

REVIEW ARTICLE

ISSN 1598-1703 (Print) ISSN 2287-6782 (Online)
 Korean J Endocr Surg 2015;15:53-59
<http://dx.doi.org/10.16956/kaes.2015.15.3.53>

The Korean Journal of Endocrine Surgery

갑상선 암의 분자 진단

Open NBI Convergence Technology Research Laboratory, 연세대학교 의과대학 외과학교실, 내과학교실¹

이슬기 · 조영석¹ · 이잔디

Molecular Testing in Diagnosis of Thyroid Cancer

Seulgi Lee, Young Suk Jo¹,
Jandee Lee

*Open NBI Convergence Technology
Research Laboratory, Departments of
Surgery and Internal Medicine¹, Yonsei
University College of Medicine, Seoul,
Korea*

With increasing prevalence of thyroid nodules, clinicians are increasingly impelled to identify the optimal predictor of thyroid cancer, with the goal of guiding management based on assessed risk. Fine-needle aspiration cytology is the gold standard diagnostic method for thyroid nodules. However, fine-needle aspiration cytology is not perfect and adjuncts which might complement its predictive value are being investigated from several innovative perspectives. For these vigorous efforts, remarkable advances have been achieved in understanding several major biologic areas of thyroid cancer, including the molecular alterations for loss of radioiodine avidity of thyroid cancer, the pathogenic role of the MAP kinase and PI3K/Akt pathways and their related genetic alterations in thyroid tumorigenesis and pathogenesis. These exciting advances provide unprecedented opportunities for development of molecular-based novel diagnostic and therapeutic strategies for thyroid cancer. The common somatic genetic changes in thyroid cancer of follicular cell origin (RET/PTC, NTRK, RAS, BRAF, PAX8-PPAR γ) are generally mutually exclusive, with distinct genotype-histologic subtype associations of thyroid cancer. Mutation analysis in fine needle aspiration samples has been applied to improve the diagnostic accuracy. In studies regarding gene expression profiling, aberrant gene methylation and miRNA have shown significant progress toward identification of biomarkers that could improve the accuracy of fine needle aspiration cytology in the evaluation of patients with thyroid nodule and prediction of disease aggressiveness. Future clinical trials evaluating the accuracy and cost-effectiveness of applying these biomarkers in the management of thyroid neoplasm should be considered.

This study was supported by National Research Foundation of Korea (NRF) grants funded by the Korean government (MEST) (2014R1A1A2059343).

Received August 8, 2015,
Revised August 30, 2015,
Accepted September 5, 2015
Correspondence: **Jandee Lee**
Department of Surgery, Yonsei University
College of Medicine, 50-1, Yonsei-ro,
seodaemun-gu, Seoul 03722, Korea
Tel: +82-2-2228-0888
Fax: +82-2-313-8289
E-mail: JANDEE@yuhs.ac

Key Words: Thyroid neoplasms, Molecular testing, Mutation, MicroRNAs

중심 단어: 갑상선암, 분자 진단, 돌연변이, 마이크로알엔에이

서 론

국내 보고에 따르면 갑상선 결절은 전체 인구의 4~7%에서 만져지며, 초음파검사를 시행할 경우 40세 이상 성인의 50%까지 갑상선 결절이 발견된다고 한다. 외국의 연구에서도 이와 유사한 결과를 보이는데, 65세 이상의 성인에서 50% 이상이 갑상선 결절을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다.(1) 대부분의 갑상선 결절은 치료가 필요 없는 양성 결절이지만, 전체의 10~15%

가 세침흡인 세포검사를 시행할 경우 악성으로 진단된다.(2-5) 그러나, 현재 임상에서 양성과 악성을 구별하는 표준검사인 세침흡인 세포검사가 모든 악성결절을 진단해 내는 것은 아니다. 특히, 10~40% 정도로 보고되는 중간형(indeterminate) 결절인 경우, 임상이가 매우 곤혹스러운 의사결정을 하게 하기도 한다.(6-8)

갑상선 세포검사를 판정하는 기준이 되는 Bethesda system을 보면, 중간형(indeterminate) 결절은 크게 세 가지 카테고리

로 나눌 수 있는데, 첫번째는 비정형(atypia of undetermined significance or follicular lesion of undetermined significance, FLUS), 두번째는 여포(follicular) 또는 oncocytic (Hürthle cell) 종양 그리고 마지막으로 악성이 의심스러운(suspicious malignancy) 경우이다. 새로운 분류 방법의 임상적 의의는 추후 시행될 연구결과를 지켜봐야 하겠지만, 현재까지의 결과들로 미루어 카테고리 별로 5~10, 20~30 그리고 50~75%가 갑상선 암일 것으로 추측할 수 있다.(9) 그러나, 이러한 예측율은 상당수의 환자가 진단을 위한 수술을 받아야 함을 시사하며 수술에 따르는 비용이나 비록 드물긴 하지만 수술 후 발생 가능한 합병증, 또는 진단적 절제술을 시행 받은 환자가 악성으로 진단될 경우 2차수술을 시행 받아야 함을 등을 고려할 때, 세침흡인 세포검사의 진단적 정확도를 향상시키는 것이 매우 중요함을 반증한다.(2,10-13) 이는 최근 개정된 미국갑상선학회이나 개정을 준비중인 대한갑상선학회의 갑상선 결절 및 암 진료권고안에서도 비중이 있게 다루어지고 있으며, 특정 분자 표지자를 진단에 적용할 수 있음을 언급하고 있다.(14)

이에 본 종설에서는 최근 각광을 받고 있는 갑상선암 유전자 검사를 중심으로 세침흡인 세포검사에서 적용 가능한 분자 진단법을 정리하고 그 의의를 고찰해 보고자 한다.

갑상선 결절에서 분자 진단법의 개요

세포검사 검체에서 갑상선 암을 진단하기 위한 분자 진단법은 암 발생의 초기 단계에서부터 중요한 역할을 하는 유전적 이상이 나 후생유전학적 변화(methylation marker 또는 miRNA)를 찾

거나 또는 암의 발생, 진행과정에서 나타나는 RNA나 단백질 등의 발현 변화를 확인하는 것으로 정리할 수 있다. 이와 더불어, 최근에는 생물정보학(Bioinformatics)의 발달로 암에서 발생하는 다양한 생물학적인 변화를 분자 수준에서 분석하고 암을 분류해 내는 방법도 각광을 받고 있다(Fig. 1).(15,16) 특히, 분자 진단법은 갑상선암의 대부분을 차지하고 있고, 임상적 특징만으로는 예후를 예측하기가 어려운 분화 갑상선암을 주요 적용 대상이 되고 있다.

갑상선암의 분자 유전학

현재까지 다양한 유전자 이상이 갑상선 암을 발생과 진행에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Table 1). 갑상선 유두암에서는 BRAF과 RAS 점 돌연변이, RET/PTC와 TRK/T 재배열 등이 원인 유전자로 밝혀졌으며, 이들 모두 MEK-ERK 신호 전달체계의 활성화를 통해 암화 과정을 유도하는 것으로 알려져 있다. 이들 유전자 이상은 상호 배타적으로 관찰되며, 갑상선 유두암의 70% 이상에서 원인이 될 것으로 추정된다.(17-19) 갑상선 여포암의 경우에도 RAS 점 돌연변이와 PAX8/PPAR γ 재배열을 가지고 있는데, 이들 역시도 상호 배타적으로 관찰되며 전체 갑상선 여포암의 80%에서 관찰된다.(20) 이외에도 PI3/AKT 신호전달체계와 연관된 유전자 이상이 일부 분화 갑상선암이나 미분화 갑상선암에서 관찰되며,(21-23) TP53나 CTNNB1과 연관된 유전자 이상도 미분화갑상선암 또는 역형성암에서 확인된다.(15) 잘 알려진 바와 같이 갑상선 수질암은 RET 유전자의 점 돌연변이와 연관이 있다.(24)

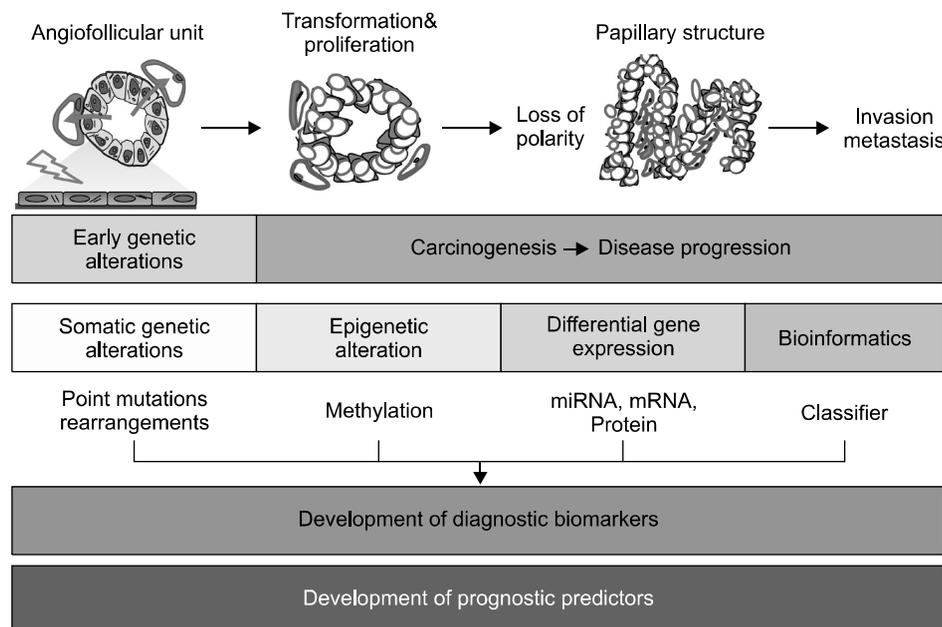


Fig. 1. Core Concepts in Biomarker Development.

Table 1. Genetic alterations in thyroid neoplasia

Gene/Protein	Type of gene	Chromosome location	Genetic abnormality	Tumor
TSH receptor	GPCR receptor	14q31	Point mutations	Toxic adenoma, DTC
Gs α	G protein	20q13.2	Point mutations	Toxic adenoma, DTC
RET/PTC	Receptor tyrosine kinase	10q11.2	Rearrangements	PTC
RET	Receptor tyrosine kinase	10q11.2	Point mutations	MEN2
BRAF	MEK kinase	7q24	Point mutations, rearrangements	PTC
TRK	Receptor tyrosine kinase	1q23-24	Rearrangements	MNG, PTC
RAS	Signal transducing p21	Hras 11p15.5 Kras12p12.1; Nras1p13.2	Point mutations	DTC
P53	Tumor suppressor	17p13	Point mutations Deletions, insertion	ATC
APC	Tumor suppressor	5q21-q22	Point mutations	ATC
p16	Tumor suppressor	9p21	Deletions	DTC
p21	Tumor suppressor	6p21.2	Overexpression	ATC
MET	Receptor tyrosine kinase	7q31	Overexpression	FTC
c-MYC	Receptor tyrosine kinase	8q24.12.-13	Overexpression	DTC
PTEN	Phosphatase	10q23	Point mutations	PTC in Cowden's synd.
CTNNB1	β -catenin	3p22	Point mutations	ATC
LOH	Tumor suppressor	3p; 11q13 Other loci	Deletions	DTC, ATC
PAX8-PPAR γ	Transcription factor Nuclear receptor fusion	t(2;3)(q13;p25)	Translocation	FA or FTC

Source: Adapted from Harrison's principle of internal medicine 17th edition.

이렇듯 다양한 유전자 이상이 밝혀지면서 이들 중, 네 가지 유전자 이상 즉 BRAF 및 RAS 점돌연변이, RET/PTC 및 PAX8/PPAR 재배열 등이 갑상선암의 진단과 예후 예측을 위한 분자진단에 많이 적용되어 오고 있다. 특히, 현재 임상에서 가장 많이 관심을 갖거나 실제로 활용하고 있는 것은 단연 BRAF^{V600E} 돌연변이 진단법일 것이다. 이는 DNA를 활용한 검사가 비교적 임상에서 적용하기가 수월하며, 특히 국내에서는 분화 갑상선암의 대부분이 갑상선 유두암이고, 또한 갑상선 유두암의 60~80%가 BRAF^{V600E} 돌연변이에 기인하여 단일 검사로서의 활용성이 높다는 데 그 이유를 찾을 수 있다.(1,25,26)

이상에서 언급한 유전자 이상 이외에도 갑상선암에서 발현의 변화가 특징적인 galectin-3나 HBME-1 등과 같은 특정 단백질의 발현을 세침흡인검체에서 평가하는 방법이 지속적으로 연구되고 있으며,(27,28) 메틸화(methylation) 또는 miRNA 마커와 같은 분자 표지자가 갑상선 암의 진단을 위해 사용 가능한 후보로 대두되고 있다.(29-33) 특히, 많은 수의 miRNA가 세포 특이적인 발현 패턴을 보이며 갑상선암에서 정상 조직과 비교하여 뚜렷한 발현 변화를 보인다는 점 등은 miRNA 마커가 향후 분자진단법에 적용될 가능성을 높여 주고 있다.(34,35)

갑상선암의 분자 진단

현재의 분자진단 기술은 갑상선 결절로부터 얻은 세침흡인 세포검체나 수술을 통해 얻은 조직으로부터 다양한 유전자 이상을 확인할 수 있다. 본 종설에서는 이러한 방법들 중 세침흡인 세포검체에 적용 가능한 기법을 중심으로 정리해 보고자 한다.

많은 수의 연구가 세침흡인세포검사의 정확성을 향상시키기 위해 이루어져 왔으며, 이들 중 가장 많이 연구된 것은 앞서 언급한 바와 같이 BRAF 돌연변이 검사이다. 2009년도까지의 보고를 종합해 보면, 2,799개의 검체가 BRAF 돌연변이 검사가 이루어 졌으며, 세포 검체를 이용한 9개의 전향적 연구,(1,36-43) 7개의 후향적 연구(44-50) 그리고 수술로 얻은 조직에 세침흡인을 시행하여 얻은 세포검체를 이용한 2개의 연구가 수행되었다.(51,52) 이들 연구를 종합해보면, 전체 581예의 BRAF^{V600E} 양성 결절 중 1예를 제외한 580예가 모두 갑상선 유두암으로 판정되어 위양성율(false positive rate)이 0.2%에 불과하였다. 또한, 중간형 결절로 판정된 세포검체에서도 15~39%정도의 BRAF^{V600E} 양성 갑상선 유두암을 진단해 내거나, 세침흡인세포검사상 비진단적(nondiagnostic) 또는 양성(benign) 결과를 보인 경우에도 BRAF^{V600E} 양성 결절은 갑상선 유두암임을 입증하기도 하였다.(1,43) 이외에도 RET/PTC, TRK, PAX8/PPAR γ 또는 RAS 돌연변이를 BRAF^{V600E} 검사와 병행하여 시행함으로써

써 진단적 가치를 입증한 연구도 수행되어 있다.(1) Nikiforov 등이 수행한 이 연구에서 유전자 이상은 갑상선 암을 진단하는 강력한 지표로 입증되었는데, 중간형 51예 중 32예에서 돌연변이를 진단하였으며 1예의 여포 선종(follicular adenoma)을 제외한 31예가 모두 갑상선암으로 수술을 통해 확진이 되었다. 또한, 이 연구는 중간형 결과를 보인 갑상선 결절에서 갑상선암의 가능성이 40%에 불과한 반면, 돌연변이가 확인될 경우 100%, 돌연변이가 없을 경우 14%로 갑상선암일 가능성이 증가 또는 감소함도 보여주었다.

이렇듯 유전자 이상을 포함한 분자표지자의 진단적 가치가 입증되어 감에 따라, 2009년에 개정된 미국갑상선학회의 진료권고안에서도 중간형 세포검사를 보인 결절의 경우 BRAF^{V600E}, RAS, RET/PTC 그리고 PAX8/PPAR γ 와 같은 유전자 이상을 검사하는 것이 진단과 치료에 도움이 될 수 있음을 기술하였다.(14) 그러나, 중간형 결절 중에 비교적 암일 가능성이 낮은 비정형세포를 보이는 경우(FIUS)나 양성 결절에서 이들 유전자 검사를 임상적으로 시행하는 것은 비용-효과적인 측면을 고려한 추시 연구가 필요할 것으로 생각된다.

유전자 이상을 검사하는 것과 병행하여 다른 분자 표지자를 추가 검사하는 것도 갑상선암의 진단 민감도를 향상시키는데 유용한 것으로 알려지고 있다. 이러한 분자표지자들 중에 최근 각광을 받고 있는 것이 miRNA이다. Table 2에서 보는 바와 같이 다양한 miRNA가 갑상선암에서 증가 또는 감소하는 것으로 알려져 있다. Pallante 등(34)이 수행한 연구에서는 갑상선 유두암에서 얻은 세포검체 8예 중 7예(88%)에서 miRNA-221, miRNA-222 및 miRNA-181b가 증가되어 있었으며, Nikiforova 등(33)의 연구에서는 miRNA-187, miRNA-221, miRNA-222, miRNA-146b, miRNA-224, miRNA-155 및 miRNA-197 등이 증가되어 있었다. 최근에는 miRNA-146b의 발현이 고위험군 및 BRAF^{V600E}에 의한 갑상선암에서 증가되어 있어 예후를 예측하는데 활용할 수 있는 가능성이 있음이 제시되기도 하였다.(53) 그러나, miRNA 마커는

돌연변이 검사들 만큼 임상 적용을 위한 광범위한 연구가 수행된 것은 아니어서 이 역시 추시 연구가 필요한 실정이다.

분자진단의 실제적인 문제점

이상에서 살펴본 바와 같이, 돌연변이와 miRNA의 발현을 중심으로 갑상선암의 분자진단을 위하여 다양한 방법들이 개발되어 임상적 적용 가능성을 검증되고 있다. 그러나, 분자 진단의 실제적 적용에 있어 어떤 방법을 이용할 것인가 하는 문제도 중요하다. 임상에서 활용되는 검사는 고도로 정확해야 하며, 재현성이 뛰어나야 하고 그 방법 자체가 상대적으로 보편화되어 있어야 하기 때문이다.

먼저, 상대적으로 단순한 점 돌연변이 즉 BRAF 이나 RAS 돌연변이 검사법을 보면 직접염기서열분석법, pyrosequencing, allele-specific PCR, Colorimetric mutector assay, real-time LightCycler polymerase chain reaction (LC PCR) 및 Dual priming oligonucleotide-based multiplex PCR 등과 같이 다양한 방법들이 적용되고 있다.(42,44,54,55) 보고된 바에 따르면, 이들 방법들이 모두 높은 수준의 진단 민감도를 보이고 있으나, 극단적으로 민감도를 향상시킬 경우 위양성율이 높아지고 진단의 정확도가 낮아짐을 유의하여야 하겠다.(35) RET/PTC 나 PAX8/PPAR γ 와 같은 유전자 재배열을 진단에 응용할 때 검사법은 더욱 중요해진다. 특히, RET/PTC의 경우 1% 이하의 종양세포를 찾아내는 정도로 검사의 민감도가 높을 경우 임상적 의의가 없는 비클론성 재배열(nonclonal rearrangement)를 검출할 가능성이 있다.(56) 따라서, 8~12% 정도의 종양세포를 찾아내는 정도의 민감도를 지닌 검사법을 이용하는 것이 적절하다고 하겠다. 민감도의 문제와 더불어 RET/PTC나 PAX8/PPAR γ 검사는 검체의 신선도도 매우 중요하다. 즉, 포르말린이나 파라핀에 고정된 샘플에서 이러한 유전자 이상을 검사하는 것은 심한 RNA 손상으로 거의 불가능하다며, 고정된 세포 검체도 RET/

Table 2. miRNA expression in thyroid tumors

Tumor type	miRNA	
Follicular carcinoma	miR-197,-346	Up
Follicular carcinoma, conventional type	miR-187,-221,-222,-224,-155	Up
Follicular carcinoma, oncocytic type	miR-221,-224,-203,-183,-339,-31	Up
Follicular adenoma, conventional type	miR-339,-224,-205,-210,-190,-328,-342	Up
Follicular adenoma, oncocytic type	miR-221,-224,-203,-183,-339,-31	Up
Poorly differentiated carcinoma	miR-187,-221,-129,-222,-146b,-339,-183	Up
Anaplastic carcinoma	miR-222(2-folds)	Up
	miR-30d,-125b,-26a,-30a,-5p	Down
Anaplastic carcinoma	miR-302c,-205,-137,-214,-155,-224,-222,-221	Up
Medullary carcinoma	miR-323,-370,-129,-137,-10a,-124a,-224,-127,-9,-154	Up

Source: Adapted from Endocr Pathol (2009) 20:85-91.

PTC나 PAX8/PPAR γ 검사에는 부적절한 것으로 알려져 있다. 따라서, 세침흡인 또는 수술 직후 확보한 검체를 이용하는 것이 매우 중요하다고 볼 수 있다. 이러한 검체의 문제는 miRNA 마커를 분석할 때도 역시 고려해야 할 부분이다.

결론

세침흡인 세포검체를 이용한 종양 유전자 검출, 특정 단백질의 발현 분석, 메틸화 바이오마커 또는 miRNA 마커 분석과 같은 다양한 분자 진단법이 세포검사의 진단 정확도를 향상시키고 갑상선암의 진행을 예측하기 위해 개발되고 있다. 앞으로 이러한 분자 진단법의 비용-효과적인 측면을 고려한 대규모 연구 결과가 나올 것을 기대하면서 결론을 갈음하고자 한다.

REFERENCES

- 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;94:2092-8.
- Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, et al; American Thyroid Association Guidelines Taskforce. Management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2006;16:109-42.
- Frates MC, Benson CB, Doubilet PM, Kunreuther E, Contreras M, Cibas ES, et al. Prevalence and distribution of carcinoma in patients with solitary and multiple thyroid nodules on sonography. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3411-7.
- Kim DL, Song KH, Kim SK. High prevalence of carcinoma in ultrasonography-guided fine needle aspiration cytology of thyroid nodules. *Endocr J* 2008;55:135-42.
- Papini E, Guglielmi R, Bianchini A, Crescenzi A, Taccogna S, Nardi F, et al. Risk of malignancy in nonpalpable thyroid nodules: predictive value of ultrasound and color-Doppler features. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1941-6.
- Greaves TS, Olvera M, Florentine BD, Raza AS, Cobb CJ, Tsao-Wei DD, et al. Follicular lesions of thyroid: a 5-year fine-needle aspiration experience. *Cancer* 2000;90:335-41.
- Sclabas GM, Staerkel GA, Shapiro SE, Fornage BD, Sherman SI, Vassilopoulos-Sellin R, et al. Fine-needle aspiration of the thyroid and correlation with histopathology in a contemporary series of 240 patients. *Am J Surg* 2003;186:702-9; discussion 709-10.
- Yassa L, Cibas ES, Benson CB, Frates MC, Doubilet PM, Gawande AA, et al. Long-term assessment of a multidisciplinary approach to thyroid nodule diagnostic evaluation. *Cancer* 2007;111:508-16.
- 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;36:425-37.
- Mazzaferri EL. Management of a solitary thyroid nodule. *N Engl J Med* 1993;328:553-9.
- Baloch ZW, Fleisher S, LiVolsi VA, Gupta PK. Diagnosis of "follicular neoplasm": a gray zone in thyroid fine-needle aspiration cytology. *Diagn Cytopathol* 2002;26:41-4.
- Callcut RA, Selvaggi SM, Mack E, Ozgul O, Warner T, Chen H. The utility of frozen section evaluation for follicular thyroid lesions. *Ann Surg Oncol* 2004;11:94-8.
- Robertson ML, Steward DL, Gluckman JL, Welge J. Continuous laryngeal nerve integrity monitoring during thyroidectomy: does it reduce risk of injury? *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;131:596-600.
- 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;19:1167-214.
- Kondo T, Ezzat S, Asa SL. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer* 2006;6:292-306.
- Fagin JA. Genetics of papillary thyroid cancer initiation: implications for therapy. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2005;116:259-69; discussion 269-71.
- 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;30:216-22.
- Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 2003;63:1454-7.
- 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;22:4578-80.
- Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, Alexander EK, Dorn GW 2nd, Tallini G, et al. RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2318-26.
- García-Rostán G, Costa AM, Pereira-Castro I, Salvatore G, Hernandez R, Hermsem MJ, et al. Mutation of the PIK3CA gene in anaplastic thyroid cancer. *Cancer Res* 2005;65:10199-207.
- Hou P, Liu D, Shan Y, Hu S, Studeman K, Condouris S, et al. Genetic alterations and their relationship in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:1161-70.
- Ricarte-Filho JC, Ryder M, Chitale DA, Rivera M, Heguy A, Ladanyi M, et al. Mutational profile of advanced primary and metastatic radioactive iodine-refractory thyroid cancers reveals distinct pathogenetic roles for BRAF, PIK3CA, and AKT1. *Cancer Res* 2009;69:4885-93.
- de Groot JW, Links TP, Plukker JT, Lips CJ, Hofstra RM. RET as

- a diagnostic and therapeutic target in sporadic and hereditary endocrine tumors. *Endocr Rev* 2006;27:535-60.
25. Jo YS, Li S, Song JH, Kwon KH, Lee JC, Rha SY, et al. Influence of the BRAF V600E mutation on expression of vascular endothelial growth factor in papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3667-70.
 26. Kim TY, Kim WB, Rhee YS, Song JY, Kim JM, Gong G, et al. The BRAF mutation is useful for prediction of clinical recurrence in low-risk patients with conventional papillary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006;65:364-8.
 27. Huang Y, Prasad M, Lemon WJ, Hampel H, Wright FA, Kornacker K, et al. Gene expression in papillary thyroid carcinoma reveals highly consistent profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:15044-9.
 28. Franco C, Martínez V, Allamand JP, Medina F, Glasinovic A, Osorio M, et al. Molecular markers in thyroid fine-needle aspiration biopsy: a prospective study. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2009;17:211-5.
 29. Hoque MO, Rosenbaum E, Westra WH, Xing M, Ladenson P, Zeiger MA, et al. Quantitative assessment of promoter methylation profiles in thyroid neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4011-8.
 30. Hu S, Ewertz M, Tufano RP, Brait M, Carvalho AL, Liu D, et al. Detection of serum deoxyribonucleic acid methylation markers: a novel diagnostic tool for thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:98-104.
 31. Xing M. Gene methylation in thyroid tumorigenesis. *Endocrinology* 2007;148:948-53.
 32. 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;102:19075-80.
 33. 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;93:1600-8.
 34. 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.
 35. Nikiforova MN, Nikiforov YE. Molecular diagnostics and predictors in thyroid cancer. *Thyroid* 2009;19:1351-61.
 36. 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.
 37. Xing M, Tufano RP, Tufano AP, Basaria S, Ewertz M, Rosenbaum E, et al. Detection of BRAF mutation on fine needle aspiration biopsy specimens: a new diagnostic tool for papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2867-72.
 38. Domingues R, Mendonça E, Sobrinho L, Bugalho MJ. Searching for RET/PTC rearrangements and BRAF V599E mutation in thyroid aspirates might contribute to establish a preoperative diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *Cytopathology* 2005;16:27-31.
 39. 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;17:1109-15.
 40. Sapiro MR, Guerra A, Posca D, Limone PP, Deandrea M, Motta M, et al. Combined analysis of galectin-3 and BRAFV600E improves the accuracy of fine-needle aspiration biopsy with cytological findings suspicious for papillary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer* 2007;14:1089-97.
 41. Sapiro MR, Posca D, Raggioli A, Guerra A, Marotta V, Deandrea M, et al. Detection of RET/PTC, TRK and BRAF mutations in pre-operative diagnosis of thyroid nodules with indeterminate cytological findings. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007;66:678-83.
 42. 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;70:139-44.
 43. Zatelli MC, Trasforini G, Leoni S, Frigato G, Buratto M, Tagliati F, et al. BRAF V600E mutation analysis increases diagnostic accuracy for papillary thyroid carcinoma in fine-needle aspiration biopsies. *Eur J Endocrinol* 2009;161:467-73.
 44. Jin L, Sebo TJ, Nakamura N, Qian X, Oliveira A, Majerus JA, et al. BRAF mutation analysis in fine needle aspiration (FNA) cytology of the thyroid. *Diagn Mol Pathol* 2006;15:136-43.
 45. Cohen Y, Rosenbaum E, Clark DP, Zeiger MA, Umbricht CB, Tufano RP, et al. Mutational analysis of BRAF in fine needle aspiration biopsies of the thyroid: a potential application for the preoperative assessment of thyroid nodules. *Clin Cancer Res* 2004;10:2761-5.
 46. Salvatore G, Giannini R, Faviana P, Caleo A, Migliaccio I, Fagin JA, et al. Analysis of BRAF point mutation and RET/PTC rearrangement refines the fine-needle aspiration diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:5175-80.
 47. Rowe LR, Bentz BG, Bentz JS. Utility of BRAF V600E mutation detection in cytologically indeterminate thyroid nodules. *Cytojournal* 2006;3:10.
 48. Xing M, Clark D, Guan H, Ji M, Dackiw A, Carson KA, et al. BRAF mutation testing of thyroid fine-needle aspiration biopsy specimens for preoperative risk stratification in papillary thyroid cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:2977-82.
 49. Marchetti I, Lessi F, Mazzanti CM, Bertacca G, Elisei R, Coscio GD, et al. A morpho-molecular diagnosis of papillary thyroid carcinoma: BRAF V600E detection as an important tool in pre-operative evaluation of fine-needle aspirates. *Thyroid* 2009;19:837-42.
 50. Kim SK, Kim DL, Han HS, Kim WS, Kim SJ, Moon WJ, et al. Pyrosequencing analysis for detection of a BRAFV600E mutation in an FNAB specimen of thyroid nodules. *Diagn Mol Pathol* 2008;17:118-25.
 51. Hayashida N, Namba H, Kumagai A, Hayashi T, Ohtsuru A, Ito M, et al. A rapid and simple detection method for the BRAF (T1796A) mutation in fine-needle aspirated thyroid carcinoma cells. *Thyroid* 2004;14:910-5.
 52. Chung KW, Yang SK, Lee GK, Kim EY, Kwon S, Lee SH, et al. Detection of BRAFV600E mutation on fine needle aspiration specimens of thyroid nodule refines cyto-pathology diagnosis, especially in BRAF600E mutation-prevalent area. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006;65:660-6.

53. Chou CK, Chen RF, Chou FF, Chang HW, Chen YJ, Lee YF, et al. miR-146b is highly expressed in adult papillary thyroid carcinomas with high risk features including extrathyroidal invasion and the BRAF(V600E) mutation. *Thyroid* 2010;20:489-94.
54. Kwak JY, Kim EK, Kim JK, Han JH, Hong SW, Park TS, et al. Dual priming oligonucleotide-based multiplex PCR analysis for detection of BRAFV600E mutation in FNAB samples of thyroid nodules in BRAFV600E mutation-prevalent area. *Head Neck* 2010;32:490-8.
55. Kim SW, Lee JI, Kim JW, Ki CS, Oh YL, Choi YL, et al. BRAFV600E mutation analysis in fine-needle aspiration cytology specimens for evaluation of thyroid nodule: a large series in a BRAFV600E-prevalent population. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:3693-700.
56. Zhu Z, Ciampi R, Nikiforova MN, Gandhi M, Nikiforov YE. Prevalence of RET/PTC rearrangements in thyroid papillary carcinomas: effects of the detection methods and genetic heterogeneity. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3603-10.