

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
ENDOCRINOLOGIA

**Implicações do Aumento da Expressão do Proto-Oncogene *Ras* no Bócio
Multinodular**

LENARA GOLBERT

Orientadora: Profa. Dra. Ana Luiza Maia

Porto Alegre, janeiro de 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
ENDOCRINOLOGIA**

Mestrado e Doutorado

**Implicações do Aumento da Expressão do Proto-Oncogene *Ras* no Bócio
Multinodular**

LENARA GOLBERT

Orientadora: Profa. Dra. Ana Luiza Maia

Dissertação apresentada ao PPG em
Ciências Médicas: Endocrinologia,
para obtenção do título de doutor

Porto Alegre, janeiro de 2006

AGRADECIMENTOS

De forma especial, agradeço a orientação constante da Profa. Dra. Ana Luiza Maia, cuja dedicação tem sido um exemplo na minha formação profissional. Agradeço aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Endocrinologia pelo convívio agradável e enriquecedor. Sou grata ao Prof Dr Jorge Luiz Gross pela compreensão e apoio dispensados para finalização deste trabalho.

Agradeço ao meu esposo e companheiro Anderson pelo amor e estímulo e aos meus pais por todo o incentivo, apoio e carinho.

Esta Tese de Doutorado segue o formato proposto pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, Metabolismo e Nutrição, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo apresentada na forma de 2 manuscritos sobre o tema da Dissertação:

Artigo de revisão geral do tema, que deverá ser submetido para publicação em jornal científico nacional;

Artigo original referente ao trabalho de pesquisa propriamente dito, submetido para publicação em jornal científico de circulação internacional.

Capítulo I

Aspectos Patogênicos do Bócio Multinodular.

Aspectos Patogênicos do Bócio Multinodular.

Pathogenesis of Multinodular Goiter.

Lenara Golbert e Ana Luiza Maia.

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

Correspondência: Ana Luiza Maia
Serviço de Endocrinologia
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos 2350, prédio 12, 4º andar
90035 –003 Porto Alegre, RS, Brasil
Fone/Fax: (51) 2101-8127
E-mail: almaia@ufrgs.br

Resumo

O bócio multinodular (BMN) é definido como aumento da glândula tireóide devido a proliferação de tireócitos e caracteriza-se pela heterogeneidade no crescimento e função das células foliculares. É uma patologia comum, com aumento da prevalência em áreas com deficiência de iodo, sendo este o principal fator etiológico do BMN. O BMN é considerado uma neoplasia benigna da tireóide. A patogênese desta disfunção ainda não foi inteiramente elucidada. Nesta revisão serão abordados os mecanismos envolvidos na patogênese e os principais aspectos etiológicos e clínicos do BMN.

Descritores: Bócio Multinodular, patogênese, molecular, proto-oncogene *RAS*.

Abstract

Multinodular goiter (MNG) is an enlargement of the thyroid gland and is characterized by heterogeneity in growth and function of thyroid follicular cells. It is a common pathology, with higher prevalence in iodine deficiency areas. Iodine deficiency is the main etiologic factor for MNG. MNG have been considered a true thyroid neoplasm. The pathogenesis of multinodular goiter is not yet clarified. The purpose of this review is to summarize the current knowledge of MNG with respect to the pathology, etiologic and clinical characteristics.

Keywords: Multinodular goiter, pathogenesis, molecular, protooncogene *RAS*.

O bócio multinodular (BMN) é definido como aumento da glândula tireóide secundário a proliferação multifocal de tireócitos, resultando em estruturas foliculares heterogêneas . Os termos bócio adenomatoso, bócio nodular atóxico e bócio colóide nodular são usados indistintamente para descrever o BMN. 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 . A incidência do BMN, segundo a Organização Mundial de Saúde é dependente do sexo (relação mulher: homem é 5:1) e da ingestão de iodo da região, sendo que o bócio é considerado endêmico quando a sua prevalência é maior que 5% na população de escolares . Quando ocorre em uma percentagem menor de indivíduos do que as descritas em áreas endêmicas, o bócio é denominado esporádico, embora as características morfológicas ou funcionais sejam indistintas daquelas do bócio endêmico . Assim, o bócio esporádico e endêmico são fundamentalmente a mesma patologia da glândula tireóide .

Histologicamente, os nódulos benignos dos BMN podem ser categorizados como lesões encapsuladas (adenomas) ou lesões sem cápsula (nódulos adenomatosos) e por critérios morfológicos de acordo com a OMS. Em termos funcionais, os nódulos são classificados como frios, normais ou quentes, dependendo da capacidade de captar iodo, detectada através da cintilografia de tireóide. Aproximadamente, 85% de todos os nódulos são “frios”, 10% tem captação normal e 5% são “quentes”, apesar desta prevalência poder variar geograficamente dependendo do suprimento de iodo da região .

A seguir abordaremos os principais aspectos patogênicos, etiológicos e clínicos do BMN, com ênfase nos avanços dos aspectos moleculares.

FATORES ETIOLÓGICOS

Os fatores etiológicos podem ser subdivididos em fatores primários e secundários. Os fatores primários referem-se a características das células foliculares propriamente ditas, que podem originar a formação de nódulos e serão discutidos no decorrer deste artigo, especialmente quando expostas aos fatores secundários. Entre os fatores secundários destaca-se o efeito de níveis elevados de TSH (deficiência de iodo/ substâncias bocigênicas e defeitos na hormonogênese) e de outros fatores de crescimento (fator de crescimento semelhante a insulina-IGF, fator de crescimento epidérmico-EGF, fator transformador de crescimento - TGF).

Deficiência de iodo e outros fatores ambientais etiológicos envolvidos no desenvolvimento do bócio.

A deficiência de iodo é o fator de risco isolado mais estudado para a doença nodular da tireóide, sendo a prevalência do bócio, bem como da doença nodular, inversamente proporcional a ingestão de iodo da população . Vários estudos demonstram uma associação inversa entre a excreção urinária de iodo, melhor indicador da ingestão de iodo, e o volume da tireóide . Tal achado que era, até alguns anos, avaliado pela palpação clínica, é hoje documentado pela ecografia da tireóide . Baseado no exame ecográfico, a prevalência de 30-40% em mulheres e 20-30% em homens tem sido relatada em áreas com deficiência de iodo . Um estudo que avaliou a prevalência de bócio e outras anormalidades tireoidianas à ecografia demonstrou que mesmo alterações discretas no suprimento de iodo podem refletir em diferentes freqüências de anormalidades morfológicas da tireóide .

A deficiência crônica de iodo acarreta aumento da secreção endógena de TSH e, conseqüentemente, estimula a função e o crescimento em todas as células foliculares. Devido a heterogeneidade intrínseca própria das células foliculares, a resposta ao estímulo é amplamente variável, ocorrendo a formação de nódulos a partir dos tireócitos com elevado potencial para o crescimento. É interessante ressaltar que alguns autores sugerem que o potencial de crescimento destes

tireócitos seria apenas amplificado pela deficiência de iodo, mas não uma consequência direta da mesma .

No Brasil, os dados sobre a ingestão do iodo são ainda controversos. Estudos recentes sobre a excreção urinária de iodo no Brasil indicam uma ingestão média suficiente, segundo recomendações do International Council for Control of Iodine Deficiency Disorders, e confirmam os dados referentes a iodação do sal no Brasil . O projeto Thyromobil avaliou crianças de 6 a 14 anos em 21 vilas de 8 estados brasileiros, iniciando a viagem em Belém (Pará) e indo na direção sul até o Rio de Janeiro . A prevalência de bócio encontrada foi baixa (1,4%) e a excreção urinária de iodo demonstrou que a população apresenta uma ingestão suficiente de iodo. Outro estudo avaliou estes dados na cidade de Passo Fundo, RS, que apresentava elevada prevalência de bócio (30%) na década de 60 . Os resultados demonstraram uma prevalência ainda elevada de bócio nos escolares (10,9%), porém com uma ingestão suficiente de iodo . Estes achados sugerem que o Brasil encontra-se na chamada zona de transição, pois apesar de apresentar níveis adequados da excreção urinária de iodo, a prevalência de bócio na população de escolares é ainda elevada em determinadas regiões.

No sentido oposto, um estudo recente teve como foco os efeitos adversos da exposição crônica a ingestão elevada de iodo em crianças . Os autores demonstraram que a ingestão de doses aproximadamente duas vezes a recomendada, evidenciada pela excreção urinária de iodo de 300-500 $\mu\text{g/L}$, não foram associadas a alterações do volume tireoidiano. No entanto, concentrações maiores que 500 $\mu\text{g/L}$ foram associadas com aumento do volume da tireóide, indicando um possível efeito adverso da exposição crônica ao excesso de iodo.

Além da ingestão de iodo, outros fatores ambientais como o fumo , exposição a radiação e ingestão de certas plantas contendo substâncias bocigênicas e drogas como o carbonato de lítio têm sido propostos como fatores de risco para o desenvolvimento de bócio difuso e BMN.

Fatores genéticos

A persistência do BMN em áreas sem deficiência de iodo, pode sugerir também uma base genética para a doença. Vários autores têm relatado famílias com bócio numa tentativa de investigar a transmissão desta patologia. Os estudos demonstram ser uma doença geneticamente heterogênea, uma vez que padrões de suscetibilidade autossômica dominante e ligados ao X são descritos . A caracterização molecular de muitas formas de bócio revelou a presença de mutações em vários genes envolvidos no processo de hormonogênese. Em particular, mutações foram detectadas nos genes da tireoperoxidase, tireoglobulina, NIS (cotransportador de sódio e iodeto), receptor da tireotrofina e pendrina . Mutações somáticas no receptor do TSH são descritas freqüentemente em nódulos hiperfuncionantes de tireóide, tanto em nódulos únicos como em nódulos autônomos de BMN. Tal mutação acarreta em ativação constitutiva do receptor com conseqüente vantagem funcional e de crescimento nas células afetadas . A maioria das mutações se localizam no domínio transmembrana do receptor do TSH e a prevalência das mutações ativadoras nos adenomas tóxicos varia consideravelmente em diferentes estudos (10% a 80%) . Esta diferença deve-se provavelmente a variação a exposição ao iodo nas diversas regiões estudadas, uma vez que pacientes de áreas com deficiência de iodo apresentam freqüência mais elevada de mutações no receptor do TSH . Os mecanismos pelos quais a baixa ingestão de iodo pode contribuir para tais mutações ainda não são conhecidos . Mutações somáticas ativadoras também foram descritas, em menor freqüência, no gene do $Gs\alpha$ em adenomas tóxicos .

A importância dos fatores genéticos é evidenciada pela maior ocorrência de bócio em algumas famílias e pela maior taxa de concordância de bócio em gêmeos monozigóticos do que em dizigóticos . Também é interessante a observação de que filhos de pais com bócio apresentam uma prevalência significativamente maior de bócio quando comparados com crianças de pais sem essa patologia .

Recentemente, o estudo de 2 famílias, uma canadense e outra alemã, que apresentavam BMN em vários membros com uma maior proporção de acometimento em indivíduos do sexo masculino do que o esperado, identificou um locus denominado MNG1 no braço longo do cromossoma 14 associado com a transmissão da patologia . Um outro estudo mapeou uma região associada a uma forma dominante de BMN no braço curto do cromossoma X (Xp22) . Estes loci candidatos foram avaliados em outras 4 famílias alemãs e 1 família da Eslováquia, entretanto, somente 1 família alemã confirmou a análise de ligação ao locus MNG1 . Estes resultados não permitem a confirmação ou exclusão do MNG1 ou Xp22 como loci candidatos e sugerem a heterogeneidade genética na etiologia do BMN. Como nenhuma região candidata reprodutível foi identificada em famílias com BMN, Bayer et al realizaram um estudo de 450 microsatélites distribuídos por todo genoma (genoma wide linkage analysis) em 18 famílias da Dinamarca, Eslováquia e Alemanha . Este estudo confirmou a heterogeneidade do bócio atóxico familiar e identificou a primeira região candidata com uma prevalência de 20% das famílias investigadas. Entretanto nenhum gene candidato provável foi identificado nos loci encontrados. Estudos adicionais a fim de confirmar os novos loci identificados (2q, 3p, 7q e 8p) e estreitar as regiões candidatas deverão ser realizados.

PATOGÊNESE

Fatores Envolvidos na Proliferação da Célula Folicular Tireoidiana

A seqüência de eventos que determina o crescimento das células foliculares no bócio multinodular ainda não foi inteiramente esclarecido . O crescimento das células tireoideanas é regulado pelo hormônio hipofisário TSH e por outros fatores de crescimento, como fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-I). Desde a elucidação do receptor do TSH e dos seus mecanismos intracelulares através da proteína G 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 . Vários estudos apontam 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 . 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 . Estudos com cultura de células de bócio multinodular e nódulos autônomos demonstram 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 . Além da via cAMP-proteína kinase A (PKA), a via fosfolipase C – proteína kinase C (PKC) e a cascata proteína-tirosina-kinase estão implicadas na transdução do sinal que controla o crescimento e a função das células tireoidianas humanas . Estudos com folículos de tecido de nódulos colóide demonstraram que EGF, agindo via tirosina kinase e ativando PKC, inibe a função das células foliculares, induzida pela via TSH-PKA. Já a cascata TSH-PKA é mitogênica, mas em menor grau do que as vias PKC e EGF-proteína kinase . Uma vez que se demonstrou que a PKA inibe as vias PKC e EGF-tirosina kinase, não é surpreendente que a ação combinada destas vias na proliferação celular seja menos mitogênica comparativamente com a ação aditiva da cascata da PKC ou EGF-tirosina kinase isoladamente (Tabela 1).

Outros fatores possivelmente envolvidos incluem diminuição da síntese do fator de transformação do crescimento beta ($TGF\beta$), aumento da síntese de Ras e da proteína $G_s\alpha$. O $TGF\beta$, que antagoniza os efeitos do TSH, IGF-I e EGF em tireócitos de ratos, encontra-se uniformemente expresso em tecidos de carcinomas papilares, porém com padrão heterogêneo em lesões benignas . Este resultado, como propõe os autores, sugere que a falta da inibição da proliferação das células foliculares pelo $TGF\beta$ pode estar implicada na patogênese do bócio multinodular e carcinomas da tireóide.

Papel dos Proto-oncogenes na patogênese do Bócio Multinodular

Proto-oncogenes são genes celulares normais, responsáveis pelo controle do crescimento e do ciclo celular e quando ativados originam os oncogenes . 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 . 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 . A ativação do proto-oncogene *RAS* por mutações em ponto é a alteração genética mais freqüentemente encontrada em tumores espontâneos da tireóide (aproximadamente 30%) . Gire & Wynford-Thomas demonstraram que a ativação do oncogene *RAS* induz a proliferação sem perda da diferenciação em cultura de células de tireóide humana. Com o objetivo de avaliarmos essa hipótese *in vivo*, estudamos a expressão do *RAS* em 34 pacientes com diagnóstico histopatológico de bócio colóide . Demonstramos aumento significativo na expressão dos proto-oncogenes H- *RAS*, K- *RAS* e N- *RAS* no tecido neoplásico em comparação com o tecido normal, mesmo na ausência de mutações nestes genes no tecido tumoral . A percentagem de tumores com aumento da expressão dos proto-oncogenes analisados, foi de 30% dos casos na análise do H- *RAS*, 47% no K- *RAS* e 44% no N- *RAS*. No conjunto, 73,5% da amostra apresentou aumento da expressão dos genes *RAS*, sendo que apenas 2 pacientes tiveram aumento concomitante dos três genes em seu tecido nodular. Em estudo mais recente (48), avaliamos a expressão do mRNA H-*RAS* e da proteína Ras em amostras de BMN atóxico (18 casos) e tóxico (10 casos). Observamos um aumento da expressão do H-*RAS* em 50% dos nódulos dominantes dos bócios atóxicos, porém nenhuma amostra de BMN tóxico apresentou aumento de expressão do H-*RAS*. A expressão do H- *RAS* foi positiva e significativamente correlacionada com a expressão do gene da tireoglobulina. Esse resultado sugere que o bócio nodular pode apresentar um fenótipo similar ao obtido nos estudos *in vitro*, com aumento da proliferação sem perda da diferenciação, constituindo-se, talvez, num modelo atraente para o estudo do papel das alterações do *RAS* no

processo neoplástico. Ainda sugerem que o aumento da expressão da proteína Ras normal pode estar implicado na patogênese do BMN atóxico e que mecanismos distintos podem explicar a proliferação celular em bócio tóxico e atóxico.

Heterogeneidade Morfológica e funcional do Bócio Multinodular

Uma importante característica do bócio multinodular é a heterogeneidade no crescimento e função das células foliculares . Estudos com cultura de células foliculares demonstram que o crescimento e uma variedade de funções, incluindo a produção de tireoglobulina, transporte e organificação do iodeto, endocitose e inibição do crescimento pelo TGF β e por doses farmacológicas de iodo são heterogêneos. Outro achado relevante para a compreensão da patogênese do BMN foi a demonstração da variabilidade na dependência do TSH para o crescimento, bem como o potencial para a proliferação espontânea e estimulada pelo TSH entre as células foliculares . De forma interessante, estes estudos encontraram uma distribuição não aleatória das células com estas características, ou seja, células com qualidades funcionais similares apresentam tendência ao agrupamento, em analogia com achados *in vivo* da tireóide normal e do BMN . A Figura 1 demonstra esquematicamente essa distribuição das células foliculares. Assim, o BMN e o bócio multinodular tóxico (BMNT) apresentam-se como um grupo misto de entidades nodulares, com lesões hipo-, normo- e hiperfuncionantes dentro da mesma glândula. O balanço final das propriedades funcionais dos nódulos individuais do BMN determinará o status funcional do paciente, que pode ser o eutireoidismo, hipertireoidismo subclínico ou hipertireoidismo franco. É importante observar-se que este quadro funcional não é estacionário, e os pacientes com BMNT, na maioria dos casos, apresentam uma longa evolução de BMN .

Formação de nódulos

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 . O achado de nódulos clonais em 60-70% dos casos indica que os nódulos de tireóide resultam predominantemente de um processo neoplásico, sendo as mutações somáticas o ponto inicial . Assim, maioria dos nódulos solitários de tireóide são neoplasias clonais, indicando que originam-se de uma única célula precursora . No entanto, no bócio multinodular os nódulos podem ser hiperplásicos ou verdadeiras neoplasias clonais . Em concordância, Kopp et al. demonstraram que nódulos clonais e policlonais coexistem num mesmo bócio multinodular. De acordo com este conceito, o BMN é atualmente considerado uma neoplasia benigna, sendo assim, têm sua etiopatogênia no próprio tireócito .

Os modelos de animais com hiperplasia da tireóide por depleção de iodo demonstraram que em associação com o aumento da atividade funcional ocorre um aumento também no número de tireócitos. Estes dois eventos provavelmente acarretam uma explosão de eventos mutagênicos . Apesar das rotas enzimáticas ainda não terem sido completamente caracterizadas, sabe-se que a síntese dos hormônios da tireóide associa-se aumento na produção de H_2O_2 e na formação de radicais livres, os quais podem lesar o DNA genômico e causar mutações . Como conseqüência, a taxa de mutações espontâneas na tireóide é cerca de dez vezes maior do que em outros órgãos . Além do aumento da taxa de mutações espontâneas, uma maior taxa de replicação dificulta o reparo das mutações, aumentando ainda mais a carga mutagênica nesta glândula. Krohn et al propõe um modelo de três etapas para formação do BMN. No primeiro passo, deficiência de iodo, fatores bocigênicos, nutricionais ou autoimunidade causam hiperplasia difusa da tireóide. Neste estágio de hiperplasia da tireóide, o aumento da proliferação em conjunto com possíveis danos de DNA devido ao aumento da taxa de mutações por ação da H_2O_2 , causa um incremento na carga de mutações. Algumas destas mutações espontâneas conferem uma ativação constitutiva da cascata do cAMP que estimulam o crescimento e a função da célula folicular. Finalmente, em uma tireóide em proliferação, a expressão dos fatores de

crescimento (IGF-1 e/ou EGF) é aumentada. Como resultado, todas as células se dividem e formam clones. Após, a expressão dos fatores de crescimento diminui e apenas clones com mutações ativadoras autônomas continuarão a proliferar. Assim, estes clones podem formar pequenos focos, os quais se desenvolverão em nódulos de tireóide. Este mecanismo pode explicar tanto a formação de nódulos autônomos por mutações que conferem uma vantagem no crescimento e na função das células afetadas bem como a formação de nódulos frios, por mutações que estimulam somente a proliferação.

História Natural do Bócio Multinodular

A história natural do bócio é caracterizada clinicamente pelo crescimento da tireóide, formação de nódulos e o desenvolvimento de autonomia funcional. O BMN é uma patologia de longa duração, que provavelmente origina-se na adolescência. O BMN pode permanecer estável ou crescer lentamente por muitos anos. Entretanto, crescimento rápido de um ou mais nódulos também é descrito. Até o presente, parâmetros específicos para prever o comportamento do bócio em relação a seu crescimento não foram definidos . Um estudo recente avaliou a história natural de 268 pacientes com nódulos sólidos e císticos com citologia benigna utilizando a ultrassonografia e detectou aumento de pelo menos 15% das dimensões dos nódulos após 5 anos em 89% dos casos .

Em bócios com longa duração, tireotoxicose desenvolve-se num grande número de pacientes, sendo que esta foi descrita em 60% dos pacientes com mais de 60 anos . No mesmo estudo, o tempo médio para o desenvolvimento do hipertireoidismo foi de 17 anos, com maior tendência a tireotoxicose, quanto maior a duração do bócio. Um estudo transversal conduzido em pacientes com BMN atóxico encontrou uma relação entre crescimento da tireóide, formação nodular e autonomia funcional com a idade. O volume da tireóide também foi positivamente correlacionado com a idade e a duração do bócio. Outro estudo observou a história natural de pacientes eutireoideos com BMN, demonstrando que a função da tireóide era autônoma em 71% dos casos e o hipertireoidismo desenvolveu-se após uma média de 5 anos em 28% destes pacientes. Esta condição é secundária

à autonomia funcional dos nódulos ao controle hipofisário, a medida que os nódulos crescem sua contribuição para a secreção hormonal da glândula aumenta e a secreção de TSH diminui, resultando num decréscimo funcional do tecido extranodular. Entretanto, muitos bócios também apresentam nódulos com crescimento autônomo, mas com pouca habilidade de captar iodeto e sintetizar os hormônios tireoideos, o que pode ser evidenciado por um padrão de captação heterogêneo de radionucleotídeo à cintilografia. A evolução do bocio atóxico difuso a um bocio multinodular atóxico e deste ao bocio multinodular tóxico é um processo gradual, entretanto a presença da deficiência de iodo modifica dramaticamente o curso da doença . Em nossa casuística (48) demonstramos uma idade média mais elevada nos pacientes com bocio tóxico em comparação ao pacientes com bocio atóxico (57.4 ± 6.13 vs $51.6 \pm 12.8.$, $P=0.11$) e que o tamanho do nódulo dominante, avaliado pela macroscopia em cm, era significativamente maior nos BMN tóxicos em comparação aos atóxicos (5.06 ± 2.5 vs. 3.26 ± 1.4 , $P=0.04$).

Neoplasia Malignidade da Tireóide e Bócio Multinodular

O câncer de tireóide é uma patologia relativamente rara, sendo responsável por aproximadamente 1% dos novos casos de doença maligna diagnosticados . Uma das principais características que diferencia as neoplasias malignas das benignas é a habilidade das células cancerosas de invadir tecidos normais. A capacidade de metastatização permite que as células se disseminem além do tecido de origem e estabeleçam novas colônias em outros órgãos . Conforme já descrito anteriormente, o BMN é considerado uma neoplasia benigna, sendo composto predominantemente por nódulos clonais. Porém, o fato do BMN conter nódulos benignos não evita o surgimento de neoplasias malignas na mesma glândula. De acordo, a prevalência de carcinoma de tireóide é de aproximadamente 5% dos casos de BMN, semelhante a prevalência de carcinoma nos nódulos únicos . Assim, a avaliação de pacientes com BMN deve ser direcionada a exclusão de malignidade, com realização de punção aspirativa de tireóide.

CONCLUSÕES

Concluindo, a revisão da literatura demonstra que o BMN é uma patologia heterogênea, na qual a proliferação celular ocorre através de mecanismos que operam nos tireócitos propriamente ditos. A proliferação celular pode ser completamente dissociada das características funcionais e metabólicas, e estas características podem variar amplamente em áreas diferentes do mesmo BMN. Embora o TSH tenha um papel importante e complexo na proliferação das células foliculares, não é um fator exclusivo para o crescimento celular. O conceito atual é que a maioria dos componentes do BMN são verdadeiros tecidos neoplásicos e esse não é puramente hiperláxico, secundário a deficiente de iodo. Apesar do grande avanço no entendimento destes aspectos patogênicos, estudos adicionais com enfoque na proliferação e no controle do crescimento celular serão importantes na compreensão dos mecanismos etiopatogênicos do BMN. .

REFERÊNCIAS

Tabela 1. Interação das vias dependentes e independentes do TSH no controle do crescimento e função das células foliculares.

Vias	Proliferação	Função
TSH-Proteína kinase A	↑	↑↑↑
Proteína kinase C	↑↑↑	-
EGF-tirosina kinase	↑↑↑	-
TSH-PKA + PKC	↑↑	↑
TSH-PKA + EGF-tirosina kinase	↑↑	↑

Adaptado da ref 35.

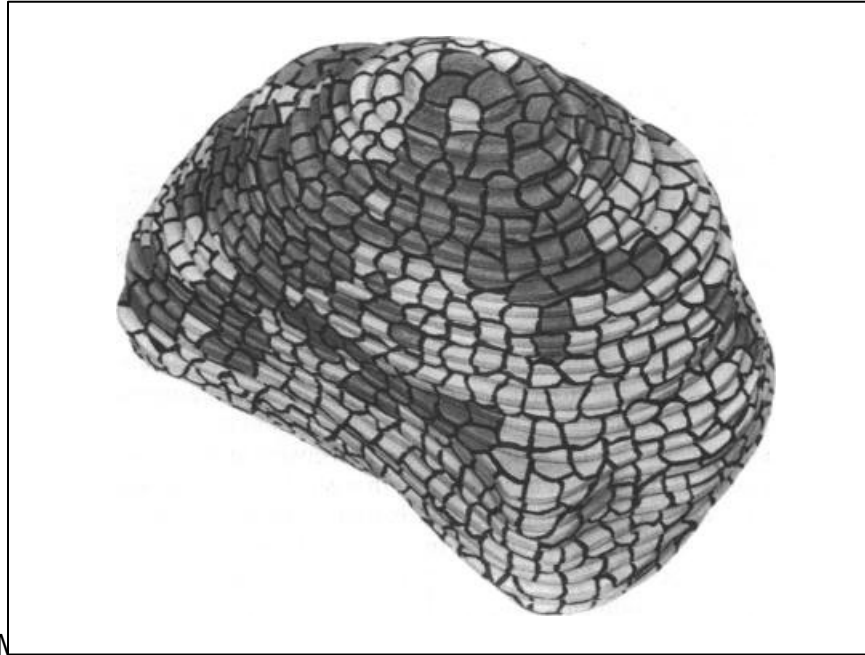


Figura 1. Nas células proliferativas (em escuro) não estão distribuídas aleatoriamente, mas formam grandes coortes ao lado de grandes áreas de células foliculares em repouso (claro). Este padrão de distribuição sugere a presença de uma subpopulação com diferente sensibilidade aos estímulos de crescimento. Adaptado da ref. 54.

Capítulo II

H-RAS gene expression in human multinodular goiter

Aceito para publicação Histology and Histopathology, 2007.

H-RAS gene expression in human multinodular goiter

Lenara Golbert¹., João Henrique Godinho Kolling¹, Aline Hatzenberger Leitão¹, Luciane Martins², Edna T. Kimura,² and Ana Luiza Maia¹.

¹Endocrine Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ²Department of Cell & Development Biology, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, Brazil

Short title: *RAS* and nodular goiter.

Grant support: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundo de Investimento à Pesquisa (FIPE) and Fundação de Amparo do Estado de São Paulo (FAPESP), Brazil.

Correspondence: Ana Luiza Maia, MD.,PhD.

Serviço de Endocrinologia

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

Phone/Fax: 55-51-2101-8127; E-mail: almaia@ufrgs.br

ABSTRACT

The *RAS* protooncogene has an important, although not yet established role in thyroid neoplasia. In this study, we evaluated the H-*RAS* mRNA and protein levels in human samples of nontoxic and toxic multinodular goiter samples, according to serum TSH levels. The mean of H-*RAS* mRNA levels in nodules of nontoxic nodular goiter were significantly increased compared to nonnodular tissue (1.49 ± 1.21 vs. 0.94 ± 0.81 AU, $P=0.016$). Nine of the 18 specimens (50%) of nontoxic multinodular goiter exhibited increased levels of H-*RAS* mRNA. The increased H-*RAS* mRNA levels were paralleled by increased H-Ras protein levels in about 90% of the cases. Interestingly, no differences were observed in H-*RAS* expression between nodules and adjacent nonnodular tissue in toxic nodular goiters (0.58 ± 0.27 vs. 0.58 ± 0.20 AU, $P=0.88$). None of the 10 samples from toxic multinodular goiters exhibited overexpression of H-*RAS*. The H-*RAS* expression was positively correlated with thyroglobulin expression ($r^2=0.51$; $P=0.04$). In conclusion, we demonstrated increased levels of H-*RAS* mRNA and protein in samples of nontoxic multinodular goiter, indicating that it might be involved in goiter pathogenesis. In contrast, H-*RAS* overexpression was not detected in any of the samples of toxic multinodular goiter, suggesting different mechanisms for cell proliferation in nodular goiter according to thyroid status.

Keywords: H-*RAS*, multinodular goiter, human, gene expression, thyrotoxicosis.

INTRODUCTION

Cell proliferation is stimulated by extracellular growth factors that activate specific signaling cascades and dictate the orderly sequence of events needed for DNA synthesis and cell division . The *RAS* protooncogenes (H-, K-, N-*RAS*) are members of the superfamily of GTP-binding proteins . These proteins, that are membrane-associated and bound to GDP when inactive, play an important role as molecular switches in the transduction of mitogenic signals from growth factor receptors on the cell surface. Activation of *RAS* oncogenes by point mutations in codons 12, 13 and 61, is an early event in thyroid tumorigenesis . In contrast to other human tumors types whereby mutations show specificity for one *RAS* gene, mutations of all three genes have been reported in thyroid neoplasias . Aberrant expression of the *RAS* genes has been well established in several human cancers, including breast cancer, head and neck cancer and leukemia .

Multinodular colloid goiter is characterized by heterogeneity in growth and function of thyroid follicular cells . The ultimate causes of multinodular goiter are to be sought within the thyrocytes themselves, in analogy to most other benign neoplasia (Krohn *et al.*, 2005). Intrinsic metabolic and functional differences between the individual thyrocytes, from which new follicles are generated during goitrogenesis, are the cause of the functional and structural heterogeneity . Studies have demonstrated the predominant neoplastic character of nodular structures and monoclonal origin for the majority of the nodules (60–70%), with somatic mutations as the starting point . Furthermore, recent developments in this field also indicate that normal and goitrous thyroids are composed of clustered angiofollicular units controlled by vasoactive and angiogenic factors .

Previous studies have shown that H-RAS activation induces proliferation in normal human thyroid epithelial cells without loss of differentiation, as assessed by the expression of thyroid specific genes . In this context, we hypothesized that increased H-RAS expression could also play a role in the human nodular goiter, since this pathology maintains most of the differentiated functions despite the abnormal proliferative rate. Therefore, the present study was designed to evaluate the H-RAS expression in nodular goiter and determine whether the human disease displays the same findings observed in *vitro* studies.

MATERIAL AND METHODS

Patients

The study was carried out between February 2000 and August 2002. Consecutive unselected patients with a diagnosis of multinodular goiter attending the Endocrine or Head and Neck Surgery Divisions at Hospital de Clínicas de Porto Alegre were eligible. Multinodular goiter was defined by the presence of two or more nodules detected by physical examination. Surgery was indicated independently by attending physicians and tissues obtained at surgery were immediately frozen until analysis. Tissue samples were analyzed independently by a pathologist, and classified histologically as multinodular goiter, according to WHO recommendations . On functional grounds, the cases were then subclassified as nontoxic or toxic based on serum TSH levels (see below). Thirty-five samples of multinodular goiter were collected. Of them, 7 were excluded because only one nodule was detected by ultrasonography or macroscopic exam. Thus, 28 samples of multinodular goiter were available for the study.

Clinical data were retrospectively evaluated and included medical history, physical examination, and complementary studies in accordance to clinical indication. Serum TSH

levels were measured by a double antibody–sensitive assay (Immulite, Diagnostic Products, Llanberis, United Kingdom). The goiter was classified as nontoxic multinodular goiter when the serum TSH value was normal and as toxic multinodular goiter in cases with suppressed TSH values (reference levels: 0.4 – 4.0 mU/L). Other causes of thyrotoxicosis (Graves' disease, thyroid hormone administration) were excluded in patients with suppressed levels of TSH. The information obtained from the study did not influence or affect the patients' diagnosis or treatment. The Ethics Committee at the Hospital approved the study protocol, and all patients gave their informed consent.

Tissue specimens and RNA preparation

Thyroid samples were obtained from both nodule and adjacent nonnodular tissue at the time of surgery. Samples were collected from the dominant nodule in the nodular gland, evaluated by macroscopic examination. Total RNA was isolated from 50 -100 mg of thyroid tumor and surrounding nontumor tissues using TRIzol[®] reagent (Invitrogen[™] Life Technologies Inc., NY, USA) according to the manufacturer's instructions. The purity of the total RNA was assessed by UV spectrophotometry (GeneQuant II[®], Amersham Pharmacia Biotech).

Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

RT-PCR was performed using the Superscript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Invitrogen[™] Life Technologies Inc., NY, USA) using 3 µg of total RNA as template. Specific oligonucleotides derived from the coding region of human H-RAS (sense: 5' GACGGAATATAAGCTGGTGGTGG 3' and antisense: 5' TGATCTGCTCCCTGAACTGGTGG 3'), were used to prime target gene, resulting in a

predicted 298 bp fragment. A human β_2 -microglobulin primer set (5'-ATCCAGCGTACTCCAAAGATTCAG-3' and 5'- AAATTGAAAGTTAACTTATGCACGC-3') that generated a 623 bp product was used as an internal control. β_2 -microglobulin was co-amplified within the same reaction in order to evaluate inter-sample variation in cDNA contents and PCR efficiency. A preliminary series of PCR reactions were carried out to determine the range of cDNA concentration and the number of cycles over which the samples should be examined before reaching a *plateau* (data not shown). The PCR reactions included 2 μ l of RT products, and were carried out with Taq DNA polymerase (Invitrogen™ Life Technologies Inc., NY, USA) in a final 50 μ l volume. The amplification profile was an initial denaturation step at 94°C for 3 min, followed by 94°C for 1 min, annealing at 62°C and extension at 72°C for 2 min. Twenty amplification cycles were used, with a final additional extension step at 72°C for 5 min. The β_2 -microglobulin primers were included after the 5th cycle. RT-PCR reactions without cDNA samples were carried out as negative controls. All reactions were performed in duplicate. After amplification, 10 μ l of the PCR products were analyzed on a 1.5% ethidium bromide agarose gel and the intensity of each band was determined by optic densitometry (arbitrary units, AU) (ImageMaster® VDS, Amersham Pharmacia Biotech). DNA band intensity was normalized against the corresponding values of the β_2 -microglobulin band intensity. The mRNA levels for H-RAS gene were expressed as the ratio of the intensity of the band in nodule *versus* the adjacent nonnodular tissue. We considered as overexpression, expression levels higher than 1,5 fold in nodules specimens compared to corresponding normal .

The same procedure described above was used to analyze the thyroglobulin expression in nodule and normal thyroid tissue. Specific oligonucleotides derived from the coding region of human thyroglobulin gene (sense: 5' GACGGAATATAAGCTGGTGGTGG 3' and antisense: 5' TGATCTGCTCCCTGAACTGGTGG 3') were used to prime target

cDNA, resulting in a 357 bp product. The cycling conditions used were 94°C for 3 min, 23 cycles of 94°C for 1 min, 62°C for 1 min, 72°C for 1 min and a final 5 min extension period.

Immunohistochemical Analysis

Immunohistochemistry was performed on paraffin sections by an indirect 3-stage immunoenzymatic method . Briefly, 4 µm sections were placed on 0.1% poly-lysine-coated slides (Sigma, St. Louis, MO). The antigen retrieval of tissue sections was performed by placing slides in 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0) in a microwave oven set at 600W for 3 consecutive cycles of 4 minutes. Subsequently, the endogenous peroxidase activity was blocked by 3% hydrogen peroxide (H₂O₂). Tissue sections were then incubated overnight with 4µg/ml mouse monoclonal primary antibody to H-Ras (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) in phosphate buffered saline (pH 7.4) with 0.05% Bovine Serum Albumin (BSA) and Tris Buffered Saline (TBS). Subsequently, the sections were incubated with biotinylated secondary antibody (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway NJ) for 2 hours, followed by incubation with extr-Avidin[®] peroxidase conjugate (Sigma, St. Louis MO). The peroxidase activity was visualized by reaction in 3,3'-diaminobenzidine substrate solution (Sigma, St. Louis MO) containing hydrogen peroxide (H₂O₂). The slides were then washed in tap water overnight, counterstained with Mayer's hematoxilin and mounted with E-Z Mount[®] (Shandon, Pittsburgh PA). The negative control was performed using mouse monoclonal antibody (IgG₁, MOPC-21, Sigma, St. Louis, MO). The positivity of the immunostaining reaction was observed by brown staining under light microscope (Eclipse E600 Nikon, Japan). The H-Ras isoform immunostaining was assessed and scored using the semi-quantitative scale for intensity: negative (-), weak (+), moderate (++) , and strong (+++). Researchers (LM, ETK) who were unaware of the results of the H-RAS mRNA levels performed the imunohistochemical analysis.

Detection of *RAS* mutations

Tumor cDNA was evaluated for point mutations at codons 12, 13, and 61 of H-*RAS* by Single-Strand Conformational Polymorphism (SSCP) and by Restriction Fragment Length Variance (RFLV). SSCP was performed as previously described . Briefly, PCR fragments were denatured in formamide and cooled on ice before loading onto the gel. Separation was carried out in a vertical electrophoresis apparatus in a 12% polyacrylamide-0.8% bis-acrylamide gel at 12°C, at 60-120 mV for 4-6h. DNA bands were visualized by silver staining according to standard procedures.

Restriction Fragment Length Variance: Mutational analysis of codons 12,13, and 61 on the H-*RAS* genes were performed as previously described . Briefly, 10µl of the PCR products were digested overnight with the restriction endonuclease *MspI* under conditions recommended by the suppliers. The digested products to which glycerol was added were electrophoresed through a 12% polyacrylamide gel and silver stained.

DNA sequencing - Whenever necessary, the absence of the mutation was confirmed by direct sequencing of the PCR product with an automated sequencer (ABI PRISMTM 310, Applied Biosystems, Foster City, CA) using the Bigdye terminator Kit according to the manufacturer's standard protocol.

Statistical analysis

The results are expressed as median (minimum and maximum) or mean \pm SD. Clinical and laboratory characteristics between groups were compared using the Student's t-test or Mann-Whitney's U-test for quantitative variables. To compare the expression levels of genes of interest in nodular with surrounding tissue, paired Student's test was used. The correlation between H-*RAS* and thyroglobulin expression was assessed by Pearson's rank. $P < 0.05$ was considered statistically significant. The Statistical Package for Social Science 13.0 professional software (SPSS, Chicago, IL) was used for statistical analysis.

RESULTS

Patients

The characteristics of the 28 patients with multinodular goiter included in this study are shown in Table 1. Based on serum TSH levels, 18 samples were classified as nontoxic multinodular goiter and 10 as toxic multinodular goiter. There were no significant differences between the two groups with respect to sex distribution ($P=1.00$) or age (51.6 ± 12.8 vs. 57.4 ± 6.13 , $P=0.11$). However, the mean size of the dominant nodule was significantly higher in patients with toxic multinodular goiter than that in nontoxic goiter (5.06 ± 2.5 vs. 3.26 ± 1.4 , $P=0.04$).

***H-RAS* expression in nontoxic vs. toxic multinodular goiter**

The mRNA levels for *H-RAS* gene are expressed as the ratio of the expression in each nodule versus the expression of corresponding normal tissue. The *H-RAS* mRNA levels in nodules of nontoxic multinodular goiter were higher than those in adjacent nonnodular tissue (1.49 ± 1.21 vs. 0.94 ± 0.81 AU, $P=0.016$; Figure 1A).

In contrast, no differences in *H-RAS* expression were observed between nodules and adjacent nonnodular tissue of toxic multinodular goiters (0.58 ± 0.27 vs. 0.58 ± 0.20 AU, $P=0.88$; Figure 1B). The differential expression in *H-RAS* genes according to thyroid status was further stressed when analyzed in terms of percentage of overexpression. We considered levels higher than 1.5-fold in nodule specimens compared to adjacent nonnodular tissue as overexpression. While 50% (9/18) of the samples from patients with

nontoxic nodular goiter showed overexpression of H-RAS, none of the 10 samples from patients with toxic nodular goiter presented overexpression of this protooncogene (table 1).

We further analyzed the H-Ras protein by immunohistochemical technique. Fifteen cases were available for analysis: 7 with and 8 without H-RAS mRNA overexpression. Of the 7 cases with H-RAS overexpression, 6 were positive (85.7%) for H-Ras protein. Five of these cases were considered to be of moderate to strong reactivity and 4 have a wide distribution on the tissue (Table 1, Figure 2). Of the 8 cases without H-RAS mRNA overexpression, 2 (25%) displayed weak positivity for H-Ras protein (Table1).

To exclude the presence of point mutations, the amplified cDNA fragments including codons 12, 13, and 61 of for H-RAS gene were analyzed by PCR-SSCP and RFLV. None of the 24 samples analyzed for H-RAS showed mutations. DNA sequencing was performed to confirm the absence of mutations, whenever necessary.

H-RAS vs. thyroglobulin expression in multinodular goiter

Since *in vitro* studies have shown that thyroid cells expressing mutant H-RAS retain expression of thyroid-specific proteins, we evaluated whether endogenous human H-RAS overexpression was also associated with *in vivo* thyroglobulin expression. Co-amplification of thyroglobulin and H-RAS genes were available in 16 out of 23 specimens. Correlation analysis showed that change in H-RAS expression was positively and significantly correlated with changes in thyroglobulin expression ($r^2=0.51$, $P=0.04$; Figure 3).

DISCUSSION

The RAS protooncogene has an important, not yet established role in the pathogenesis of thyroid neoplasia. In this study, we analyzed the H-RAS mRNA and H-

Ras protein levels in human multinodular goiter fragments. We observed increased of nonmutated H-RAS mRNA levels in about 50% of dominant nodule samples in nontoxic multinodular goiter. Interestingly, however, none of the samples from patients with suppressed levels of serum TSH showed H-RAS overexpression. The H-RAS expression was positively and significantly correlated with thyroglobulin expression. These results suggest that an overexpression of normal Ras protein may be implicated in the pathogenesis of nontoxic multinodular goiter.

RAS functions as a molecular switch in a large network of signaling pathways, controlling the differentiation and proliferation of cells. Mutations in *RAS* protooncogenes are prevalent in benign and malignant thyroid tumors . However, the incidence of *RAS* mutations in thyroid tumors and their frequency in specific histological types varies widely in different series . Differences in environmental factors, such as iodine, radiation exposure, histological tumor classifications, or methodology may explain some of the conflicting results. A recent study performed a pooled analysis of 269 mutations garnered from 39 previous studies and observed that *RAS* mutations were significantly less frequent when analyzed by direct sequencing . In contrast to solitary thyroid nodules, which have a more homogeneous clinical and pathological picture, nontoxic and toxic multinodular goiters are a miscellaneous group of nodular disease. As a general rule, multinodular goiter development occurs in two phases: activation of thyroid epithelial cell proliferation leading to goiter, and a focal increase of thyroid epithelial cell proliferation causing thyroid nodules . Constitutive activation of the *RAS/RAF/MEK/ERK/MAP* pathway have been suggested as a key mechanism during tumor initiation or progression in thyroid follicular cells .

Earlier studies have shown that overproduction of even the normal RAS protein is sufficient to confer a transformation potential on cultured cells . Indeed, our results

demonstrated an increase in H-RAS mRNA levels in about 50% of the nodules in nontoxic multinodular goiter, a benign thyroid neoplasia that maintain most differentiated thyroid cell functions. Interestingly, none of the samples from isolated thyroid nodule presented H-RAS overexpression (7 samples, data not shown). No statistical differences on morphological or clinical (age, sex, size, range of disease duration, growth rate, and compressive signs) aspects between nodules with or without H-RAS overexpression were observed (data not shown). The increased H-RAS mRNA levels correlated with higher levels of normal H-Ras protein, which was increased in approximately 90% of nodules with H-RAS mRNA overexpression. In agreement with previous studies , the pattern of immunostaining was heterogeneous, with coexistence of areas positive and negative for Ras protein in the same gland. No point mutations in codons 12, 13, or 61 of H-RAS gene were detected in our samples, in accordance with previous studies that demonstrated a low prevalence of RAS mutations in benign neoplasia . These results allowed us 2 noteworthy inferences: First, cell proliferation in nontoxic multinodular goiter may involve RAS signaling. Second, RAS overexpression itself does not lead to loss of differentiation in human thyroid follicular cells, as opposed to full transformation observed in rat cell lines . Nevertheless, apoptosis seems to be a primary and general response to acute expression of activated Ras in rat thyroid epithelial cells, indicating that Ras might interfere on cell cycle progression and apoptosis . Therefore, one could speculate that activation of H-RAS in nodules of nontoxic goiter might avoid permanent hyperactivity by promoting thyroid cell apoptosis.

Another interesting finding of this study was the H-RAS differential expression between samples from nontoxic and toxic multinodular goiter. We observed that none of the samples from patients with suppressed TSH presented H-RAS overexpression. TSH activities are largely mediated by an increase in cAMP intracellular levels, which activate multiple signaling pathways to regulate thyroid differentiation, proliferation, and function.

Indeed, constitutive activation of the cAMP signaling pathway is widely accepted as the biochemical driving force of thyroid autonomy, as suggested by the presence of somatic activating TSH receptor mutations in scintigraphically nonsuppressible foci in nontoxic goiters in iodine-deficient areas and TSH receptor mutations and, less frequently, G_sα protein mutations in macroscopic toxic thyroid nodules both in solitary nodules and multinodular disease . Besides the classical cAMP/ protein kinase A (PKA) pathway, cAMP stimulates cell cycle progression through a PKA-independent mechanism that involves the activation of Rap1 and Ras . In rat WRT thyrocytes, overexpression of a constitutive inactive Ras form significantly reduces TSH-mediated proliferation, indicating that Ras is required for the full mitogenic action of TSH . Our results suggest that activation of the TSH-signaling pathway might also be required to induce H-RAS expression in human thyrocytes and might indicate different mechanisms for cell proliferation in nodular goiter according to thyroid status. On the other hand, it is also possible that the uncontrolled activation of the cAMP cascade overshadows the H-RAS expression. In agreement with *in vitro* studies , the H-RAS expression levels in human goiter were positively correlated with thyroglobulin expression.

In conclusion, our results demonstrated increased expression of nonmutated H-RAS protooncogene in samples of nontoxic multinodular goiter, suggesting that RAS genes are involved in the early stages of thyroid cell proliferation and transformation through augmented expression of the normal Ras protein. However, none of the nodules samples from patients with suppressed TSH exhibited increased levels of this oncogene indicating that distinct mechanisms might explain cell proliferation in nontoxic and toxic multinodular goiter.

REFERENCES

TABLE 1- Clinical and laboratory features of patients with multinodular goiter, and corresponding H-RAS expression levels in dominant nodule.

Case	Sex	Age (yr)	Dominant nodule size (cm) ¹	TSH ² (mUI/L)	H-RAS mRNA nodule/tissue ratio ³	H-Ras protein
Nontoxic multinodular goiter						
1	F	34	2.9	0.84	3.76*	NE
2	F	63	2.5	1.40	1.62*	+
3	F	47	3.0	0.72	1.70*	-
4	F	39	6.3	1.30	1.22	-
5	F	51	1.7	1.20	0.86	NE
6	F	70	5.0	2.20	2.10*	++
7	F	57	3.0	1.32	5.52*	+++
8	F	60	5.7	0.66	1.72*	+++
9	F	48	1.3	2.40	2.26*	++
10	F	61	NE	2.89	0.71	-
11	F	46	2.0	0.49	1.00	NE
12	F	65	2.5	0.81	0.86	+
13	F	52	2.2	1.58	1.70*	NE
14	F	50	4.0	1.51	1.30	-
15	F	48	2.5	0.86	1.58*	++
16	M	24	3.0	1.10	1.17	-
17	F	74	4.5	0.62	1.37	NE
18	F	39	NE	0.80	1.07	-
Mean ± SD		51.5± 12.9	2.9±1.5	1.3±0.7	1.75±1.2	
Toxic multinodular goiter						
19	F	55	7.0	0.08	0.56	NE
20	F	72	-	0.002	0.98	-
21	F	51	5.9	0.09	1.05	NE
22	F	57	5.5	0.03	0.62	+
23	F	54	9.0	0.19	0.88	NE
24	M	58	-	0.2	1.16	NE
25	F	63	2.2	0.31	1.25	NE
26	F	57	3.5	0.33	1.23	NE
27	F	55	1.4	0.3	0.88	NE
28	F	52	6.0	0.28	1.12	NE
Mean ± SD		57.4± 6.1	5.1±2.5	0.16±0.13	0.97±0.23	

¹ Evaluated by the pathologist, by macroscopic examination. ² TSH reference: 0.4 – 4.0 uM/L.

³The expression levels were expressed as the ratio of the intensity of the band in tumor versus corresponding normal tissue. * Considered as overexpression. NE, not evaluated.

Figure Legends

Figure 1. H-RAS mRNA levels in nodules and corresponding nonnodular tissue (arbitrary units). A) Nontoxic multinodular goiter. B) Toxic nodular goiter. Bars represent mean \pm 2 SE.

Figure 2. H-Ras immunostaining in human multinodular goiter sample by the peroxidase method. H-Ras staining is shown in brown and the nuclei are counterstained by Gill's hematoxylin. H-Ras positivity is present in the cytoplasm of both columnar and cuboidal follicular cells while the flat cell follicles are negatives (**A** and **B**, bar = 50 μ m). The heterogeneous pattern is also present among neighboring follicles (**C**, bar = 20 μ m).

Figure 3. Correlation of H-RAS and thyroglobulin mRNA levels (arbitrary units).

Figure 1

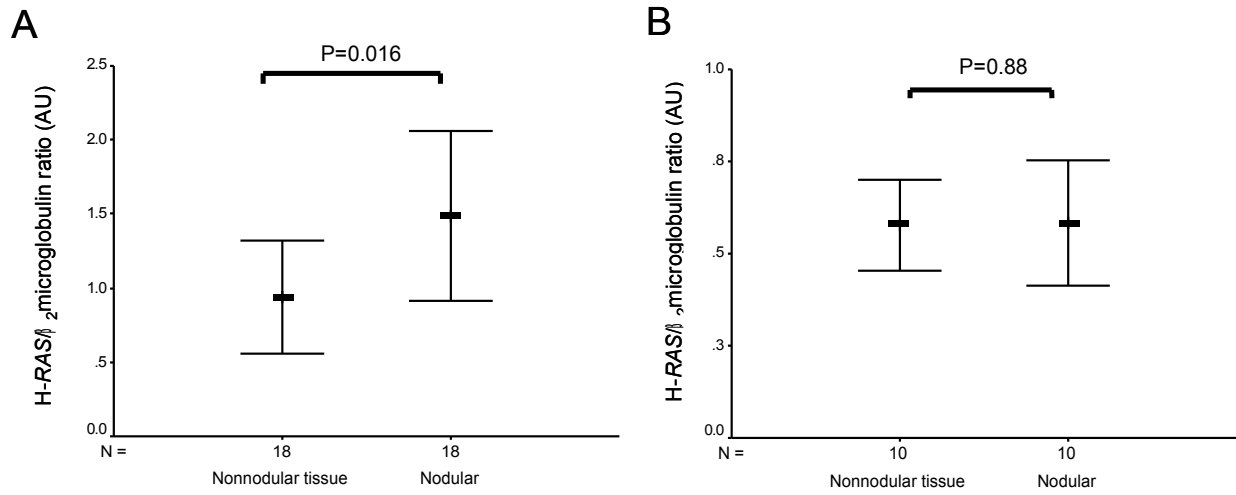


Figure 2

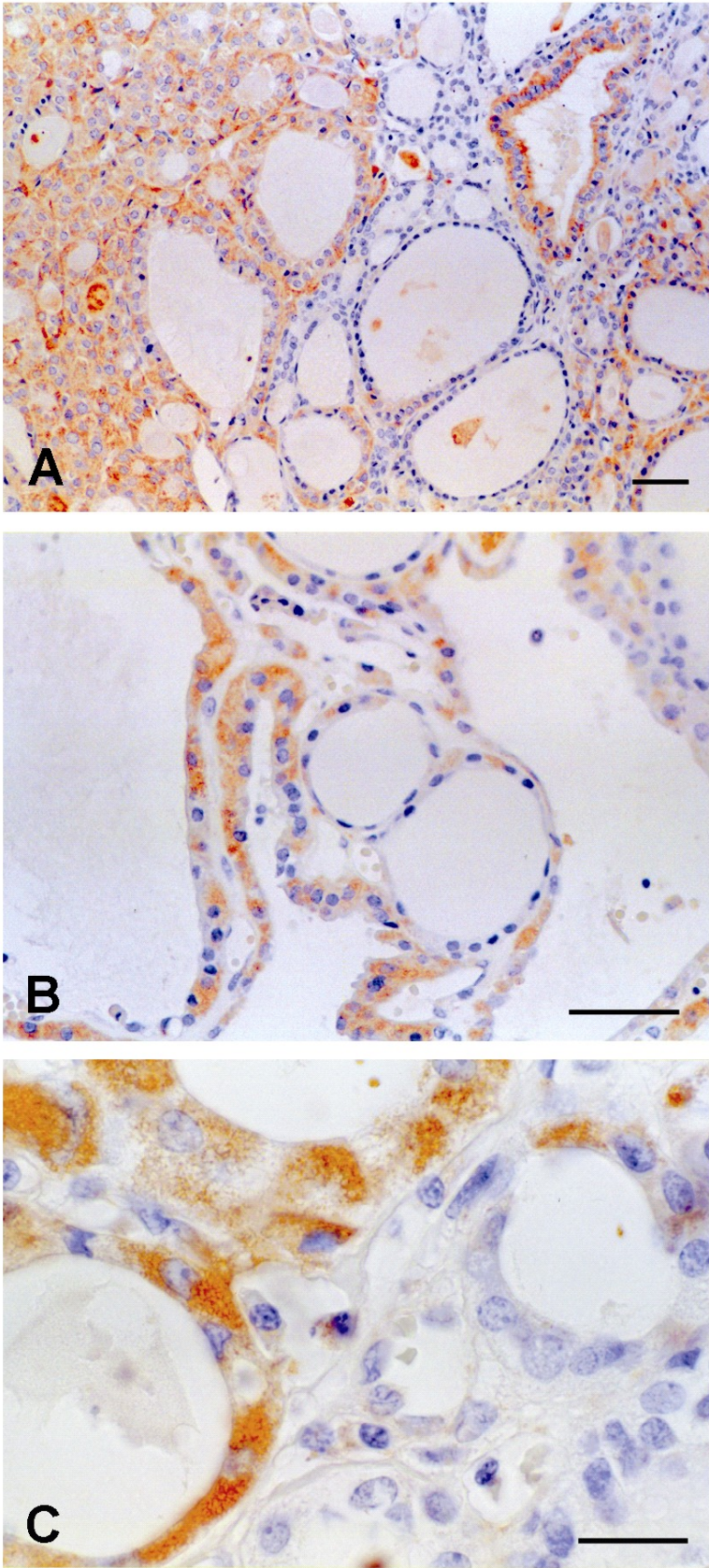


Figure 3

