERK) 경로를 지속적으로 활성화시킨다[8]. 가장 흔하게 발견되는 변이는 600번 아미노산인 발린이 글루탐산으로 치환된 것(V600E)으로 1799번 뉴클레오티드의 점돌연변이가 원인이다[9]. *BRAF*<sup>V600E</sup> 돌연변이는 키가 커지고 여포성 변이를 보이는 세포거나 갑상선 미분화암에서도 발견되지만, 여포선종이나 여포암에서는 발견되지 않는다[10].

(2) *RET/PTC*: *RET/PTC* 재배열은 *RET* 유전자의 tyrosine kinase영역인 3'끝과 *PTC* 유전자의 5'끝이 융합된 결과이다[11]. 이 융합유전자에서 만들어진 *RET/PTC* chimeric 단백질은 세포 내 tyrosine kinase 부위가 지속적으로 활성화되어 있다. 그 결과 다양한 하향 경로인 MAPK, ERK, phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K) 경로를 활성화시킨다[12]. 갑상선암과 관련된 *RET/PTC*

유전자 재배열은 *RET/PTC*<sub>1</sub>과 *RET/PTC*<sub>3</sub>이 가장 흔한 것으로 알려져 있으며, 산발적으로 발생하는 유두암의 15~40%에서 발견된다[13]. 이 유전자 재배열은 소아의 유두암과 방사선 노출에 의한 유두암에 관련된 것으로 생각되고 있다[14,15]. 이는 유두암의 여포성 변이에서도 발견되며 일부 연구자들은 여포선종에서도 보고하고 있다[16,17]. *RET/PTC*<sub>1</sub>은 tyrosine kinase receptor인 *RET* 유전자와 기능이 알려지지 않은 *H4* 유전자의 재배열이며, *RET/PTC*<sub>3</sub>은 역시 기능이 알려지지 않은 elephant ear-like leaf 1 (*ELE1*) 유전자와의 재배열이다. *RET/PTC* 유전자변화가 있는 유두암은 전형적인 조직형을 보이며 림프절 전이율이 높으나 미분화암으로 진행되는 경우는 적은 것으로 알려져 있다[6,18].

#### 2) 여포암

여포암의 약 80%에서 *RAS* 돌연변이 또는 *PAX8/PPAR $\gamma$*  재배열이 관찰된다.

(1) *RAS*: *RAS* 유전자에 의해 만들어진 g-단백은 세포막수용체 등과 연관되어 이들이 활성화되면 MAPK, PI3K/v-akt murine thymoma viral oncogene (AKT) 경로의 신호전달과 활성화를 촉진하는 것으로 알려져 있다[19]. *RAS* 유전자에 점돌연변이가 일어나면 이들 경로가 지속적으로 활성화된다. 갑상선암의 발생과정에는 *HRAS*의 61코돈과 *NRAS*의 61코돈의 돌연변이가 가장 흔히 발견되는 것으로 알려져 있다[20,21]. *RAS* 돌연변이는 유두암과 여포암 모두에서 발견되며 여포선종에서도 상당수 발견되는 것으로 보고되고 있다[20,22]. *RAS* 변이를 갖고 있는 유두암은 여포성 변이 부르는데, 림프절 전이가 적고 피막에 둘러싸인 경향을 보인다는 보고가 있다[23].

(2) *PAX8/PPAR $\gamma$* : *PAX8* 유전자는 갑상선에서 특이 발현되는 전사인자를 암호화하고 있으며, *PPAR $\gamma$*  유전자는 peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$ 를 발현한다[24]. *PAX8/PPAR $\gamma$*  재배열은 이들 두 유전자의 전이와 융합으로 만들어지며 세포 변형에 관여한다[25]. *PAX8/PPAR $\gamma$*  재배열은 전형적인 여포암의 30~40%에서 보이며 여포선종의 2~10%에서 발견된다 [26-29]. *PAX8/PPAR $\gamma$*  재배열이 있는 종양은 고형, 등우리의 성장 패턴을 보이며 종종 혈관 침범을 동반한다[30]. *PAX8/PPAR $\gamma$*  재배열은 유두암의 여포성변종에서도 발견된다[26].

(3) Micro-RNA: Micro-RNAs (miRNAs)는 non-coding RNAs로 유전자 발현을 음성적으로 조절한다. miR-155,

miR-181b, miR-213, miR-221, miR-222, miR-224, miR-345는 유두암에서 조절이상이가 보고되고 있다[31-34]. 또한, 종양의 돌연변이 상태와 miRNA 개요간의 연관성도 제시되고 있다[35]. miRNA 조절이상은 여포암[35]이나 역분화 갑상선암[34]에서도 보고되고 있다.

## 2. 진단

### 1) 갑상선기능검사와 영상진단

갑상선결절이 발견되면 갑상선 기능검사를 시행한다. 그 결과, thyroid-stimulating hormone (TSH)이 높으면 악성의 가능성이 거의 없으므로 세침흡인세포검사를 시행하지 않을 수 있고 TSH가 낮으면 갑상선스캔을 시행하여 열결절인지를 확인한다. 혈청 TSH가 낮지 않다면 갑상선스캔을 생략하고 갑상선초음파를 시행하여 결절의 크기, 위치, 악성이나 양성을 시사하는 소견, 낭성 변화 등을 확인할 수 있다. 혈청 TSH가 증가되어 있는 하시모토 갑상선염 환자들은 갑상선암의 빈도가 정상 갑상선과 비교하여 같거나 높기 때문에 세침흡인세포검사를 권고하고 있다[5]. 또한, 갑상선결절이 존재하거나 의심되는 모든 환자에서 갑상선초음파 시행을 고려하도록 권고하고 있다[5].

### 2) 세침흡인세포검사

2009년에 발표된 Bethesda 체계는 세침흡인세포검사 결과를 비진단적, 양성, 비정형, 여포종양 혹은 여포종양 의심, 악성 의심, 악성으로 분류하고 있다[36]. 이들의 악성 위험도는 각각 양성은 1% 미만, 비정형은 5~15%, 여포종양은 15~35%, 악성 의심은 50~80%, 악성은 97~100%로 알려져 있다[36-43]. 세침흡인세포검사의 약 7~10%의 경우는 의심이나 불명확하므로[44,45] 이들 환자들은 진단이 명확하지 않고 악성 위험도를 예상할 수 없어 대부분의 경우 수술을 하게 된다. 그러나 수술한 환자의 10~25%만이 악성으로 최종 진단된다[44,46,47]. 따라서, 많은 수의 환자들이 불필요한 수술을 받으며, 전절제술을 받은 환자의 경우 영구적인 저갑상선증으로 매일 갑상선호르몬을 복용해야 한다. 또는 보존적인 수술을 우선 시행하여 진단 목적의 갑상선엽절제술만을 시행받고 악성으로 진단된 환자들은 이차 수술을 통해 갑상선을 완전 절제하여야 한다.

### 3) 유전자 변화의 분자생물학적 검사

세침흡인세포검사를 보완할 수 있는 검사로 유전자

변이에 대한 분자검사법이 향후 기대된다. 최근 발표된 전향적 연구들에서 *BRAF*<sup>V600E</sup>와 관련된 결과가 발표되었는데, 유두암에 대한 특이도가 100%였다[48-53]. 또한, 의심, 불명확, 또는 비진단적인 세침흡인세포검사 결과가 나왔을 때 *BRAF*<sup>V600E</sup>가 있으면 악성으로 분류하는데 도움이 되며, 결과가 양성으로 나왔더라도 *BRAF*<sup>V600E</sup>가 있다면 수술 후 악성으로 진단되는 경우가 드물지 않다고 보고하고 있다[54-59]. 특히, *BRAF*<sup>V600E</sup>를 혈액 내 순환하는 세포에서 진단하거나[54,60], 유두암으로 수술한 환자의 수술 전 혈액에서 진단한 보고들이 있다[61].

최근의 두 연구는 세침흡인세포검사 검체를 이용하여 *BRAF*, *RAS*, *RET/PTC*, *PAX8-PPAR $\gamma$*  유전자 변화를 조사하였다[52,53]. 그 결과 어느 하나의 변화라도 보이면 악성으로 확인되는 경우가 각각 97%와 91.1%였고, *BRAF*나 *RET/PTC*에 변화가 있는 경우 모두 악성으로 확인되었다. 유전자변이 검사가 양성인 경우 100%의 특이도로 악성임을 확인할 수 있었으나, 음성인 경우에도 악성을 배제할 수는 없었다고 하였다. 두 연구에서 각각 32%와 10%의 경우 유전자변이가 음성임에도 악성으로 확인되었던 환자들이 있었던 것으로 보고하였다. 이와 같은 연구 결과들로 볼 때 유전자변이 분석을 통해 갑상선 절제술의 시행을 줄이는 것은 아직은 어려운 것으로 보인다. 그럼에도 불구하고 유전자변이 분석을 통해 몇 가지 임상적 도움이 될 수 있는 경우들은 다음과 같다. 첫째, 갑상선엽절제술과 전절제술의 결정; 둘째, 수술 중 동결절편검사의 필요성이 감소; 셋째, 세침흡인세포검사 결과가 의심 또는 불명확인 환자들이 유전자 변이 양성일 경우 수술의 결정; 넷째, 세침흡인세포검사 결과가 의의가 불확실한 여포성 병변이거나 검체가 불충분할 때 향후 치료 결정; 다섯째, 수술 전에 절제술의 범위를 결정하는데 도움이 될 수 있다[62].

유전자 변이 외에도 Wagner 등[55]은 처음으로 결절의 진단시 TSH receptor (TSHr) mRNA를 연구한 결과를 발표하였다. 72명의 환자에서 수술 전에 TSHr mRNA를 정량 RT-PCR로 측정하였는데, 그 결과 갑상선분화암 환자의 72%를 정확히 진단하였고 양성결절 환자의 80%를 정확히 진단하였다. 세침흡인세포검사가 불명확한 환자의 진단에서 4명의 암환자 중에 3명의 암환자를 정확히 분류하였고, 14명 양성결절 환자 중에 11명을 정확히 분류하여 민감도 75%와 특이도 78%를 보여주었다. 또한 세침흡인세포검사와 TSHr mRNA RT-PCR을 같이 하였을 때는 진단의 민감도가

95%이며 특이도가 89%로 세침흡인세포검사만 할 때 보다 높다고 주장하였다. Chia 등[56]은 이들의 연구를 보다 발전시킨 결과를 발표하였는데, 207명의 환자를 대상으로 TSHr mRNA를 정량RT-PCR로 측정하였다. 연구자들은 receiver operating characteristic (ROC) 커브를 이용한 기준치를 적용하여 갑상선분화암을 진단하는데 민감도 72%, 특이도 82.5%의 결과를 보고하였다. 세침흡인세포검사 결과 불명확의 결과를 보인 환자들 60명에서 TSHr mRNA검사는 68%인 41명의 환자들을 정확히 분류할 수 있었다. 따라서 TSHr mRNA검사가 수술 전 갑상선결절 검사에서 세침흡인세포검사를 대신하긴 어려우나 불명확한 세침흡인세포검사 결과를 보일 때 도움이 될 것으로 보고하였다.

요약하면, 현재는 세침흡인세포검사서 비정형이나 여포종양 혹은 여포종양 의심의 경우 진단의 정확성을 높이기 위해 *BRAF*, *RAS*, *RET/PTC*, *PAX8-PPAR $\gamma$*  등의 유전자 변화에 대한 검사를 고려할 수 있다고 권고하고 있다[5]. 지금까지 갑상선분화암의 유전자변이 중에 70~80%가 밝혀졌으며, 향후 새로운 유전자변이와 mRNA에 대한 결과들이 발표될 것으로 생각된다. 그러나 아직 표지자들의 결과가 연구자들간에 큰 차이가 있어 임상적인 유용성은 향후 연구가 계속되어야 할 것으로 보인다.

### 3. 예후와 추적관찰

수술 후 검체에서 유전자 변이를 검사하는 것은 환자의 예후 분석과 위험도를 분류하는 데에 도움이 될 수 있다. 이를 바탕으로 수술 후 약물 치료와 진행되거나 전이된 갑상선암 환자의 표적치료에 응용할 수 있을 것이다.

#### 1) 말초혈액의 갑상선글로불린 측정

갑상선글로불린(thyroglobulin, Tg)은 갑상선 상피세포에서 합성하는 당단백이다. 대부분의 갑상선 분화암은 이를 합성하는 능력이 있어 여포상피세포 기원의 갑상선암 환자를 추적 관찰하는 가장 좋은 표지자로 이용되고 있다. 갑상선글로불린은 면역검사법으로 측정할 수 있다. 검사간의 차이를 줄이기 위해서 Tg 검사는 같은 제조사의 시약을 사용하여 같은 검사실에서 검사하는 것이 좋다. 또한 이들 검사의 결과는 anti-thyroglobulin antibody (TgAb)에 의해 영향을 받으므로 TgAb를 동시에 측정하는 것이 권장된다. 드물게 Tg 측정결과가 heterophil human anti-murine anti-

bodies (HAMA)에 영향을 받기도 한다.

#### 2) 분자 진단방법에 의한 수술 후 추적관찰

(1) *BRAF*, *RAS* 돌연변이 검사: 갑상선분화암은 대부분 임상 경과가 양호하지만, 빠르게 진행되는 경우도 있다. 아직까지는 진행이 느린 종양과 공격적인 종양을 구별하는데 어려움이 있다. 많은 연구들에서 *BRAF* 돌연변이가 종양의 공격성과 관계가 있다고 보고하였다. 또한 재발과 사망을 예측하는 독립인자라는 보고도 있다. 이와 관련된 설명으로 *BRAF* 돌연변이는 MAPK 경로를 활성화시키는데 이는 종양의 역분화를 일으킬 수 있는 것으로 보고되고 있다. 또한, *BRAF* 돌연변이는 sodium-iodine symporter (NIS) expression과 iodine 대사에 영향을 주기 때문에 종양이 방사선요오드치료에 저항성을 획득하는데 관련된 것으로 보고되고 있다. 그러나 *BRAF* 돌연변이가 공격적인 진행을 보일 것으로 기대되는 것보다 더 많은 수의 유두암 환자에서 발견되는 것은 *BRAF* 돌연변이 양성인 환자들에게 영향을 주는 다른 인자가 있음을 시사해준다. 따라서 *BRAF* 돌연변이만으로 위험분류를 하여 적극적으로 치료할 경우 많은 수의 유두암 환자들을 과잉 치료하게 될 위험이 있다. *RAS* 돌연변이는 여포암과 유두암에서 공격적인 진행과 관련된다는 보고들이 있으나, 양성종양과 진행이 느린 종양에서도 *RAS* 돌연변이의 발견이 비슷하여 이를 임상적으로 예후에 이용하는 것은 어려울 것으로 보인다.

(2) 말초혈액을 이용한 Tg, TPO, TSHr, NIS mRNA RT-PCR: 말초혈액 내에 특정 mRNA를 RT-PCR로 측정하는 방법들이 연구되고 있다. RT-PCR은 민감한 검사이므로 우리가 검사하기 원하는 mRNA의 특이도가 매우 중요한데, Tg, thyroid peroxidase (TPO), TSHr, NIS에 대한 mRNA측정이 연구되고 있다. 이 중에서 Tg mRNA에 대한 연구가 가장 많으며, 재발암 진단에 대한 특이도가 58~100%로 연구마다 차이를 보이고 있다. 갑상선암의 재발의 예측에 mRNA의 혈액 내 측정이 더 민감하다는 연구결과[18,55,57,58]와 면역검사법이 더 민감하다는 연구결과[63]가 모두 보고되고 있다. Tg mRNA의 측정에 대한 문제점들은 건강한 사람에서도 측정되며, 국소 및 전이암 환자에 대한 특이도가 25~30%밖에 되지 않으며[59,64-67], Tg mRNA는 림프구 등에서도 전사가 되며[68], 갑상선세포에서 Tg mRNA가 전사되면서 상호짜집기[69]에 대한 문제가 있다. 아직까지 Tg mRNA에 대한 특이도 문제로 임상에서 활용하는 것은 어려운 상태이다. Chinnappa



등[70]은 적절한 시발체 선택으로 100%의 특이도를 얻었다고 보고하였다. Barzon 등[71]은 재발성 및 전이성 암을 발견하는데 Tg, NIS, TSHr, TPO mRNA 연구 결과를 발표하였다. 그들의 연구에서 Tg의 민감도는 93%로 높았고, NIS mRNA의 민감도는 72.4%였다. 그러나 둘 다 특이도가 29.4%로 낮았다. TPO mRNA와 TSHr mRNA는 특이도가 64와 80.6%로 높았으나 민감도가 53과 40%로 낮았다. Ishikawa 등[68]은 33명의 분화갑상선암환자에서 TPO, Tg, TSHr mRNA를 연구하였다. TPO mRNA가 가장 특이도가 높았지만 (96%) 민감도는 61%로 Tg에 비해 떨어졌다. Chinnappa 등[70]은 재발성 및 잔존암의 발견을 위해 말초혈액에서 TSHr mRNA를 측정하여 100%의 민감도와 98%의 높은 특이도를 보고하였다.

## 결론

최근 갑상선암의 발생과 진행에 관련된 분자생물학적 과정에 대한 이해에 많은 진전이 있었다. 이를 바탕으로, 특정한 유전자 변화와 조직학적 특징간의 연관성을 분석하고 진단, 예후인자, 그리고 치료와 관련된 도구로 개발하기 위한 연구들이 진행되고 있다. 아직까지 진단에 있어 유전자 변화에 대한 검사는 세침흡인세포검사에 보조적인 역할로 한정되고 있으나, 여러 유전자 변화들을 분석하여 민감도와 특이도를 높이기 위한 연구들이 이루어지고 있다. 수술 후 재발과 전이에 대한 추적관찰에는 현재 혈청 Tg를 측정하고 있으나 검사방법에 따른 특성과 Tg 항체에 따라 결과의 신뢰성에 문제가 있다고 알려져 있다. 이를 극복하기 위해서 혈액 내 검출되는 갑상선에 특이적인 mRNA가 연구되고 있으며, TSHr mRNA와 TPO mRNA 등의 유용성이 발표되었다. 특히, 말초혈액에서 TSHr mRNA의 측정은 재발암과 잔존암의 발견에 높은 민감도와 특이도를 보고하고 있어 향후 추가적인 연구결과들이 기대된다.

## 참고문헌

1. Jung KW, Park S, Kong HJ, Won YJ, Lee JY, Park EC, et al. Cancer statistics in Korea: incidence, mortality, survival, and prevalence in 2008. *Cancer Res Treat* 2011;43:1-11.
2. Ahn HY, Park YJ. Incidence and clinical characteristics of thyroid cancer in Korea. *Korean J Med* 2009;77: 537-542.

3. Hegedus L. Clinical practice. The thyroid nodule. *N Engl J Med* 2004;351:1764-1771.
4. American Thyroid Association (ATA) Guidelines Taskforce on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer, Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, et al. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2009;19: 1167-1214.
5. Yi KH, Park YJ, Koong SS, Kim JH, Na DG, Ryu JS, et al. Revised Korean Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and thyroid cancer. *J Korean Soc Radiol* 2011;64:389-416.
6. Adeniran AJ, Zhu Z, Gandhi M, Steward DL, Fidler JP, Giordano TJ, et al. Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2006;30:216-222.
7. Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Lima J, Castro P, Preto A, et al. BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene* 2003;22:4578-4580.
8. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 2004;116:855-867.
9. Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005;12:245-262.
10. Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, et al. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88: 5399-5404.
11. Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, Melillo RM, Donghi R, Bongarzone I, et al. PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. *Cell* 1990;60:557-563.
12. Fusco A, Santoro M, Grieco M, Carlomagno F, Dathan N, Fabien N, et al. RET/PTC activation in human thyroid carcinomas. *J Endocrinol Invest* 1995;18:127-129.
13. Nakazawa T, Kondo T, Kobayashi Y, Takamura N, Murata S, Kameyama K, et al. RET gene rearrangements (RET/PTC1 and RET/PTC3) in papillary thyroid carcinomas from an iodine-rich country (Japan). *Cancer* 2005;104:943-951.
14. Bongarzone I, Fugazzola L, Vigneri P, Mariani L, Mondellini P, Pacini F, et al. Age-related activation of the tyrosine kinase receptor protooncogenes RET and NTRK1 in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol*

- Metab* 1996;81:2006-2009.
15. Fenton CL, Lukes Y, Nicholson D, Dinauer CA, Francis GL, Tuttle RM. The ret/PTC mutations are common in sporadic papillary thyroid carcinoma of children and young adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1170-1175.
  16. Basolo F, Giannini R, Monaco C, Melillo RM, Carlomagno F, Pancrazi M, et al. Potent mitogenicity of the RET/PTC3 oncogene correlates with its prevalence in tall-cell variant of papillary thyroid carcinoma. *Am J Pathol* 2002;160:247-254.
  17. Nikiforov YE. RET/PTC rearrangement in thyroid tumors. *Endocr Pathol* 2002;13:3-16.
  18. Tallini G, Ghossein RA, Emanuel J, Gill J, Kinder B, Dimich AB, et al. Detection of thyroglobulin, thyroid peroxidase, and RET/PTC1 mRNA transcripts in the peripheral blood of patients with thyroid disease. *J Clin Oncol* 1998;16:1158-1166.
  19. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3:11-22.
  20. Esapa CT, Johnson SJ, Kendall-Taylor P, Lennard TW, Harris PE. Prevalence of Ras mutations in thyroid neoplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1999;50:529-535.
  21. Vasko V, Ferrand M, Di Cristofaro J, Carayon P, Henry JF, de Micco C. Specific pattern of RAS oncogene mutations in follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2745-2752.
  22. Suarez HG, du Villard JA, Severino M, Caillou B, Schlumberger M, Tubiana M, et al. Presence of mutations in all three ras genes in human thyroid tumors. *Oncogene* 1990;5:565-570.
  23. Zhu Z, Gandhi M, Nikiforova MN, Fischer AH, Nikiforov YE. Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations. *Am J Clin Pathol* 2003;120:71-77.
  24. Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen CJ, Mueller E, Spiegelman BM, et al. PAX8-PPARGgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma. *Science* 2000;289:1357-1360.
  25. Au AY, McBride C, Wilhelm KG Jr, Koenig RJ, Speller B, Cheung L, et al. PAX8-peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARGgamma) disrupts normal PAX8 or PPARGgamma transcriptional function and stimulates follicular thyroid cell growth. *Endocrinology* 2006;147:367-376.
  26. Castro P, Rebocho AP, Soares RJ, Magalhaes J, Roque L, Trovisco V, et al. PAX8-PPARGgamma rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:213-220.
  27. Cheung L, Messina M, Gill A, Clarkson A, Learoyd D, Delbridge L, et al. Detection of the PAX8-PPAR gamma fusion oncogene in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:354-357.
  28. Dwight T, Thoppe SR, Foukakis T, Lui WO, Wallin G, Hoog A, et al. Involvement of the PAX8/peroxisome proliferator-activated receptor gamma rearrangement in follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:4440-4445.
  29. Freitas BC, Cerutti JM. Genetic markers differentiating follicular thyroid carcinoma from benign lesions. *Mol Cell Endocrinol* 2010;321:77-85.
  30. French CA, Alexander EK, Cibas ES, Nose V, Laguette J, Faquin W, et al. Genetic and biological subgroups of low-stage follicular thyroid cancer. *Am J Pathol* 2003;162:1053-1060.
  31. He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagy R, Volinia S, et al. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:19075-19080.
  32. Pallante P, Visone R, Ferracin M, Ferraro A, Berlingieri MT, Troncone G, et al. MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas. *Endocr Relat Cancer* 2006;13:497-508.
  33. Tetzlaff MT, Liu A, Xu X, Master SR, Baldwin DA, Tobias JW, et al. Differential expression of miRNAs in papillary thyroid carcinoma compared to multinodular goiter using formalin fixed paraffin embedded tissues. *Endocr Pathol* 2007;18:163-173.
  34. Visone R, Russo L, Pallante P, De Martino I, Ferraro A, Leone V, et al. MicroRNAs (miR)-221 and miR-222, both overexpressed in human thyroid papillary carcinomas, regulate p27Kip1 protein levels and cell cycle. *Endocr Relat Cancer* 2007;14:791-798.
  35. Nikiforova MN, Tseng GC, Steward D, Diorio D, Nikiforov YE. MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:1600-1608.
  36. Baloch ZW, LiVolsi VA, Asa SL, Rosai J, Merino MJ, Randolph G, et al. Diagnostic terminology and morphologic criteria for cytologic diagnosis of thyroid lesions: a synopsis of the National Cancer Institute Thyroid Fine-Needle Aspiration State of the Science Conference. *Diagn Cytopathol* 2008;36:425-437.
  37. Theoharis CG, Schofield KM, Hammers L, Udelsman R, Chhieng DC. The Bethesda thyroid fine-needle aspiration classification system: year 1 at an academic institution. *Thyroid* 2009;19:1215-1223.
  38. Baloch ZW, Fleisher S, LiVolsi VA, Gupta PK. Diagnosis of "follicular neoplasm": a gray zone in thyroid fine-needle

- dle aspiration cytology. *Diagn Cytopathol* 2002;26:41-44.
39. Faquin WC, Baloch ZW. Fine-needle aspiration of follicular patterned lesions of the thyroid: Diagnosis, management, and follow-up according to National Cancer Institute (NCI) recommendations. *Diagn Cytopathol* 2010;38:731-739.
  40. Yang J, Schnadig V, Logrono R, Wasserman PG. Fine-needle aspiration of thyroid nodules: a study of 4703 patients with histologic and clinical correlations. *Cancer* 2007;111:306-315.
  41. Layfield LJ, Morton MJ, Cramer HM, Hirschowitz S. Implications of the proposed thyroid fine-needle aspiration category of "follicular lesion of undetermined significance": a five-year multi-institutional analysis. *Diagn Cytopathol* 2009;37:710-714.
  42. Nayar R, Ivanovic M. The indeterminate thyroid fine-needle aspiration: experience from an academic center using terminology similar to that proposed in the 2007 National Cancer Institute Thyroid Fine Needle Aspiration State of the Science Conference. *Cancer* 2009;117:195-202.
  43. Shi Y, Ding X, Klein M, Sugrue C, Matano S, Edelman M, et al. Thyroid fine-needle aspiration with atypia of undetermined significance: a necessary or optional category? *Cancer* 2009;117:298-304.
  44. Gharib H, Goellner JR, Johnson DA. Fine-needle aspiration cytology of the thyroid: a 12-year experience with 11,000 biopsies. *Clin Lab Med* 1993;13:699-709.
  45. Ravetto C, Colombo L, Dottorini ME. Usefulness of fine-needle aspiration in the diagnosis of thyroid carcinoma: a retrospective study in 37,895 patients. *Cancer* 2000;90:357-363.
  46. Castro MR, Gharib H. Thyroid fine-needle aspiration biopsy: progress, practice, and pitfalls. *Endocr Pract* 2003;9:128-136.
  47. Castro MR, Gharib H. Continuing controversies in the management of thyroid nodules. *Ann Intern Med* 2005;142:926-931.
  48. Kumagai A, Namba H, Akanov Z, Saenko VA, Meirmanov S, Ohtsuru A, et al. Clinical implications of pre-operative rapid BRAF analysis for papillary thyroid cancer. *Endocr J* 2007;54:399-405.
  49. Sapio MR, Posca D, Raggioli A, Guerra A, Marotta V, Deandrea M, et al. Detection of RET/PTC, TRK and BRAF mutations in preoperative diagnosis of thyroid nodules with indeterminate cytological findings. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007;66:678-683.
  50. Jo YS, Huang S, Kim YJ, Lee IS, Kim SS, Kim JR, et al. Diagnostic value of pyrosequencing for the BRAF V600E mutation in ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy samples of thyroid incidentalomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2009;70:139-144.
  51. Pizzolanti G, Russo L, Richiusa P, Bronte V, Nuara RB, Rodolico V, et al. Fine-needle aspiration molecular analysis for the diagnosis of papillary thyroid carcinoma through BRAF V600E mutation and RET/PTC rearrangement. *Thyroid* 2007;17:1109-1115.
  52. Cantara S, Capezzone M, Marchisotta S, Capuano S, Busonero G, Toti P, et al. Impact of proto-oncogene mutation detection in cytological specimens from thyroid nodules improves the diagnostic accuracy of cytology. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:1365-1369.
  53. Nikiforov YE, Steward DL, Robinson-Smith TM, Haugen BR, Klopper JP, Zhu Z, et al. Molecular testing for mutations in improving the fine-needle aspiration diagnosis of thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:2092-2098.
  54. Vdovichenko KK, Markova SI, Belokhvostov AS. Mutant form of BRAF gene in blood plasma of cancer patients. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1022:228-231.
  55. Wagner K, Arciaga R, Siperstein A, Milas M, Warshawsky I, Sethu S, et al. Thyrotropin receptor/thyroglobulin messenger ribonucleic acid in peripheral blood and fine-needle aspiration cytology: diagnostic synergy for detecting thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:1921-1924.
  56. Chia SY, Milas M, Reddy SK, Siperstein A, Skugor M, Brainard J, et al. Thyroid-stimulating hormone receptor messenger ribonucleic acid measurement in blood as a marker for circulating thyroid cancer cells and its role in the preoperative diagnosis of thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:468-475.
  57. Fugazzola L, Mihalich A, Persani L, Cerutti N, Reina M, Bonomi M, et al. Highly sensitive serum thyroglobulin and circulating thyroglobulin mRNA evaluations in the management of patients with differentiated thyroid cancer in apparent remission. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3201-3208.
  58. Grammatopoulos D, Elliott Y, Smith SC, Brown I, Grieve RJ, Hillhouse EW, et al. Measurement of thyroglobulin mRNA in peripheral blood as an adjunctive test for monitoring thyroid cancer. *Mol Pathol* 2003; 56:162-166.
  59. Bojunga J, Roddiger S, Stanisch M, Kusterer K, Kurek R, Renneberg H, et al. Molecular detection of thyroglobulin mRNA transcripts in peripheral blood of patients with thyroid disease by RT-PCR. *Br J Cancer* 2000;82:1650-1655.
  60. Cradic KW, Milosevic D, Rosenberg AM, Erickson LA, McIver B, Grebe SK. Mutant BRAF(T1799A) can be detected in the blood of papillary thyroid carcinoma patients and correlates with disease status. *J Clin*

- Endocrinol Metab* 2009;94:5001-5009.
61. Chuang TC, Chuang AY, Poeta L, Koch WM, Califano JA, Tufano RP. Detectable BRAF mutation in serum DNA samples from patients with papillary thyroid carcinomas. *Head Neck* 2010;32:229-234.
  62. Gianoukakis AG, Giannelli SM, Salameh WA, McPhaul LW. Well differentiated follicular thyroid neoplasia: impact of molecular and technological advances on detection, monitoring and treatment. *Mol Cell Endocrinol* 2011;332:9-20.
  63. Bellantone R, Lombardi CP, Bossola M, Ferrante A, Princi P, Boscherini M, et al. Validity of thyroglobulin mRNA assay in peripheral blood of postoperative thyroid carcinoma patients in predicting tumor recurrences varies according to the histologic type: results of a prospective study. *Cancer* 2001;92:2273-2279.
  64. Bugalho MJ, Domingues RS, Pinto AC, Garrao A, Catarino AL, Ferreira T, et al. Detection of thyroglobulin mRNA transcripts in peripheral blood of individuals with and without thyroid glands: evidence for thyroglobulin expression by blood cells. *Eur J Endocrinol* 2001;145:409-413.
  65. Elisei R, Vivaldi A, Agate L, Molinaro E, Nencetti C, Grasso L, et al. Low specificity of blood thyroglobulin messenger ribonucleic acid assay prevents its use in the follow-up of differentiated thyroid cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:33-39.
  66. Karavitaki N, Lembessis P, Tzanela M, Vlassopoulou V, Thalassinou N, Koutsilieris M. Molecular staging using qualitative RT-PCR analysis detecting thyroglobulin mRNA in the peripheral blood of patients with differentiated thyroid cancer after therapy. *Anticancer Res* 2005;25:3135-3142.
  67. Ringel MD, Ladenson PW, Levine MA. Molecular diagnosis of residual and recurrent thyroid cancer by amplification of thyroglobulin messenger ribonucleic acid in peripheral blood. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:4435-4442.
  68. Ishikawa T, Miwa M, Uchida K. Quantitation of thyroid peroxidase mRNA in peripheral blood for early detection of thyroid papillary carcinoma. *Thyroid* 2006;16:435-442.
  69. Mercken L, Simons MJ, Brocas H, Vassart G. Alternative splicing may be responsible for heterogeneity of thyroglobulin structure. *Biochimie* 1989;71:223-226.
  70. Chinnappa P, Taguba L, Arciaga R, Faiman C, Siperstein A, Mehta AE, et al. Detection of thyrotropin-receptor messenger ribonucleic acid (mRNA) and thyroglobulin mRNA transcripts in peripheral blood of patients with thyroid disease: sensitive and specific markers for thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:3705-3709.
  71. Barzon L, Boscaro M, Pacenti M, Taccaliti A, Palu G. Evaluation of circulating thyroid-specific transcripts as markers of thyroid cancer relapse. *Int J Cancer* 2004;110:914-920.