

INSTITUTO SUPERIOR DE CIENCIAS MÉDICAS
“DR. SERAFÍN RUIZ DE ZÁRATE RUIZ”
SANTA CLARA, VILLA CLARA

ARTÍCULO DE REVISIÓN

EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS p21 RAS y CÁNCER

Por:

Dra. Otmara Guirado Blanco

Especialista de II Grado en Fisiología Normal y Patológica. Departamento de Ciencias Fisiológicas.
Profesora Auxiliar. ISCM-VC. e-mail: otmaragb@iscm.vcl.sld.cu

Resumen

Los genes ras pertenecen a una superfamilia de genes que codifican pequeñas proteínas de unión a nucleótidos de guanina. Las proteínas p21 Ras se localizan en la superficie interna de la membrana celular, donde actúan como interruptores moleculares binarios en vías de señalización que influyen en el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis. Los genes ras pueden adquirir propiedades transformantes por mecanismos cualitativos o cuantitativos. La activación oncogénica de ras es una de las más frecuentemente implicadas en el desarrollo de tumores humanos y experimentales. Las mutaciones de c-Ki-ras, c-Ha-ras y c-N-ras se han detectado aproximadamente en el 30 % de los cánceres humanos, y la sobreexpresión, en más de 50 %. Estas alteraciones, por lo general, ocurren en un estadio temprano del desarrollo tumoral. Debido a su importante papel en la carcinogénesis, el conocimiento de las bases moleculares y bioquímicas de la función de las proteínas p21 Ras está siendo aplicado en el desarrollo de nuevas terapias anticancerosas.

Descriptor DeCS:

GENES RAS
PROTEINA DE ONCOGENO P21 (RAS)
EXPRESION GENICA

Subject headings:

GENES, RAS
ONCOGENE PROTEIN P21 (RAS)
GENE EXPRESSION

La capacidad de una célula para proliferar está estrechamente regulada y envuelve una serie programada de pasos secuenciales que constituyen el ciclo celular. La progresión normal de este ciclo es el resultado de la interacción balanceada entre múltiples reguladores codificados por protooncogenes y genes supresores. Las alteraciones funcionales a nivel de estos reguladores pueden resultar en un ciclo celular desbalanceado y, como consecuencia, se desencadena una proliferación celular no sujeta a los controles habituales, insensible a los estímulos que normalmente resultan en la diferenciación y muerte celular, lo que ocasiona una pérdida del potencial de diferenciación de la célula¹.

Los protooncogenes ejercen un control positivo sobre la proliferación y el crecimiento celular. Las proteínas codificadas por estos genes forman parte de las vías fisiológicas de transducción de las señales mitogénicas. Uno de los protooncogenes más frecuentemente involucrados en el desarrollo de tumores humanos y experimentales son los genes ras. Estos genes mutados se han identificado en una gran variedad de cánceres humanos, lo que indica que las proteínas Ras

mutadas pueden contribuir a la regulación aberrante de las vías de señalización estimuladoras del crecimiento^{1,2}.

En este trabajo se resumen los aspectos más relevantes sobre el papel de los genes ras en la transducción de señales. Asimismo, se exponen los resultados de numerosos estudios sobre la expresión de estos genes en diferentes tipos de cánceres humanos, con el objetivo de ofrecer la percepción más actual acerca de la participación de las proteínas p21 Ras en la transformación maligna.

GENES RAS. ESTRUCTURA Y EXPRESIÓN

Los genes ras pertenecen a una familia génica eucariótica ubicua y muy conservada a lo largo de la evolución. Todos sus miembros codifican para pequeñas proteínas de unión a nucleótidos de guanina. Actualmente, se calcula que esta superfamilia de genes está constituida por más de 100 miembros distribuidos en cinco subfamilias denominadas: Ras, Rho, Rab, Arf y Ran, cada una de las cuales presenta un número variable de proteínas relacionadas^{3,4}.

Las diferentes subfamilias regulan numerosos procesos celulares que incluyen: el control de la proliferación, diferenciación y supervivencia celulares, la organización del citoesqueleto de actina, la matriz extracelular, la morfología y migración celulares, las funciones nucleares y el tráfico de membranas y proteínas. No obstante, muchas evidencias experimentales demuestran un importante solapamiento entre las distintas subfamilias, a lo que se añade el hecho de que el sistema de activación de cada una de estas proteínas no es absolutamente independiente de las otras, y existe un alto grado de interrelación, principalmente a nivel de las proteínas reguladoras²⁻⁵.

En los mamíferos existen tres tipos de genes ras: c-Ha-ras1, c-Ki-ras2 y N-ras. Otros miembros de esta familia de genes son: R-Ras, TC21 (R-Ras2), M-Ras (R-Ras3), Rap1 A y B, Rap2 A y B, Ra1 A y B, que comparten al menos un 50 % de identidad con Ras^{3,4,5}. La longitud de las secuencias en el ADN es de: 3 kb en Ha-ras1, 7kb en N-ras y más de 35 kb en Ki-ras2, y se encuentran localizados en los cromosomas 11p15.5, 12p12, 1p13, respectivamente³⁻⁶. Todos los genes ras están compuestos por cuatro exones codificantes, excepto Ki-ras 2 y N-ras de rata. El gen Ki-ras 2 posee dos exones número 4 alternativos (IVA y IVB) que generan dos proteínas isomórficas. Todos ellos comparten un exón adicional (exón 0) en la región 5' no traducida^{6,7}.

Estos genes codifican proteínas de 189 aminoácidos, conocidas como p21 Ras, debido a su tamaño de 21 kDa; Ki-ras 2 produce, como consecuencia del exón alternativo, una proteína adicional de 188 aminoácidos (Ki-Ras B), que es la variante predominantemente expresada en células de mamíferos⁶⁻⁸.

PROTEÍNAS RAS. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FUNCIONALES

Las principales proteínas Ras comparten una alta homología en los primeros 165 aminoácidos del extremo N-terminal, que constituyen el dominio catalítico, y poseen diferencias en los 25 aminoácidos de la región carboxil terminal, que es la región heterogénea; en esta, los cuatro últimos aminoácidos (186-189) forman la caja o motivo CAAX. El dominio catalítico contiene los motivos de secuencia necesarios para la interacción con nucleótidos de guanina, la actividad GTPasa y la región efectora. Las mutaciones de esta región más conservada son responsables de su alteración funcional^{7,8}. Las proteínas p21 Ras se caracterizan por su capacidad de unir nucleótidos de guanina (GDP y GTP) y por poseer una actividad GTPasa intrínseca muy baja con relación a otras proteínas G^{6,7}. Su actividad biológica es controlada por un ciclo regulado de intercambio GDP/GTP, en el cual intervienen varios tipos de proteínas reguladoras: los factores que intercambian nucleótidos de guanina (GEFs) –que promueven la formación del estado activo unido al GTP–, y proteínas estimuladoras de la actividad GTPasa, denominadas GAPs; entre ellas se hallan p120-GAP y NF1-GAP, que dan lugar a un estado inactivo unido al GDP. Además de su función como regulador negativo, se considera que p120-GAP es un efector de Ras, de manera que su unión con Ras-GTP expone sitios a potenciales dianas efectoras en la región aminoterminal, y permite su interacción con ellas y la transmisión de la señal al núcleo⁶⁻⁹. La sustitución de un simple aminoácido en posición 12, 13 ó 61 origina proteínas Ras mutadas insensibles a la regulación negativa de las proteínas GAPs. En consecuencia, permanecen en un estado activo unido a GTP, y conducen a una activación constitutiva de Ras. Asimismo, la

regulación positiva de GEFs también puede provocar activación constitutiva de Ras en ausencia de mutaciones activadoras^{8,9}.

FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS RAS EN LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

Las proteínas p21Ras constituyen un punto de convergencia para muchas señales extracelulares y, a la vez, su activación puede conducir a diferentes vías de transducción de estas, que pueden ser independientes o estar interconectadas en diferentes puntos. Estas proteínas modulan la respuesta celular a varios mitógenos, factores de diferenciación o ambos, como factores de crecimiento, citocinas, hormonas, neurotransmisores, señales de adhesión celular, y a factores externos, como radiaciones ultravioletas y estrés osmótico^{7,8}.

La vía mejor caracterizada es la que involucra la activación de receptores de tirosina cinasa, los cuales son estimulados por ligandos extracelulares específicos, como los factores de crecimiento FGF, PDGF, NGF, EGF e insulina. Una vez unido al ligando, el receptor dimeriza y experimenta autofosforilación de residuos de tirosina en su dominio citoplasmático, y crea un sitio de unión fosfotirosil (dominio de unión SH2) para una proteína adaptadora (Shc o Grb2). Grb2 se une a motivos SH3 del extremo C-terminal de la proteína SOS (Son of Sevenless), que es un factor intercambiador de GDP/GTP (GEFs). Después de la estimulación con el ligando, el complejo Grb2/SOS se asocia con el receptor fosforilado a través del dominio SH2 de Grb2, y atrae la proteína SOS, asociada a este, hacia la membrana plasmática; allí estimula la formación de Ras-GTP, que releva su señal corriente abajo a través de una cascada de cinasas citoplasmáticas⁷⁻¹¹.

Las proteínas Ras, una vez activadas, pueden asociarse con cerca de una docena de blancos moleculares para ejercer sus efectos biológicos; la cinasa serina treonina Raf-1 es un efector clave de Ras en la vía de transducción de las señales mitogénicas. Ras interactúa con la porción aminoterminal de Raf-1 unido a la proteína 14-3-3, que es un cofactor esencial para la actividad de esta cinasa. Para lograr la completa activación de Raf-1, se requiere la formación escalonada de multicomplejos, en los que intervienen, además de la proteína 14-3-3, las chaperonas moleculares Hsp 90 y p50, fosfolípidos, las cinasas tirosina y serina treonina y la cinasa supresora de Ras (KSR)^{7,11,12}.

Una vez fosforilado Raf-1, activa dos cinasas MAPK, denominadas MEK1 y MEK2. Las MEKs activadas fosforilan un tándem de residuos treonina y tirosina en dos MAPKs, conocidas como cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1 y ERK2). Estas se traslocan al núcleo, donde fosforilan y activan una variedad de sustratos, que incluyen a miembros de la familia Ets (Elk-1) de factores de transcripción nuclear, los que se unen a sitios específicos de la región promotora de ciertos genes y estimulan su transcripción^{12,13}.

Otras dos clases de efectores de Ras han demostrado tener gran importancia *in vivo*: la subunidad catalítica p110 de la fosfatidil inositol-3cinasa (PI3K) y los factores de intercambio de activadores de Ral (Ral-GEFs), los cuales se unen a la misma región de Ras-GTP que Raf-1, en el dominio 32-40.^{8,10,12} Los miembros de la familia de GEFs (Ra1GDS, RGL y R1f /RGL 2) actúan como activadores de Ral. Estos activan la fosfolipasa D1 (PLD1) que mediante la hidrólisis de la fosfatidilcolina genera fosfátidos monoinsaturados y saturados, que son moléculas activadoras putativas de las proteínas Rho^{12,14,15}. RasGTP también puede unir y activar la subunidad catalítica de la enzima PI3K que genera $PI^{3-5}P_3$ por fosforilación de $PI^{4,5}P_2$ en posición 3. Este último funciona como un segundo mensajero; se une a algunas proteínas cinasas del citoesqueleto y modula su actividad. La cinasa serina-treonina PKB/AKT, que es otra enzima activada indirectamente por PI3K, inactiva por fosforilación a la proteína Bad, que es un factor proapoptótico^{14,15}. De esta manera, Ras puede inducir simultáneamente vías antiapoptóticas, en dependencia de la calidad e intensidad de la señal activadora, del tipo celular y de las condiciones metabólicas.

EXPRESIÓN DE P21 RAS EN TEJIDOS NORMALES

La existencia de varias isoformas en las proteínas Ras ha encaminado las investigaciones hacia estudios de expresión de estos genes en diferentes linajes celulares. Se ha podido conocer que se expresan en los mamíferos durante todo el período embrionario y fetal con un patrón diferencial. Durante el período prenatal, N-ras tiene su expresión más elevada hacia el día 30 de la

concepción, mientras que la expresión de Ki-ras2 disminuye hacia el final de la gestación. Se han obtenido evidencias de que Ki-ras2, y no Ha-ras o N-ras, es el que desempeña una función esencial en la embriogénesis temprana^{5,8}.

En los animales adultos, estos se expresan en una gran variedad de tejidos, y siguen un patrón de distribución específico. Se ha observado que determinados tejidos expresan preferentemente un tipo u otro de gen ras, aunque, probablemente, al menos uno de los tres genes se expresa en todos los tipos celulares^{5,16,17}.

EXPRESIÓN DE P21 RAS EN EL CÁNCER HUMANO

Los genes ras mutados se hallan presentes aproximadamente en el 30 % de todos los cánceres humanos. Estos pueden adquirir propiedades transformantes por mecanismos cualitativos –mutaciones puntuales– o cuantitativos, asociados a alteraciones de su expresión. Sin embargo, la frecuencia de mutaciones no es uniforme en relación con el tipo de tumor o el tipo de gen mutado. Se ha observado que, en tejidos tumorales, la expresión de p21 Ras no se halla restringida a un tipo celular específico, de forma tal, que pueden identificarse células tumorales de diferente origen que expresan niveles detectables de Ras, aunque con marcada heterogeneidad¹⁷.

Las mutaciones de los codones 12, 13 o 61 producen formas constitutivamente activadas de los tres genes ras *in vitro*; no obstante, existe una clara selectividad en relación con la isoforma de ras que está activada en los cánceres humanos. Las alteraciones del codón 12 en Ha-ras1 y Ki-ras2 y de los codones 13 y 61 en N-ras han sido informadas en numerosos estudios, y son más frecuentes las mutaciones detectadas del gen Ki-ras2 en carcinomas pancreáticos ($\approx 90\%$), colorrectales (50 %) y de pulmón (30 %)¹⁸⁻²². Las mutaciones de Ha-ras1 son comunes en carcinomas de vejiga, riñón y tiroides, y las de N-ras, en melanomas, carcinoma hepatocelular y neoplasias hematológicas²³⁻²⁵. En cambio, las mutaciones de estos genes son menos frecuentes en adenocarcinomas gástricos (14 %) y en los carcinomas de mama, ovario y cérvico-uterinos (< 5 %)²⁶⁻²⁸.

La frecuente asociación de mutaciones de ras con neoplasias humanas indica que las mismas son una importante lesión genética que podría promover la oncogénesis; existe un grupo importante de evidencias experimentales, en células en cultivo y en modelos de carcinogénesis *in vivo*, que demuestran que la función aberrante de ras puede contribuir significativamente a muchos aspectos del fenotipo maligno. Así, mientras esta función puede promover la proliferación incontrolada de algunas células tumorales, en otras puede inducir propiedades invasivas o metastásicas^{12,29}.

Varios estudios realizados en diferentes tipos de neoplasias indican que las mutaciones de Ki-ras2 ocurren tempranamente en el desarrollo de la carcinogénesis^{20,22}. Las mutaciones son necesarias, pero no suficientes; para la conversión de células normales a malignas se requiere, además de la mutación en sí misma, la acción combinada de otras lesiones genéticas que podrían incluir la función desregulada de otros componentes celulares o pérdida de función de genes supresores, entre otras³⁰⁻³².

Por otra parte, la sobreexpresión de productos génicos de ras normales ha sido encontrada en una alta proporción (mayor del 50%) en varios tipos de carcinomas: colon, páncreas, mama, próstata, pulmón, vejiga, estómago, tiroides y cáncer cérvico-uterino³³⁻³⁶.

Se ha demostrado que la expresión de p21 Ras se incrementa en relación con el grado de anormalidad histológica del tejido, de manera que es mayor en carcinomas invasivos y decrece gradualmente en carcinomas *in situ*, displasias, metaplasias e hiperplasias. Asimismo, los altos niveles de expresión de p21 Ras se correlacionan positivamente con el grado de extensión o invasión neoplásica³²⁻³⁶. No obstante, en varios estudios realizados se observan resultados contradictorios al correlacionar la expresión de Ras con los parámetros clínico-patológicos. En algunos cánceres no se ha observado asociación significativa entre estas variables, por lo que se considera que la sobreexpresión no tiene valor como marcador pronóstico, mientras que en otros está relacionada con estadios avanzados de la enfermedad, recurrencia temprana y muerte. Estas discrepancias no están claras, pero podrían estar relacionadas con diferencias en los métodos de detección de Ras, con el tipo de anticuerpo Anti-Ras utilizado o ambos^{36,37}.

Finalmente, podemos concluir que la carcinogénesis es un proceso multifactorial que se desarrolla en varias etapas, donde la activación de los genes ras constituye un punto de unión en la cadena de fenómenos que determina la transformación neoplásica. En este sentido, el conocimiento de las

bases moleculares y bioquímicas de la función de las proteínas p21 Ras está siendo aplicado en el desarrollo de nuevas terapias anticancerosas que están dirigidas hacia blancos moleculares que se encuentran en puntos críticos de la cascada de señalización de Ras. Estas drogas Anti-Ras, junto al desarrollo de vacunas específicas y la quimioterapia convencional, permitirán utilizar combinaciones de fármacos más racionales y efectivos en el tratamiento del cáncer.

Summary

The Ras genes belong to a gene superfamily that codify small guanine nucleotide union proteins. These p21 Ras proteins are localized on the internal surface of the cellular membrane where they act as binary molecular interrupters in signalization pathways that influence cellular growth, differentiation and apoptosis. The Ras genes can acquire transforming properties through quantitative or qualitative mechanisms. The Ras oncogenic activation is one of the most frequently involved activations in the development of both human and experimental tumors. The c-Ki-ras, c-Ha-ras and c-N-ras mutations have been detected in the 30 % of human cancers, and the overexpression in more than 50 %. These alterations generally occur at an early stage of tumoral growth. Due to its important rol in carcinogenesis, the knowledge about the molecular and biochemical bases of the p21 Ras proteins is being used in the development of new therapies against cancer.

Referencias bibliográficas

1. Sarasin A. An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Ras*. 2003;544(2-3):99-106.
2. Prover DA. Growth regulation by oncogenes-new insights from model organisms. *Curr Opin Genet*. 2001;11:19-26.
3. Reuther G, Der C. The Ras branch of small GTPases family members don't fall far from the tree. *Curr Opin Cell Biol*. 2000;2(1):57-165.
4. Ehrhardt A, Ehrhardt G, Guo X, Schrader J. Ras and relatives job sharing and networking keep an old family together. *Exp Hematol*. 2002;30(10):1089.
5. Bar-Sagi D. A Ras by any other name. *Mol Cell Biol*. 2001;21(5):1441-3.
6. Macaluso M, Russo G, Cinti C, Bazan V, Gebbia N, Russo A. Ras family genes: an interesting link between cell cycle and cancer. *J Cell Physiol*. 2002;192(2):125-30.
7. Walker SA, Lockyer PJ. Visualizing Ras signalling in real time. *J Cell Sci*. 2004;15:117(Pt 14):2879-86.
8. Quilliam LA, Rebhun JF, Castro AF. A growing family of guanine nucleotide exchange factors is responsible for activation of Ras family GTPases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2002;71:391-444.
9. Bernards A, Settleman J. GAPs in growth factor signalling. *Growth Factor*. 2005;23(2):143-9.
10. Ayllon V, Rebollo A. Ras induced cellular events. *Mol Membr Biol*. 2000;17(2):65-73.
11. Duncan T, Chen JM, Friedman FK, Hyde M, Chie L, Pincus MR. Comparison of molecular dynamics averaged structures for complexes of normal and oncogenic ras p21 with SOS nucleotide exchange protein, containing computed conformations for the three crystallographically undefined domains, suggests a potential role of these domains in ras signalling. *Protein J*. 2004;23(3):217-8.
12. Giehl K. Oncogenic Ras in tumor progression and metastasis. *Biol Chem*. 2005;386(3):193-205.
13. Herrera R, Sebolt-Leopold JS. Unravelling the complexities of the Raf/MAP kinase pathway for pharmacological intervention. *Trends Mol Med*. 2002;8(4):S27-31.
14. Gupta S, Platner R, Der CJ, Stanbrigdge EJ. Dissertation of Ras-dependent signaling pathway controlling aggressive tumor growth on human fibrosarcoma cells. Evidence for a potencial novel pathway. *Mol Cell Biol*. 2000;20(24):9294-306.
15. Bal de Kier JE, Adam A. Transformación celular y mecanismos de sobrevivida regulados por la GTPasa Ra1. *Medicina (Buenos Aires)*. 2000;61(5):658-63.

16. Lim HL, Counter CM. Reduction in the requirement of oncogenic Ras signalling to activation of PI3K/AKT pathway during tumor maintenance. *Cancer Cell*. 200;8(5):381-92.
17. Chesa PG, Retting WJ, Melamed MR, Old LLJ, Niman HL. Expression of p21 Ras in normal and malignant tissues. Lack of association with proliferation and malignancy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84:3234-8.
18. Minamoto T, Mai M, Ronai Z. K-ras mutation: early detection in molecular diagnosis and risk assessment of colorectal, pancreas and lung cancers. A review. *Cancer Detect Prev*. 2000;24(1):1-12.
19. Kusaka T, Fukui H, Ueda Y, Chiba T, Fujimori T. Analysis of K-ras codon 12 mutations and p53 overexpression in colorectal nodule-aggregating tumors. *J Gastr Hepatol*. 2001;15(10):1155-7.
20. Lohr M, Kloppel G, Maissonneuve P, Lowenfels AB, Luttges J. Frequency of Kras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis. *Neoplasia*. 2005;7(1):17-23.
21. Uemura K, Hiyama E, Murakami Y, Karehiro T, Ohge H, Sueda T, et al. Comparative analysis of K-ras point mutation telomerase activity and p53 overexpression in pancreatic tumours. *Oncol Rep*. 2003;10(2):277-83.
22. Keohavong P, Mady HH, Gao WM, Siegfried JM, Luketich JD, Melhem MF. Topographic analysis of K-ras mutations in histologically normal lung tissues and tumours of lung cancer patients. *Br J Cancer*. 2001;85(2):235-41.
23. Oxford G, Theodorescu D. The role of Ras superfamily protein in bladder cancer progression. *J Urol*. 2003;170(5):1987-93.
24. Tejido SA, Martínez P, Sánchez CH, Piedra Lara JD, Capitán MC, Ramos GP, et al. Expresión de la proteína p21 Ras en el adenocarcinoma renal localmente confinado y sus implicaciones pronósticas. *Actas Urol Esp*. 2002;26(6):408-12.
25. Nikiforov YE. Genetic alterations involved in the transition from well differentiated to poorly differentiated and anaplastic thyroid carcinomas. *Endocr Pathol*. 2004;15(4):319-27.
26. Yoo J, Park SY, Robinson RA, Kang SJ, Ahn WS, Kang CS. Ras gene mutation and expression of Ras signal transduction mediator in gastric adenocarcinomas. *Arch Pathol Lab Med*. 2002;126(9):1096-100.
27. Schondorf T, Andrack A, Niederacher D, Scharl A, Becker M, Engel H, et al. H-ras gene amplification or mutation is not common in human primary breast cancer. *Oncol Rep*. 1999;6(5):1029-33.
28. Von Lintig FC, Dreilinger AD, Varki NM, Wallace AM, Casteel DE, Boss GR. Ras activation in human breast cancer. *Brest Cancer Trest*. 2000;62(1):51-62.
29. Pollock CB, Shirasawa S, Sasazuki T, Kolch W, Dhillon AS. Oncogenic K ras is required to maintain changes in cytoskeletal organization, adhesion and motility in colon cancer cells. *Cancer Res*. 2005;65(4):1244-50.
30. Pajkos G, Kiss L, Sandor J, Ember I, Kishazi P. The prognostic value of the presence of mutations at the codons 12, 13, 61 of K-ras oncogene in colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2000;20:1695-2001.
31. Minamoto T, Ougolkov AV, Mai M. Detection of oncogenes in the diagnosis of cancer with active oncogenic signaling. *Expert Rev Mol Diagn*. 2002;2(6):565-75.
32. Inoue S, Tezel E, Nakao A. Molecular diagnosis of pancreatic cancer. *Hepatogastroenterology*. 2001;48(40):933-8.
33. Varkondi E, Gyory F, Nagy A, Kiss I, Ember I, Kozma L. Oncogene amplification and overexpression of oncoprotein in thyroid papillary cancer. *In vivo*. 2005;19(2):465-70.
34. Mascaux C, Iannino N, Matin B, Paesmans M, Berghmans T, Dusart M, et al. The role of Ras oncogene in survival of patient with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer*. 2005;17(92):131-9.
35. Mamas IN, Zafiropoulos A, Spandidos DA. Involvement of the ras genes in female genital tract cancer. *Int J Oncol*. 2005;26(5):1241-55.
36. Malaney S, Daly RJ. The Ras signaling pathway in mammary tumorigenesis and metastasis. *J Mam Gland Biol Neoplasia*. 2001;6(1):101-13.
37. Przybojewska B, Rydrynski K, Stepnik M, Jakubiak M, Kozak J, Szymezak W. Immunohistochemical evaluation of p21 ras and p53 proteins expression in human non small cell lung cancers. *Neoplasma*. 2003;50(3):198-203.