

O PROTO-ONCOGENE RAS NO BÓCIO MULTINODULAR

THE PROTO-ONCOGENE RAS IN MULTINODULAR GOITER

Lenara Golbert*, João Henrique Godinho Kolling*, Aline Hatzemberger Leitão*, Mirelle Posser,*
Rafael Lobato*, Ana Luiza Maia*

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. Mutações no *ras* são prevalentes em neoplasias benignas e malignas da tireóide, sugerindo que possam ser um evento inicial no processo de transformação da célula tireoidiana. O bócio multinodular é considerado uma neoplasia benigna e um interessante modelo para o estudo das alterações nesse proto-oncogene na tumorigênese da tireóide. De acordo, observamos aumento da expressão dos proto-oncogenes *H-ras* e *K-ras* no tecido nodular de bócio em comparação com o tecido normal. A revisão da literatura e os nossos resultados sugerem que o controle da expressão do *ras* tenha um importante papel nas etapas iniciais da transformação neoplásica da glândula tireóide.

Unitermos: Bócio Multinodular, Proto-oncogene *ras*, patogênese

ABSTRACT

Neoplastic transformation results from a series of genetic alterations involving activation of protooncogenes and inactivation of tumor suppressor genes. Activation of *ras* proto-oncogenes by point mutation is the most frequent genetic alteration in spontaneous thyroid tumors. Since these lesions are prevalent in benign and malignant thyroid neoplasm, it has been suggested that they may be an early event in the process of cell transformation. Multinodular goiter and, in particular, goiter nodules, have been considered a true thyroid neoplasm and an interesting model to evaluate the *ras* proto-oncogene alterations in the pathogenesis of thyroid neoplasia. In accordance, we have demonstrated higher expression of *H-ras* and *K-ras* proto-oncogene in nodular tissue, suggesting that control of their expression might play a important role on neoplastic transformation in thyroid cells.

Key-words: Prot-oncogene, Goiter Multinodular.

* Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. Correspondência: Ana Luiza Maia, Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, 90035-003 - Porto Alegre, RS, Brasil - Fone: 55-51-316-8127; Fax: 55-51-332-5188; E-mail: almaia@vortex.ufrgs.br

O bócio multinodular (BMN) é definido como aumento da glândula tireóide devido a proliferação multifocal de tireócitos, resultando em estruturas foliculares heterogêneas. É uma patologia comum, clinicamente detectado em 2-6% dos indivíduos em regiões com dieta suficiente de iodo, com aumento da prevalência em áreas com deficiência de iodo (1).

De acordo com o conceito atual, o BMN é considerado uma neoplasia benigna, sendo assim, têm sua

etiopatogênica no próprio tireócito. Em consequência, a característica do bócio multinodular é a heterogeneidade no crescimento e função das células foliculares, o que pode resultar em crescimento e produção hormonal autônomos de nódulos tireoidianos. 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). Já os nódulos dos bócios multinodulares podem ser hiperplásicos ou verdadeiras neoplasias clonais (2,3,4), Kopp et al. (4) demonstraram que nódulos clonais e policlonais coexistem num mesmo bócio multinodular. 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 mecanismos intracelulares através da proteína G e das vias de cAMP/IP3 e da ligação entre a cascata do cAMP e o sistema efetor intracelular da família do receptor IGF, têm sido consenso a importante 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 revisado(2). Vários estudos têm apontado mecanismos dependentes e independentes do TSH e acredita-se, atualmente, que esse hormônio pode ser um elo de ligação na complexa rede de transmissão de sinais que modula e controla o crescimento e diferenciação da célula tireoidiana (2,6). O TSH não está apenas envolvido no controle de funções diferenciadas, incluindo a expressão de genes específicos da tireóide, mas também na regulação da expressão dos fatores de crescimento e de seus receptores (2,6). Estudos com cultura de células de bócio multinodular 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). Outro fator possivelmente envolvido inclui diminuição da síntese de growth inhibitory transforming growth factor b (TGFB), que antagoniza os efeitos do TSH, IGF-I e EGF em tireócitos de ratos (7).

O desenvolvimento de tumores resulta de uma série de alterações genéticas que afetam o mecanismo normal do controle de crescimento. Entre os eventos moleculares identificados incluem-se deleções de regiões cromossômicas contendo genes supressores do crescimento celular, como o gene TP53, cujo o produto, a proteína p53, tem papel fundamental no reparo do DNA danificado (8,9), e alterações na estrutura de proto-oncogenes celulares (10). Proto-oncogenes são genes celulares normais, responsáveis pelo controle do crescimento e do ciclo celular e quando ativados originam os oncogenes. Os oncogenes codificam proteínas, as oncoproteínas, que promovem o crescimento da célula em detrimento do processo de diferenciação. Os proto-oncogenes codificam proteínas envolvidas na cascata de transmissão do sinal para crescimento celular e

podem sofrer ativação e originar um ou mais oncogenes (11,12).

Fatores ambientais também parecem ter importante papel na patogênese tumoral, a exemplo do aumento da prevalência das neoplasias da tireóide após o acidente de Chernobyl e dos carcinomas foliculares em áreas de deficiência de iodo (10,13,14). Desta forma, evidencia-se que a carcinogênese é um processo complexo, constituído por uma série de eventos induzidos por fatores genéticos e ambientais que alteram o controle do crescimento celular, provavelmente por mutações sucessivas de genes cujos produtos conferem uma vantagem no crescimento de células afetadas.

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 (15). Estas proteínas apresentam-se em dois estados: inativo ou repouso, ligada a GDP (difosfato de guanosina) e ativo, ligada a GTP (trifosfato de guanosina). A inativação ocorre através da hidrólise do GTP, pela atividade GTPase intrínseca da proteína *ras*, após a transmissão do sinal. Tanto a ativação quanto a inativação da proteína Ras são controladas por proteínas reguladoras, GAP (proteína ativadora da GTPase), GEF (fator deslocador de guanina) e GDI (inibidor da dissociação de guanina) (10,16,17). (Figura 1).

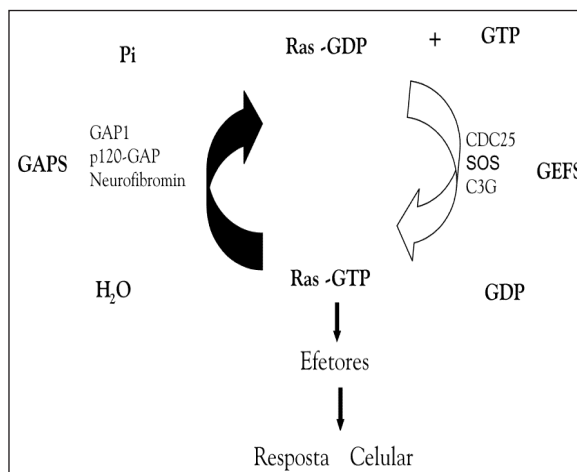


Figura 1

A forma mais conhecida da ativação mutacional do proto-oncogene *ras* em humanos é através da substituição simples de bases afetando tanto o domínio da ligação GTP (códon 12 e 13), quanto o domínio GTPase (códon 61) da proteína (11,18,19,20,21). A proteína Ras mutada perde a habilidade de se tornar inativa e a responsividade aos estímulos inibitórios das proteínas reguladoras,

consequentemente, o crescimento celular ocorre de maneira autônoma ou constitutiva (18,19,21). Mutações no códon 61, associadas com redução na atividade GTPase, são as mais eficientes em alterar a conformação da proteína Ras (11). Entretanto, estas mutações não são, isoladamente, suficientes para a transformação maligna. Mutações no proto-oncogene *ras* são encontradas em mais de 30% dos tumores humanos (18). Três genes da famílias *ras* já foram identificados, *H-ras*, *K-ras* e *N-ras* (Tabela 1). Esses três genes codificam proteínas altamente similares, com 21 kD (p21), e atividade ligadora do nucleotídeo guanina (16,18,19,20).

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 (21,22,23,24). A ativação do proto-oncogene *ras* por mutações em ponto é a alteração genética mais freqüentemente encontrada em tumores espontâneos da tireóide (aproximadamente 30%) (19), não sendo, entretanto, um evento primário na carcinogênese induzida pela radiação (14,25,26). Essas mutações parecem ser distribuídas entre os três genes da famílias *ras* similarmente, em contraste com tumores em outros órgãos (19,20) (Tabela 1).

Tabela 1. Mutações no Proto-oncogene *ras* em Tumores Humanos

Tumor	Freqüência da mutação (%)	Isoformas predominante
Adenocarcinoma de Pulmão	33%	K- <i>ras</i>
Câncer Colorretal	44%	K- <i>ras</i>
Câncer de Pâncreas	90%	K- <i>ras</i>
Câncer de Tireóide		
Folicular	53%	H, K, N- <i>ras</i>
Papilar	0	
Papilar pouco diferenciado	60%	H, K, N- <i>ras</i>
Seminoma	43%	K e N- <i>ras</i>
Melanoma	13%	N- <i>ras</i>
Câncer de Bexiga	10%	H- <i>ras</i>
Câncer Renal	10%	H- <i>ras</i>
Câncer de Fígado	30%	N- <i>ras</i>
Síndrome Mielodisplásica	40%	K e N- <i>ras</i>
Leucemia Mielógena Aguda	30%	N- <i>ras</i>

Adaptado da referência 17.

Embora as mutações em ponto representem um mecanismo importante de ativação do *ras*, elas não são as únicas alterações desses genes implicadas na carcinogênese. Alterações na expressão do proto-oncogene *ras* têm sido demonstradas em diferentes neoplasias humanas (27,28). 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 (29). O

aumento da expressão do gene *ras* foi examinado, em estudos de câncer de mama (28), leucemia (30) e câncer de cabeça e pescoço (31), pela comparação dos níveis de RNA mensageiro (mRNA) nos tecidos tumorais com seus respectivos tecidos normais, através de técnicas quantitativas.

Em relação às neoplasias da tireóide, os dados sobre alterações na expressão do *ras* são escassos. A avaliação dos níveis de proteína Ras (p21) pela técnica de imunohistoquímica (32), 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 sua transformação a carcinomas de tireóide. Com o objetivo de avaliarmos essa hipótese, estudamos a expressão do *ras* em 79 pacientes com diagnóstico histopatológico de bócio colóide (33). Demonstramos aumento significativo na expressão dos proto-oncogenes *H-ras* e *K-ras* no tecido neoplásico em comparação com o normal. A percentagem de tumores com aumento da expressão dos proto-oncogenes analisados, foi de 31% dos casos na análise do *H-ras* e 37% no *K-ras*. No conjunto, 62% da amostra apresentou aumento da expressão do *H* e/ou *K-ras*, sendo que apenas 3 pacientes tiveram aumento concomitante dos dois genes em seu tecido nodular (Tabela 2). Na correlação entre o aumento da expressão dos proto-oncogenes e as variáveis clínicas, foi observado uma maior velocidade de crescimento do nódulo dominante, conforme referido pelo paciente, em meses, nos casos com aumento da expressão do *H-ras* (33).

Tabela 2. 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 percentagens.

O mecanismo através do qual o aumento da expressão do *ras* pode levar à transformação neoplásica ainda não está bem estabelecido. Wynford-Thomas (34) demonstrou que, ao contrário do observado em cultura de célula de ratos, e de acordo com evidências clínicas, a

ativação do oncogene *ras* induz a 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, mas não de ratos, embora não esteja claro qual a via de sinalização utilizada. Da mesma forma, vários estudos buscam compreender quais as vias de transmissão do sinal Ras e como esse induz a carcinogênese. Neste sentido, foi evidenciado que a ativação da proteína quinase ativadora de mitose (MAPK) é necessária mas não suficiente para a proliferação celular induzida pela proteína Ras (35,36). Existe discordância quanto aos fatores estimulantes desta via de sinalização, enquanto alguns estudos afirmam que essa não é estimulada pelo TSH e cAMP (34,37), outros demonstram que o cAMP ativa a proteína Ras (38). Outro interessante estudo evidencia que a proteína Ras modula a apoptose, sendo que esta diminui com a exposição crônica ao Ras e aumenta com a exposição aguda, porém, somente na presença do TSH (39).

Um dos mecanismos propostos para a ação do *ras* na carcinogênese da tireóide envolve a indução à resistência a TGF β , pela diminuição dos receptores de TGF β . A transfecção de vetor de expressão do receptor TGF β reverte parcialmente o fenótipo maligno de cultura de células transformadas pelo *k-ras*, podendo constituir-se em alvo para terapias (40,41). No que concerne a regulação transcricional, 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 (42).

Aumento da expressão dos genes da família *ras* têm sido relatado em câncer de mama (28), de cabeça e pescoço (31) e leucemia (30). Esses dados estão de acordo com os resultados do nosso estudo (33), onde encontramos aumento da expressão dos proto-oncogenes H e *K-ras* em tecido neoplásico de tireóide quando comparado ao tecido normal. Esse resultado chama a atenção para o fato do bócio nodular apresentar um fenótipo correspondente ao obtido nos estudos *in vitro* (34), de aumento da proliferação sem perda da diferenciação, constituindo-se, talvez, num modelo atraente para o estudo do papel das alterações do *ras* no processo neoplásico. Foi encontrada uma expressão diferenciada entre os genes H e *K-ras*, uma vez que apenas dois pacientes dos 21 com aumento de expressão apresentaram elevação concomitante dos dois genes no tecido nodular. Similarmente, a avaliação da expressão gênica do *ras* em câncer de mama (28) 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 (32), utilizando a técnica de imunohistoquímica. Porém padrão heterogêneo da coloração em nódulos benignos foi descrito em outro estudo (43).

Concluindo, a revisão da literatura e os nossos resultados sugerem 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.

REFERÊNCIAS

1. Wang C, Crapo LM. The epidemiology of thyroid disease and implications for screening. *Endo Metab Clin N Am* 1997; 26:189-215.
2. Derwahl M, Studer H. Pathogenesis and treatment of multinodular goiter. In: Fagin JA. *Thyroid cancer*. Norwell: Kluwer: 155-86,1998.
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, Aeschmann 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. Kimura ET, Kopp P, Zbaeren J, Asmis LM, Ruchti C, Maciel RM, et al. Expression of transforming growth factor beta1, beta2, and beta3 in multinodular goiters and differentiated thyroid carcinomas: a comparative study. *Thyroid* 1999;9:119-25.
8. Kastan MB, Zhan Q, el-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, et al. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 1992;71:587-97.
9. Fields S, Jang SK. Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science* 1990;249:1046-9.
10. Fagin JA. Molecular pathogenesis of human thyroid neoplasms. *Thyroid Today* 1994;17:1-7.
11. Farid NR, Shi Y, Zou M. Molecular basis of thyroid cancer. *Endocr Rev* 1994;15:202-32.
12. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Baltimore D, Zipursky SL, Darnell J. *Cancer*. In: *Molecular cell biology*. 3rd ed. New York: Scientific American Books; 1995. p. 1247-94.

13. Belfiore A, La Rosa GL, La Porta GA, Giuffrida D, Milazzo G, Lupo L, et al. Cancer risk in patients with cold thyroid nodules: relevance of iodine intake, sex, age, and multinodularity. *Am J Med* 1992;93:363-9.
14. Nikiforov YE, Fagin JA. Radiation-induced thyroid cancer in children after the Chernobyl accident. *Thyroid Today* 1998;21:1-11.
15. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Baltimore D, Zipursky SL, Darnell J. Cell-to-cell signaling: hormones and receptors. In: *Molecular Cell Biology*. 3rd ed. New York: Scientific American Books; 1995. p. 853-924.
16. Lewin B. Oncogenes and cancer. In: *Genes VII*. New York: Oxford University Press; 2000. p. 875-912.
17. Adjei AA. Blocking Oncogenic Ras Signaling for Cancer Therapy. *Journal National Cancer Institute* 2001; 93:1062.
18. Bos JL. *ras* oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989;49:4682-9.
19. Suarez HG. Genetic alterations in human epithelial thyroid tumours. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998; 48:531-46.
20. Suarez HG. Molecular basis of epithelial thyroid tumorigenesis. *CR Acad Sci* 2000;323:519-28.
21. Fagin JA. Genetic basis of endocrine disease 3: Molecular defects in thyroid gland neoplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:1398-400.
22. 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.
23. 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;5:565-70.
24. Namba H, Rubin SA, Fagin JA. Point mutations of *ras* oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis. *Mol Endocrinol* 1990;4:1474-9.
25. Nikiforov YE, Nikiforova MN, Gnepp DR, Fagin JA. Prevalence of mutations of *ras* and *p53* in benign and malignant thyroid tumors from children exposed to radiation after the Chernobyl nuclear accident. *Oncogene* 1996;13:687-93.
26. Suchy B, Waldmann V, Klugbauer S, Rabes HM. Absence of *RAS* and *p53* mutations in thyroid carcinomas of children after Chernobyl in contrast to adult thyroid tumours. *Br J Cancer* 1998;77:952-5.
27. 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.
28. 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.
29. Spandidos DA, Wilkie NM. Malignant transformation of early passage rodent cells by a single mutated human oncogene. *Nature* 1984;310:469-75.
30. 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.
31. 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*, 72:123-8, 1995
32. 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.
33. Golbert L, Leitão AH, Kolling JH, Kimura ET, Martins L, Maia AL. The protooncogenes *H* and *K-ras* are overexpressed in human multinodular goiter. *In press*.
34. 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.
35. 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.
36. Saavedra HI, Knauf JA, Shirokawa JM, Wang J, Ouyang B, Elisei R, Stambrook PJ, Fagin JA. The *RAS* oncogene induces genomic instability in thyroid PCCL3 cells via the *MAPK* pathway. *Oncogene* 2000;19:3948-54.
37. 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.
38. Tsygankova OM, Kupperman E, Wen W, Meinkoth JL. Cyclic AMP activates *ras*. *Oncogene* 2000; 19:3609-15.
39. Shirokawa JM, Elisei R, Knauf JA, Hara T, Wang J, Saavedra HI, Fagin JA. Conditional apoptosis induced by oncogenic *ras* in thyroid cells. *Mol Endocrinol* 2000;14:1725-38.
40. Coppa A, Mincione G, Lazzereschi D, Ranieri A, Turco A, Lucignano B, Scarpa S, Ragano-Caracciolo M, Colletta G. Restored expression of transforming growth factor beta type II receptor in *k-ras*-transformed thyroid cells, TGF beta-resistant, reverts their malignant phenotype. *J Cell Physiol* 1997;172:200-8.
41. Turco A, Coppa A, Aloe S, Baccheschi G, Morrone S, Zupi G, Colletta G. Overexpression of transforming growth factor beta-type II receptor reduces tumorigenicity and metastatic potential of *K-ras*-transformed thyroid cells. *Int J Cancer* 1999;80:85-91.
42. Zachos G, Spandidos DA. Transcriptional regulation of the *c-H-ras1* gene by the *P53* protein is implicated in the development of human endometrial and ovarian tumours. *Oncogene* 1998;16:3013-7.
43. Aeschmann S, Kopp PA, Kimura ET, Zbaeren J, Tobler A, Fey MF, et al. Morphological and functional polymorphism within clonal thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:846-51.