

Aumento da Expressão do Proto-Oncogene ras no Bócio Multinodular: Possível Envolvimento na Patogênese

perspectivas

RESUMO

A transformação neoplásica resulta de uma série de alterações genéticas, envolvendo ativação de proto-oncogenes e inativação de genes supressores tumorais. Ativação do proto-oncogene *ras* por mutações em ponto é a alteração genética mais freqüente em tumores espontâneos da tireóide. Avaliamos a expressão do gene *ras* no bócio nodular. Fragmentos de tecido tireoidiano normal e neoplásico foram coletados durante o ato cirúrgico, sendo que 79 pacientes tiveram diagnóstico histopatológico de bócio colóide e foram incluídos no estudo. O RNA total foi extraído pelo método de Trizol e o cDNA sintetizado através do *Reverse Transcriptidase*. Os genes H-*ras* e K-*ras* foram amplificados através de PCR com *primers* específicos. Do total da amostra, 62% apresentaram aumento da expressão de um dos genes *ras* estudados. Evidenciou-se aumento da expressão do H-*ras* em 9 dos 29 (31%) casos e do K-*ras* em 12 dos 32 (37,5%) tumores estudados. Os resultados demonstraram aumento da expressão do *ras* na doença nodular da tireóide e sugerem um papel importante desses genes na transformação neoplásica da tireóide. (Arq Bras Endocrinol Metab 2003;47/6:721-727)

Descritores: Bócio multinodular; Proto-oncogene *ras*; Patogênese

ABSTRACT

Proto-Oncogene *ras* Expression in Multinodular Goiter.

Neoplastic transformation results from a series of genetic alterations involving activation of protooncogenes and inactivation of tumor suppressor genes. Activation of *ras* protooncogenes by point mutation is the most frequent genetic alteration in spontaneous thyroid neoplasias. The goal of this study was to evaluate *ras* gene expression in the nodular goiter. Seventy-nine patients submitted to thyroidectomy and with a histological diagnosis of nodular goiter were included in the study. Tissues were obtained from both tumor and normal thyroid during surgery and frozen in liquid N₂. Total RNA was isolated using TRIzol reagent and the cDNA was synthesized by reverse transcription. Twenty-one of the 34 (62%) nodules showed elevated expression of at least one of the *ras* genes studied. H-*ras* exhibited overexpression in 9 of 29 (31%) and K-*ras* in 12 of 32 (37.5%) tumor samples examined. Our results showed *ras* overexpression in nodular disease, with different pattern of expression between H and K-*ras* genes, suggesting that control of these proto-oncogenes expression might play an important role on neoplastic transformation in thyroid cells. (Arq Bras Endocrinol Metab 2003;47/6:721-727)

Keywords: Multinodular goiter; *ras* protooncogene; Pathogenesis

O BÓCIO MULTINODULAR (BMN) é definido como aumento da glândula tireóide devido à proliferação multifocal de tireócitos, resultando em estruturas foliculares heterogêneas. É uma patologia comum, clinicamente detectada em 2-6% dos indivíduos em regiões com dieta suficiente de iodo (1).

**Lenara Golbert
João Henrique Kolling
Aline H. Leitão
Mirele Posser
Rafael Lobato
Ana Luiza Maia**

*Serviço de Endocrinologia,
Hospital de Clínicas de
Porto Alegre, Universidade
Federal do Rio Grande do Sul,
Porto Alegre, RS.*

*Recebido em 13/05/03
Revisado em 30/09/03
Aceito em 01/10/03*

De acordo com o conceito atual, o BMN é considerado uma neoplasia benigna, com etiopatogênia no próprio tireócito. Em consequência, a característica do bócio multinodular é a heterogeneidade no crescimento e função das células foliculares. O nódulo bem delimitado, com estrutura claramente distinta do tecido circundante e definido como clonal através da análise genética, é, no presente, a melhor definição de neoplasia, benigna ou maligna (2). A maioria dos nódulos solitários de tireóide são neoplasias clonais, indicando que originam-se de uma única célula precursora (3). Nos BMN, os nódulos podem ser hiperplásicos ou verdadeiras neoplasias clonais, sendo que nódulos clonais e policlonais coexistem numa mesma glândula (4). Em concordância, a frequência do câncer de tireóide é semelhante em pacientes com bócio uni ou multinodular (5).

O crescimento das células tireoideanas é regulado pelo hormônio hipofisário TSH e por outros fatores de crescimento, como *epidermal growth factor* (EGF) e *insulin-like growth factor-I* (IGF-I), embora a seqüência de eventos ainda não seja inteiramente esclarecida (2,6). Desde a elucidação do receptor do TSH e dos seus mecanismos intracelulares via proteína G e cAMP/IP3, é consensual a participação do TSH no desenvolvimento do bócio. No entanto, o conceito de que o TSH teria um papel principal, se não exclusivo, na regulação do crescimento das células foliculares vêm sendo questionado (6). Estudos com cultura de células de BMN e nódulos autônomos têm demonstrado que a sinalização independente do TSH e dependente de IGF-I e/ou EGF pode ter uma grande importância na regulação do crescimento de tireócitos humanos (6). Outros fatores potencialmente envolvidos incluem diminuição da síntese de *growth inhibitory transforming growth factor* β (TGF β) e o aumento da proteína Ras (7,8). A proteína Ras, codificada pelos proto-oncogenes *ras*, é um transdutor do sinal extracelular, sendo uma importante via na transmissão da informação da membrana celular ao núcleo e compartilha características estruturais e funcionais com a proteína G da membrana celular (8). Alterações no proto-oncogene *ras* são igualmente prevalentes em tumores benignos e malignos da tireóide, sugerindo que possam ser uma lesão inicial no processo de transformação da célula tireoidiana (9,10). Experimentos *in vitro* mostram que o aumento da expressão da proteína Ras normal é suficiente para conferir um potencial de transformação em cultura de células (11,12).

A ativação do proto-oncogene *ras* por mutações em ponto é a alteração genética mais frequentemente encontrada em tumores espontâneos da tireóide (8).

No entanto, os dados sobre alterações na expressão do *ras* são escassos. A avaliação dos níveis de proteína Ras (p21) pela técnica de imunohistoquímica (13) demonstra níveis elevados da proteína Ras em carcinomas papilares e foliculares em 85% dos casos, bem como aumento da intensidade da coloração em 30% dos adenomas avaliados. Esse resultado sugere que, a exemplo das mutações em ponto, o aumento da expressão do *ras* possa ser implicado no desenvolvimento das neoplasias benignas e na transformação maligna da tireóide. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar a expressão do proto-oncogene *ras* no bócio nodular.

MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes

Foram avaliados os pacientes atendidos no ambulatório de Endocrinologia e Cirurgia Geral do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, entre o período de março de 1999 a fevereiro de 2001, encaminhados a tireoidectomia segundo indicação do médico assistente. A presença de bócio nodular foi definida pela palpção de pelo menos um nódulo na tireóide ou pela presença de nódulo(s) na ecografia de tireóide. Os pacientes que aceitaram fazer parte do estudo, mediante preenchimento de Termo de Consentimento Informado, foram submetidos a avaliação clínica com a pesquisadora responsável, que incluiu dados de história, exame físico, exames funcionais, de imagem e citológico (PAAF), de acordo com a indicação clínica de cada paciente. Para o presente estudo, foram incluídos os pacientes com diagnóstico histopatológico de bócio colóide nodular ou multinodular. Excluíram-se os casos de diagnóstico associado de bócio colóide a adenoma e/ou carcinoma de tireóide.

Tecido da tireóide de pacientes submetidos a tireoidectomia (parcial ou total) para tratamento de nódulos tireoidianos foram coletados durante o ato cirúrgico e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Foram coletados, com auxílio de médico patologista do HCPA, tecido de tireóide normal e neoplásico, do nódulo dominante, de cada paciente. As amostras foram mantidas a -70°C até serem analisadas.

Estudos *in vitro*

As concentrações do mRNA dos proto-oncogenes *H-ras* e *K-ras* foram avaliadas indiretamente, pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir de transcrição reversa (RT), RT-PCR. O RNA total de ambos os tecidos (normal e nódulo) foi extraído com o uso de Trizol (Trizol®, Gibco BRL, Gaithersburg

MD, USA), de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante. A síntese do cDNA foi feita a partir de 3µg de RNA total, utilizando-se oligonucleotídeos complementares à cauda de poli-A do mRNA. Todos os reagentes foram provenientes do *SuperScript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis* (Life Technologies, Gibco BRL, Gaithersburg MD, USA).

Os oligonucleotídeos (*primers*) utilizados para amplificação dos fragmentos de cDNA específicos para cada mRNA foram desenhados com base na seqüência de cada gene obtida no site do *Genebank* (www.ncbi.nlm.nih.gov). As seqüências específicas (*primers*) derivadas da região codificadora dos genes H e K-*ras* usadas neste estudo e as inscrições destas no *Genebank*, bem como da β₂ microglobulina, controlador interno utilizado, estão descritas na tabela 1, em conjunto com o número de ciclos e tamanho do produto amplificado. A reação em cadeia de polimerase (PCR) foi realizada com um volume final de 50µl, seguindo adaptação do protocolo sugerido pelo fabricante. Dois microlitros de cDNA foram inicialmente desnaturados a 94°C por 3 minutos na presença de tampão Tris-HCl 20mM pH 8,4, KCl 50mM e cloreto de magnésio 1,5mM. Em seguida era acrescentada solução contendo as mesmas concentrações de tampão e MgCl₂, 10mMol de *primers sense e antisense*, dNTPs 0,5mM, 0,25 unidades de TAQ DNA polimerase (recombinante, Gibco BRL). A temperatura de acoplamento foi de 62°C para os três genes analisados. Foram amplificados na mesma reação os genes da família *ras* (H ou K) e o controlador interno. Todos os experimentos foram realizados em duplicata, e em caso de discordância, foi realizado um terceiro experimento. O produto da PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídio e analisado pelo sistema radioanalítico de imagens Image Master VDS® (Pharmacia Biotech).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como a razão de unidades densitométricas (arbitrárias), tendo como numerador a expressão do gene em estudo (H e K-*ras*) e como denominador a expressão de β₂ microglobulina. O nível de mRNA de cada gene foi expresso como a relação da intensidade das bandas no tumor pelo tecido normal correspondente. Foi considerado como aumento da expressão, níveis maiores do que 1,5 vezes a expressão no tecido tumoral em comparação com o normal (14). Os resultados da expressão gênica, expressos em unidades arbitrárias, são sumarizados como média ± desvio padrão. A comparação entre nódulos com e sem aumento de expressão foi realizada pelo Teste t de Student para amostras independentes. A comparação da expressão dos genes de interesse entre o tecido normal e neoplásico foi feita pelo teste t de Student para amostras pareadas. A freqüência de casos com expressão aumentada foi descrita em porcentagens. O nível de significância aceito na análise dos resultados foi de 5%.

RESULTADOS

Pacientes

Durante o período do estudo, 112 pacientes foram avaliados e seu material coletado. Setenta e nove pacientes tiveram diagnóstico histopatológico de bócio nodular ou multinodular, tendo sido inicialmente incluídos no estudo. Foram excluídos 3 pacientes, 1 com diagnóstico associado de adenoma folicular e 2 com microcarcinoma papilar. Do total da amostra, 76 pacientes preencheram os critérios de inclusão e, destes, a expressão dos genes H e K-*ras* foi analisada em 34 casos, devendo ter sido alcançada significância estatística. As características gerais desses pacientes estão sumarizadas na tabela 2.

Tabela 1. Características dos primers sintetizados para reação de PCR.

Gene	Primers	Inscrição no Genebank	Produto (pb)	Nº de ciclos
H- <i>ras</i> sense Antisense	5' GACGGAATATAAGCTGGTGGTGG 3' 5' TGATCTGCTCCCTGAACTGGTGG 3'	AF375987	298	25
K- <i>ras</i> sense Antisense	5' ACTGAATATAAACITGTGGTAGITGG 3' 5' GCAAATCACATTTATTCCTACTAGG 3'	M34904	357	35
β ₂ MG sense Antisense	5' ATCCAGCGTACTCCAAGATTTCAG 3' 5' AAATTGAAAGTTAACTTATGCACGC 3'	NM004048	623	20

β₂MG = β₂microglobulina; pb = pares de bases.

Tabela 2. Características clínicas e laboratoriais dos 112 pacientes avaliados no estudo.

	Todos os pacientes	Participantes do estudo	Não participantes do estudo
Número de pacientes	112	34	45
Idade (anos)	49,4 ± 15,5	52,9 ± 12,8	51,7 ± 16,5
Sexo (M/F)	16/96	1/34	5/40
Duração da Doença (meses)	11,2 ± 14,2	25,4 ± 28,8	31,66 ± 36,0
Diagnóstico Histológico			
Bócio Nodular	79	34	45
Adenoma Folicular	8	0	1
Carcinoma de Tireóide	21	0	2
Tireoidite de Hashimoto	3	5	4
Indicação cirúrgica			
Suspeita de Neoplasia	56	12	28
Sintomas Compressivos	32	12	12
Hipertireoidismo	7	4	2
Outras	11	6	3
TSH (mUI/L)	1,5 ± 2,8	1,15 ± 1,2	1,1 ± 1,2

Os valores estão representados em média±DP ou valores absolutos.

Expressão dos Proto-Oncogenes H e K-*ras*

Os níveis de expressão diferenciada dos genes H e K-*ras* foram referidos como a proporção da expressão no nódulo em relação ao tecido normal. Baseado em estudo prévio (13), nós consideramos aumento da expressão níveis maiores de 1,5 vezes no tecido nodular em comparação ao tecido normal. Vinte e um dos 34 nódulos (62%) demonstraram aumento da expressão de pelo menos um dos genes estudados. Aumento da expressão do H-*ras* foi evidenciada em 9 dos 29 (31%) casos e do K-*ras* 12 de 32 (37,5%) tumores examinados. Apenas 3 nódulos apresentaram aumento concomitante de expressão dos genes H e K-*ras*. Treze casos (38%) não exibiram aumento de expressão dos genes avaliados (tabela 3 - figura 1). A média de expressão do H-*ras* foi de 2,44±1,34 e 1,025±0,25 unidades arbitrárias para os nódulos categorizados com e sem aumento de expressão, respectivamente (p= 0,01) e de 2,52±1,30 e 0,85±0,35 unidades arbitrárias para a expressão do K-*ras* (p= 0,0002). Interessante que, mesmo analisando os níveis de expressão do H-*ras* e K-*ras* em todos os nódulos, independente da categorização, foi observado aumento significativo no tecido nodular quando comparado ao tecido normal (p= 0,02 e p= 0,03, respectivamente) (figura 1).

DISCUSSÃO

O proto-oncogene *ras*, gene chave na regulação do crescimento e da diferenciação celular, parece ter um

importante e não bem definido papel na gênese das neoplasias da tireóide (15). No presente estudo, demonstramos aumento da expressão dos proto-oncogenes H e K-*ras* em nódulos dominantes de bócio nodular, neoplasias benignas da tireóide. Do total da amostra, 62% apresentaram aumento da expressão de um dos genes da família *ras* estudados. O padrão de expressão foi diverso, sendo que 9 nódulos demonstraram aumento da expressão do H-*ras* e 12 do K-*ras*. Apenas 3 pacientes dos 35 avaliados apresentaram aumento concomitante da expressão dos 2 genes.

O BMN é uma patologia comum, que é caracterizado pela heterogeneidade na função e crescimento das células foliculares (2). O bócio esporádico e o endêmico, definido quando a prevalência de bócio visível ou palpável é maior que 5% na população de escolares, são fundamentalmente a mesma patologia da glândula tireóide. Desse modo, a etiologia do BMN deve ser explicada no próprio tireócito, em analogia com a maioria das neoplasias. A análise de nossa amostra demonstra que as características de nossos pacientes com BMN não diferem dos dados de literatura, no que concerne a idade média de acometimento, a frequência maior no sexo feminino e níveis normais de TSH (1-3).

O mecanismo através do qual o aumento da expressão do *ras* pode levar à transformação neoplásica ainda não está bem estabelecido. Wynford-Thomas (16) demonstrou que, ao contrário do observado em cultura de célula de ratos e de acordo com evidências clínicas, a ativação do oncogene *ras*

Tabela 3. Expressão dos proto-oncogenes H e K-*ras* nos tecidos analisados.

	H- <i>ras</i>	K- <i>ras</i>	H e/ou K- <i>ras</i>
Casos analisados	29	32	34
Aumento da expressão no tecido tumoral	9	12	21
Porcentagem de nódulos com aumento da expressão	31%	37%	62%

Os valores estão expressos em números absolutos ou porcentagens.

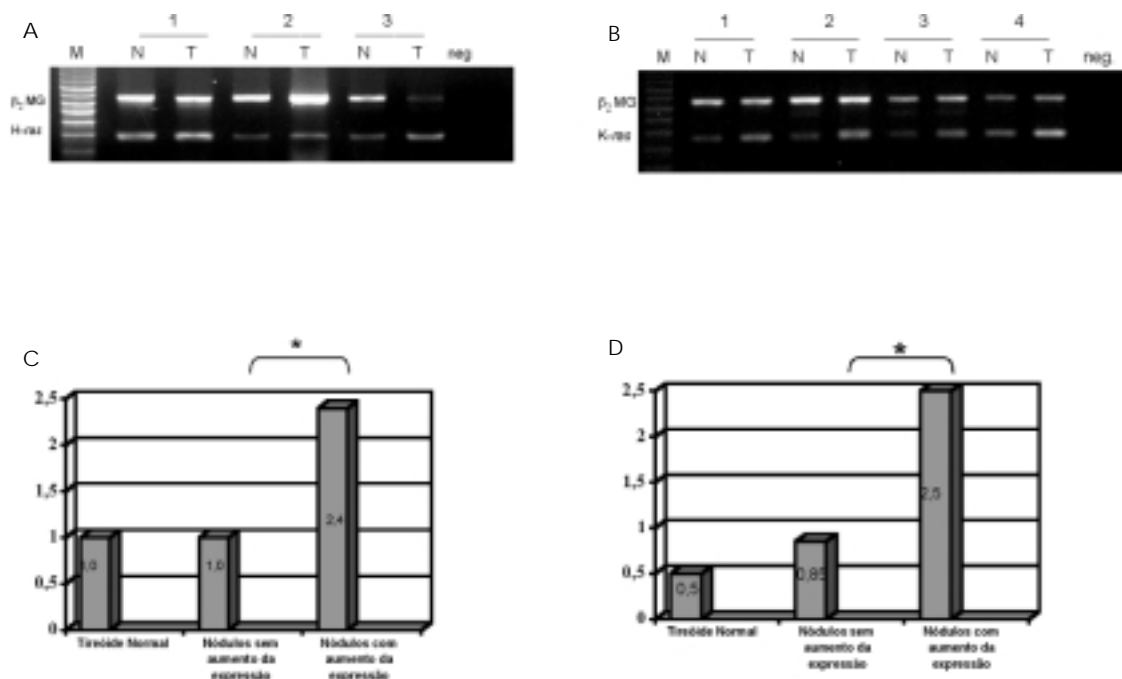


Figura 1. A: RT-PCR do proto-oncogene H-*ras*, analisado em gel de agarose nos casos 1,2 e 3 no tecido de tireóide normal (N) e tumoral (T). **B:** RT-PCR do proto-oncogene K-*ras*, analisado em gel de agarose nos casos 1,2, 3 e 4 no tecido de tireóide normal (N) e tumoral (T). A quantificação das bandas foi corrigida pela expressão da β_2 microglobulina (β_2 MG). M: marcador de 100pb; neg: controle negativo. **C:** Média de expressão do proto-oncogene H-*ras*, de acordo com o critério de categorização (+/-) da expressão gênica. * p= 0,01 (teste t de Student para amostras independentes). **D:** Média de expressão do proto-oncogene K-*ras*, de acordo com o critério de categorização (+/-) da expressão gênica. * p= 0,0002 (teste t de Student para amostras independentes).

* p= 0,0002 (teste t de Student para amostras independentes).

induz à proliferação sem perda da diferenciação em cultura de células de tireóide humana. A presença da proteína Ras estimulou a expressão da tireoglobulina na ausência do TSH em células foliculares humanas, embora não esteja claro qual a via de sinalização utilizada. O bócio multinodular apresenta um fenótipo correspondente ao obtido nos estudos *in vitro*, de aumento da proliferação sem perda da diferenciação, constituindo-se num modelo atraente para o estudo do papel das alterações do *ras* no processo neoplásico. De acordo, nosso estudo demonstrou aumento da expressão dos proto-oncogenes H e K-*ras* em tecido neoplásico de tireóide. Interessante que observa-

mos uma expressão diferenciada entre os genes H e K-*ras*, uma vez que apenas três pacientes dos 21 com aumento de expressão apresentaram elevação concomitante dos dois genes no tecido nodular. Aumento da expressão dos genes da família *ras* também tem sido relatada em câncer de mama (14), de cabeça e pescoço (17) e leucemia (18), sendo que a expressão do *ras* em câncer de mama (14) também evidenciou padrão diferenciado da expressão dos 3 genes da família *ras*. Os dados do aumento da expressão dos genes avaliados se correlacionaram com o aumento da proteína Ras em 30% das neoplasias benignas da tireóide detectadas por Papadimitriou (13), utilizan-

do a técnica de imuno-histoquímica. Porém padrão heterogêneo da coloração em nódulos benignos foi descrito em outro estudo (19).

Vários estudos buscam compreender quais as vias de transmissão do sinal Ras e indução da carcinogênese. A ativação da proteína quinase ativadora de mitose (MAPK) é necessária mas não suficiente para a proliferação celular induzida pela proteína Ras (20,21). Existe discordância quanto aos fatores estimulantes desta via de sinalização, com estudos apontando para uma estimulação via TSH e cAMP (22), enquanto outros não demonstram este achado (23). No que concerne à regulação transcricional, um estudo avaliando o desenvolvimento de tumores de endométrio e ovário demonstra que o aumento da expressão do *ras* se correlacionou com aumento de níveis nucleares da p53 mutada, já que o primeiro íntron do *H-ras* contém sítio de ligação ao p53, que age como ativador transcricional (24).

Concluindo, o conjunto dos nossos resultados sugere aumento da expressão do ras nos estágios iniciais de neoplasias da tireóide, que pode ser suficiente para conferir um potencial de transformação celular. Os padrões diferentes de expressão dos proto-oncogenes H e K-*ras* podem sugerir ações diferenciadas desses genes no bócio multinodular. Estudos adicionais, avaliando a correlação da expressão do *ras* com o grau de diferenciação celular, serão importantes na compreensão do papel desse proto-oncogene na patogênese das neoplasias da tireóide.

AGRADECIMENTOS

Ao Serviço de Cirurgia Geral do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, especialmente aos Drs. Alceu Migliavaca e José Ricardo Guimarães, e ao Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Suporte Financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE).

REFERÊNCIAS

1. Wang C, Crapo LM. The epidemiology of thyroid disease and implications for screening. *Endocrinol Metab Clin N Am* 1997;26:189-215.
2. Derwahl M, Studer H. Pathogenesis and treatment of multinodular goiter. In: Fagin JA, editor. *Thyroid cancer*. Norwell: Kluwer 1998.p.155-86.

3. Namba H, Matsuo K, Fagin JA. Clonal composition of benign and malignant human thyroid tumors. *J Clin Invest* 1990;86:120-5.
4. Kopp P, Kimura ET, Aeschimann S, Oestreicher M, Tobler A, Fey MF, et al. Polyclonal and monoclonal thyroid nodules coexist within human multinodular goiters. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:134-9.
5. Marqusee E, Benson CB, Frates MC, Doubilet PM, Larsen PR, Cibas ES, et al. Usefulness of ultrasonography in the management of nodular thyroid disease. *Ann Intern Med* 2000;133:696-700.
6. Derwahl M, Broecker M, Kraiem Z. Clinical review 101: thyrotropin may not be the dominant growth factor in benign and malignant thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:829-34.
7. Asmis LM, Kaempf J, von Grunigen C, Kimura ET, Wagner HE, Studer H. Acquired and naturally occurring resistance of thyroid follicular cells to the growth inhibitory action of transforming growth factor β 1 (TGF β 1). *J Endocrinol* 1996;149:485-96.
8. Suarez HG. Molecular basis of epithelial thyroid tumorigenesis. *CR Acad Sci* 2000;323:519-28.
9. Lemoine NR, Mayall ES, Wyllie FS, Williams ED, Goyns M, Stringer B, et al. High frequency of *ras* oncogene activation in all stages of human thyroid tumorigenesis. *Oncogene* 1989;4:159-64.
10. Namba H, Rubin SA, Fagin JA. Point mutations of *ras* oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis. *Mol Endocrinol* 1990;4:1474-9.
11. Spandidos DA, Wilkie NM. Malignant transformation of early passage rodent cells by a single mutated human oncogene. *Nature* 1984;310:469-75.
12. Zachos G, Spandidos DA. Expression of *ras* proto-oncogenes: regulation and implications in the development of human tumors. *Crit Rev Oncol Hematol* 1997;26:65-75.
13. Papadimitriou K, Yiagnisis M, Tolis G, Spandidos DA. Immunohistochemical analysis of the *ras* oncogene protein in human thyroid neoplasms. *Anticancer Res* 1988;8:1223-8.
14. Miyakis S, Sourvinos G, Spandidos DA. Differential expression and mutation of the *ras* family genes in human breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;251:609-12.
15. Adjei, AA. Blocking oncogenic *ras* signaling for cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1062-74.
16. Gire V, Wynford-Thomas D. RAS oncogene activation induces proliferation in normal human thyroid epithelial cells without loss of differentiation. *Oncogene* 2000;19:737-44.
17. Kiaris H, Spandidos DA, Jones AS, Vaughan ED, Field JK. Mutations, expression and genomic instability of the *H-ras* proto-oncogene in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Br J Cancer* 1995;72:123-8.
18. Gougopoulou DM, Kiaris H, Ergazaki M, Anagnostopoulos NI, Grigoraki V, Spandidos DA. Mutations and expression of the *ras* family genes in leukemias. *Stem Cells* 1996;14:725-9.
19. Aeschimann S, Kopp PA, Kimura ET, Zbaeren J, Tobler A, Fey MF, et al. Morphological and functional polymor-

-
- phism within clonal thyroid nodules. **J Clin Endocrinol Metab** 1993;77:846-51.
20. Gire V, Marshall CJ, Wynford-Thomas D. Activation of mitogen-activated protein kinase is necessary but not sufficient for proliferation of human thyroid epithelial cells induced by mutant *ras*. **Oncogene** 1999;18:4819-32.
21. Saavedra HI, Knauf JA, Shirokawa JM, Wang J, Ouyang B, Elisei R, et al. The *ras* oncogene induces genomic instability in thyroid PCCL3 cells via the MAPK pathway. **Oncogene** 2000;19:3948-54.
22. Tsygankova OM, Kupperman E, Wen W, Meinkoth JL. Cyclic AMP activates *ras*. **Oncogene** 2000;19:3609-15.
23. Van Keymeulen A, Roger PP, Dumont JE, Dremier S. TSH and cAMP do not signal mitogenesis through *ras* activation. **Biochem Biophys Res Commun** 2000;273:154-8.
24. Zachos G, Spandidos DA. Transcriptional regulation of the c-H-*ras*1 gene by the P53 protein is implicated in the development of human endometrial and ovarian tumours. **Oncogene** 1998;16:3013-7.

Endereço para correspondência:

Ana Luiza Maia
Serviço de Endocrinologia -
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos, 2350
90035-003 Porto Alegre, RS
Fax: (051) 332-5188
e.mail: almaia@vortex.ufrgs.br