CAROLINA MARIA GOMES CANI

Análise da expressão dos genes *PROP1* e *CTNNB1* em
craniofaringiomas adamantinomatosos com e sem
mutação somática no *CTNNB1*

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Berenice Bilharinho de
Mendonça

Co-orientadora: Dra. Luciani Renata Silveira de
Carvalho

São Paulo

2010

CAROLINA MARIA GOMES CANI

Análise da expressão dos genes *PROP1* e *CTNNB1* em
craniofaringiomas adamantinomatosos com e sem
mutação somática no *CTNNB1*

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Berenice Bilharinho de
Mendonça

Co-orientadora: Dra. Luciani Renata Silveira de
Carvalho

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Cani, Carolina Maria Gomes

Análise da expressão dos genes *PROPI* e *CTNNB1* em craniofaringiomas
adamantinomatosos com e sem mutação somática no *CTNNB1* / Carolina Maria Gomes
Cani. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Berenice Bilharinho de Mendonça.

Co-orientadora: Luciani Renata Silveira de Carvalho.

Descritores: 1.Craniofaringioma adamantinomatoso 2.Beta catenina 3.Expressão
gênica 4.Mutação de sentido incorreto 5.Proteínas de homeodomínio/genética 6.Sela
túrcica/patologia 7.Fator de transcrição PIT-1/genética

USP/FM/DBD-334/10

Este trabalho foi realizado na Unidade Endocrinologia do Desenvolvimento e no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM 42 da disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): Projeto Temático 05/04726-0; 06/00244-3 e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) 301339/2008-09.

Dedicatória

Aos meus pais, minha irmã e meu
marido dedico esta tese, a realização
de um sonho.

Agradecimientos

A realização de um sonho? Não. A conclusão desta tese significa muito mais do que isso. A realização de uma meta, a conclusão de uma etapa, de um capítulo cuja estória venho escrevendo há algum tempo, dedicadamente. Desde as incansáveis tardes quentes, debruçada nas bancadas do anatômico, até as melancólicas tardes frias, sentada à frente das bancadas do laboratório de hormônios, foram muitas superações... E cada uma delas me trouxe até aqui. Muitos personagens fizeram parte dessa estória, contribuindo para minhas conquistas, cada um ao seu modo. Penso que não haveria melhor momento do que este, para agradecer a todos.

Aos meus pais, Pedro e Marilza, agradeço por simplesmente tudo. Por acreditarem em mim, por me apoiarem, pelo amor. Pai, agradeço a sua força. Mãe, agradeço a sua alegria. Obrigada por me trazerem até aqui!

À minha irmã, Catarina, por ser minha companheira, sempre presente e prestativa. Cata, obrigada por ser a minha amiga.

Ao meu marido, Alessandro, agradeço o amor incondicional, a paciência, a compreensão. Amor, agradeço por você ter estado ao meu lado, me apoiando, dando suporte às minhas escolhas, fazendo os meus dias mais felizes.

Aos demais familiares, pela admiração, torcida e momentos de união e alegria, que fazem compensar qualquer esforço.

À minha orientadora, Profa. Dra. Berenice, por acreditar em mim. Dra. Berenice, obrigada não apenas pelo conhecimento científico que tive a oportunidade de obter com a senhora, mas principalmente por ter tido a

felicidade de conviver com seu exemplo de pessoa e acima de tudo, de médica, o que certamente foi um marco no meu desenvolvimento profissional.

À minha co-orientadora, Dra. Luciani, por ter me acalentado nos momentos de maior preocupação e angústia.

Ao neurocirurgião Dr. Hamilton Matushita pela gentileza em coletar e ceder as amostras de tecido de craniofaringiomas para realização desse trabalho.

Ao Dr. Alexander, pela contribuição no meu aprendizado clínico e científico, pelas discussões acadêmicas acaloradas, e pelos momentos de descontração e conversas alegres, regadas a um bom café!

Ao Dr. Ivo, Dra. Ana Cláudia, Dra. Tânia e Dra. Elaine, pelos comentários e sugestões sempre pertinentes e pelos ensinamentos valiosos no ambulatório.

Ao Dr. Vinícius pela amizade, pelos ensinamentos e pela maneira leve e descontraída que tornava os ambulatórios de quarta-feira mais prazerosos.

À Dra. Mirta pelo acolhimento amigo e incentivo inicial a continuar esse projeto.

À minha amiga Luciana Brito, pelo companheirismo, pela amizade, pela busca incessante pelo “melhor possível”, por ser sempre tão prestativa. Lu, obrigada também pelos momentos de descontração, pelas conversas e

risadas, por ter facilitado essa jornada e ter contribuído para que eu conseguisse chegar até o fim.

Ao Madson, por ter me ensinado a técnica de PCR em tempo real, e pela companhia animada no ambulatório.

Ao Frederico, por ter me apresentado à Dra. Berenice.

À Cidinha, pelos ensinamentos nas aulas de pipetagem e por prontamente providenciar a compra de *primers*, ensaios, e todos reagentes necessários para realização desse trabalho.

À Mirian, por me ensinar as bases da biologia molecular, sempre disposta a me ajuda a solucionar problemas.

À Emília, pela amizade, conversas descontraídas e eficiência na realização dos sequenciamentos.

À Mariana, por realizar os sequenciamentos.

Às secretárias Nilda, Cris e Ana por sempre estarem disponíveis e prestativas, facilitando sempre nossa vida em meio a tanta papelada e burocracia.

À Fran, por sua eficiência na organização dos materiais usados na bancada e por providenciar o famoso cafezinho na hora do lanche.

À Cris Rossi, sempre pronta a aliquotar as amostras de DNA o mais rápido possível.

Aos demais amigos do LIM 42, Alexsandra, Ana Paula, Andréia, Antônio, Beatriz, Camila, Catarina, Débora, Ericka, Everlayny, Karina, Larissa, Letícia, Luciana Montenegro, Maíra, Marcela, Maria Estela, Marisa, Milena, Patrícia, Priscila, Regina, Rocio, Tamaya, Viviani, agradeço o clima de amizade, descontração, solidariedade e alegria que fazem do LIM 42 um local de trabalho agradável e prazeroso.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho, mas que por um descuido deixaram de ser citados.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado do *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de siglas

Resumo

Abstract

Introdução.....	1
1.1. __O gene <i>CTNNB1</i>	6
1.2. __O gene <i>PROP1</i>	7
1.3. __ <i>CTNNB1</i> e câncer.....	8
1.4. __ <i>PROP1</i> e mutações inativadoras.....	14
2. __Objetivos.....	18
3. __Métodos.....	19
3.1. Considerações Éticas.....	19
3.2. Casuística.....	19
3.3. Extração de RNA.....	20
3.4. Transcrição Reversa.....	21
3.5. PCR.....	22
3.6. Análise in siico das variantes alélicas identificadas.....	23
3.7. Estudo da expressão por PCR em tempo real.....	23

3.8. Validação do método $2^{-\Delta\Delta CT}$	25
3.9. Escolha dos genes endógenos	29
3.10. Análise estatística	31
4. Resultados	32
4.1. Sequenciamento	32
4.2. PCR em tempo real	34
4.2.1. Gene <i>CTNNB1</i>	34
4.2.2. Gene <i>PROP1</i>	36
5. Discussão	37
6. Conclusões	41
7. Referências	42

Lista de figuras

Figura 1 - Via de sinalização WNT.....	4
Figura 2 - A: RNM do paciente com mutação inativadora do <i>PROP1</i> . Painéis superiores aos 8 anos de idade com aumento hipofisário e hiperssinal em T1. Painéis inferiores aos 15 anos com redução hipofisária;	
B: RNM de pacientes com craniofaringioma, evidenciando o hiperssinal em T1.....	17
Gráfico 1 - Curva-padrão de amplificação do gene endógeno <i>CYC</i>	27
Gráfico 2 - Curva-padrão de amplificação do gene alvo <i>PROP1</i>	27
Gráfico 3 - Experimento de validação do método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Validação para os genes alvo <i>PROP1</i> e endógeno <i>CYC</i>	28
Gráfico 4 - Valores de estabilidade da expressão (<i>M</i>) dos genes endógenos.....	31
Gráfico 5 - Expressão do <i>CTNNB1</i> por PCR em tempo real em craniofaringiomas adamantinomatosos com e sem mutação no <i>CTNNB1</i> , em relação ao <i>pool</i> de hipófise normal.....	35

Lista de tabelas

Tabela 1 – Mutações somáticas no exon 3 do <i>CTNNB1</i> em craniofaringiomas adamantinomatosos, descritas na literatura.....	10
Tabela 2 – Frequência de mutação somática no exon 3 do <i>CTNNB1</i> em diversos tumores.....	13
Tabela 3 - Genes alvo ¹ e endógenos ² estudados por PCR em tempo real.....	30
Tabela 4 - Análise do exon 3 do <i>CTNNB1</i> em pacientes com craniofaringiomas adamantinomatosos.....	33

Lista de abreviaturas

del deleção

Dr. Doutor

et al. e outros

Log logaritmo

Lista de símbolos

μL	microlitros
μmol	micromol
mg	miligramas
mL	mililitros
mmol	milimol
n	número
ng	nanogramas
ng/mL	nanogramas por microlitros
nº	número
°C	graus Celsius
pH	potencial hidrogeniônico
pmol	picomol
s	segundos
U	unidades
x g	vezes a gravidade
=	igual
<	menor que
$\geq$	maior ou igual
$\pm$	mais ou menos
%	porcentagem

Lista de siglas

A	adenina
ACTH	hormônio adrenocorticotrófico
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
Asp	ácido aspártico
C	citosina
CA	Califórnia
CAPPesq	Comissão de ética para análise de projetos de pesquisa
CCD	dispositivo de carga acoplada
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
C _T	<i>threshold cycle</i>
CTNNB1	Beta-catenina (β-catenina)
CYC	ciclofilina A
Cys	cisteína
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	trifosfato de nucleotídeo
dsh	<i>dishevelled</i>
F	feminino
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
G	guanina
GH	hormônio do crescimento
GSK 3β	quinase glicogênio sintase 3β

HESX1	<i>Homeobox gene expressed in ES cells</i>
Ile	isoleucina
KCl	cloreto de potássio
HPRT	hipoxantina ribosil transferase
LEF	<i>lymphoid enhancer factor</i>
LRP	<i>low-density-lipoprotein receptor-related protein</i>
M	masculino
MgCl ₂	cloreto de magnésio
OH	Ohio
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase
PGK1	fosfoglicerato quinase 1
Phe	fenilalanina
PIT1	<i>Pituitary-specific transcription factor 1</i>
Pro	prolina
PROP1	<i>Prophet of PIT1</i>
R ²	coeficiente de correlação
RNA	ácido ribonucléico
RNM	ressonância nuclear magnética
SDS	sistema de detecção de sequências

Ser	serina
SSCP	<i>single strand conformation polymorphism</i>
T	timina
TCF	<i>T cell factor</i>
Thr	treonina
Tris-HCl	hidrocloro de tris-hidroximetil-aminometano
TSH	hormônio tireotrófico
TX	Texas
USA	Estados Unidos da América
Val	valina
WNT	<i>Wingless</i>
y	inclinação da curva

Resumo

Cani CMG. *Análise da expressão dos genes PROP1 e CTNNB1 em craniofaringiomas adamantinomatosos com e sem mutação somática no CTNNB1* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 85p.

Os craniofaringiomas são os tumores mais frequentes da região hipotálamo-hipofisária na faixa etária pediátrica. Apesar de serem histologicamente benignos, sua tendência infiltrativa e seu comportamento agressivo resultam em significativa morbimortalidade. Histologicamente podem ser divididos em dois subtipos: adamantinomatosos e papilíferos. A patogênese dos craniofaringiomas é pouco compreendida. Mutações no gene *CTNNB1*, que codifica a proteína β -catenina, são a única alteração molecular conhecida até o momento implicada na tumorigênese dos craniofaringiomas adamantinomatosos. Tais mutações afetam o sítio de degradação da β -catenina, que passa a se acumular no citoplasma e no núcleo, ativando excessivamente a via de sinalização WNT, através da ligação aos fatores de transcrição da família LEF/TCF, levando a tumorigênese. Recentemente foi descoberto um novo mecanismo de determinação da linhagem celular hipofisária regulado pela β -catenina, através do qual ela interage diretamente com o PROP1 para determinar a diferenciação celular hipofisária. De acordo com esse modelo, o complexo protéico PROP1/ β -catenina atua simultaneamente como repressor do *HESX1* e ativador do *PIT1*, dependendo dos co-fatores associados. Pacientes com mutações germinativas inativadoras no *PROP1* desenvolvem hipopituitarismo e podem

apresentar aumento hipofisário com imagens de ressonância nuclear magnética (RNM) da região selar muitas vezes semelhantes às daquelas dos craniofaringiomas, com hiperssinal em T1. Por outro lado, camundongos com expressão persistente do *Prop1* exibem defeitos na regulação da proliferação celular hipofisária, incluindo cistos da bolsa de Rathke, hiperplasia adenomatosa e tumores, sugerindo que mutações com ganho de função no *PROP1* também poderiam contribuir para a patogênese de tumores hipofisários em seres humanos. A semelhança entre as imagens de RNM dos pacientes com craniofaringiomas e daqueles com aumento hipofisário devido a mutações inativadoras no *PROP1*, e o fato de que camundongos transgênicos com expressão persistente do *Prop1* apresentam aumento da susceptibilidade a tumores hipofisários, deram base a nossa hipótese de que uma desregulação na expressão do *PROP1* em humanos poderia estar envolvida na patogênese dos craniofaringiomas adamantinomatosos. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a presença de mutação somática no exon 3 do *CTNNB1* e avaliar a expressão desse gene e do gene *PROP1* em craniofaringiomas adamantinomatosos. Foram obtidas 14 amostras desse tipo de tumor por meio da ressecção terapêutica. As amostras foram submetidas à extração do RNA e posterior transcrição reversa para obtenção de cDNA. A partir do cDNA foi realizada PCR e sequenciamento do exon 3 do *CTNNB1* em todas as amostras. Porém, a avaliação por PCR em tempo real foi realizada apenas em 12 amostras, devido à qualidade inadequada de 2 amostras para submissão a essa metodologia. Foram encontradas mutações *missense*, em heterozigose em 9

das 14 amostras, sendo 5 previamente descritas e 2 ainda não descritas em craniofaringiomas adamantinomatosos. Hiperexpressão do *CTNNB1* foi encontrada em 7 amostras, sendo 5 com mutação e 2 sem mutação no *CTNNB1*. A hiperexpressão variou de 2,5 a 6,2 vezes maior que o *pool* de hipófise normal. Contudo, a expressão do *PROP1* foi indetectável em todas as amostras. Concluimos que o aumento da expressão do *CTNNB1* presente em 58% das amostras sugere o envolvimento também da hiperexpressão desse gene na etiopatogenia do craniofaringioma adamantinoso, enquanto a ausência de expressão do *PROP1* afasta a participação desse gene na etiopatogenia do craniofaringioma adamantinoso.

Descritores: 1. Craniofaringioma adamantinoso, 2. Beta catenina, 3. Expressão gênica, 4. Mutação de sentido incorreto, 5. Proteínas de homeodomínio/genética, 6. Sela túrcica/patologia, 7. Fator de transcrição PIT-1/genética.

Abstract

Cani CMG. *Analysis of PROP1 and CTNNB1 expression genes in adamantinomatous craniopharyngiomas with and without CTNNB1 somatic mutation* [thesis]. Sao Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2010. 85p.

Craniopharyngiomas are the the commonest tumors to involve the hypothalamo-pituitary regions in childhood population. Histologically they are benign, and can be divided in two primary subtypes: the adamantinomatous and the papillary. Although histologically benign, their infiltrative tendency and aggressive behavior can result in great morbidity. The pathogenesis of craniopharyngiomas is poorly understood. To date, β -catenin gene (*CTNNB1*) mutations have been identified only in the adamantinomatous subtype. These mutations affect the degradation target box of β -catenin that accumulates in the cytoplasm and the nucleus increasing the transcriptional activity of WNT pathway through interaction with the transcription factors of LEF/TCF family, leading to tumorigenesis. Recently, an interaction between β -catenin and PROP1 was described as a new mechanism for β -catenin-dependent regulation of pituitary cell-lineage determination. According to this novel model, the PROP1/ β -catenin proteic complex would act as a binary switch to simultaneously repress the transcription factor *HESX1* and to activate expression of transcription factor *PIT1*, depending on the associated cofactors. Patients with loss-of-function mutations in *PROP1* present combined pituitary hormonal deficiency generally associated with pituitary enlargement and the magnetic resonance imaging (MRI) of the sellar region in these patients sometimes resembles that of the craniopharyngiomas, with T1 hyperintense signal. On the other hand, transgenic mice with persistent *Prop1* expression exhibit defects consistent with misregulation of pituitary cell proliferation, including adenomatous hyperplasia with formation of Rathke's cleft cysts and tumors suggesting that misregulation of *PROP1* expression in human could contribute to pathogenesis of pituitary tumors. The similarity between the MRI images of craniopharyngiomas patients and that of patients

with loss-of-function mutations in *PROP1*, associated with the fact that transgenic mice with persistent *Prop1* expression exhibit increased susceptibility to pituitary tumors gave rise to our hypothesis that a misregulation of *PROP1* expression could be involved in the pathogenesis of adamantinomatous craniopharyngiomas. The aim of this study was to analyze the presence of somatic mutations in exon 3 of *CTNNB1* and the expression pattern of this gene and the *PROP1* gene in adamantinomatous craniopharyngiomas. Fourteen samples were obtained from therapeutic surgery and submitted to RNA extraction and reverse transcription in order to produce the cDNA. The cDNA was used as a template to *CTNNB1* exon 3 PCR reaction followed by direct sequencing of all samples. However, the real-time RT-PCR analysis was realized only in 12 samples, since 2 of them had an insufficient quality for this method. Missence, heterozygous mutations were found in 9 out of 14 samples; five were previously described and 2 not yet described in adamantinomatous craniopharyngiomas. Overexpression of *CTNNB1* was found in 7 samples, which them 5 with *CTNNB1* mutation 2 whitout. The overexpression ranged from 2.5 to 6.2 fold more than pituitary normal pool. However, the *PROP1* expression was undetectable in all the samples. We could conclude that the amount of 58% *CTNNB1* overexpressed samples suggest also a role of this overexpression in the pathogenesis of adamantinomatous craniopharingiomas, while the undetectable levels of *PROP1* exclude a role of this gene in the pathogenesis of adamantinomatous craniopharingiomas.

Descriptors: 1. Adamantinomatous craniopharyngioma, 2. Beta catenin, 3. Gene expression, 4. Mutation missense, 5. Homeodomain proteins/genetics, 6. Sella turcica/pathology, 7. Transcription factor PIT-1/genetics.

Introdução

Os craniofaringiomas são tumores raros localizados na região intra/supraselar. Correspondem a 10% de todos os tumores intracranianos pediátricos, sendo os mais comuns da região hipotálamo-hipofisária nessa população (1). São tumores epiteliais que crescem ao longo do ducto craniofaríngeo, canal que conecta o ectoderma oral com a bolsa de Rathke (2). Apesar de sua histologia benigna, sua tendência infiltrativa e seu comportamento agressivo resultam em significativa morbimortalidade. O comprometimento da hipófise e das estruturas neuronais adjacentes pelo tumor primário e/ou recorrente, ou pelas intervenções terapêuticas, gera complicações endócrinas, visuais, hipotalâmicas, e muitas vezes sequelas cognitivas que comprometem significativamente a qualidade de vida. Ao diagnóstico, a frequência do déficit hormonal varia de 35-95% para GH, 38-82% para gonadotrofinas, 21-62% para ACTH, 21-42% para TSH e 6-38% para diabetes insipidus (2). A associação de mais de um déficit pode estar presente em 85% dos pacientes (3). Histologicamente os craniofaringiomas podem ser divididos em dois subtipos: adamantinomatosos e papilíferos, com histogênese distinta, sendo o primeiro originado de restos de células escamosas do ducto craniofaríngeo (4), e o segundo de metaplasia das células adeno-hipofisárias (5). O subtipo adamantinomatoso é o mais comum, predominando nas duas primeiras décadas de vida, mas podendo ocorrer em qualquer idade; o subtipo papilífero tem sido descrito quase que exclusivamente em adultos (6).

A patogênese dos craniofaringiomas é pouco compreendida. Mutações no gene *CTNNB1*, que codifica a proteína β -catenina, são a única

alteração molecular conhecida até o momento implicada na tumorigênese dos craniofaringiomas. A β -catenina possui dois papéis fundamentais. Na membrana plasmática ela se associa a moléculas de adesão do tipo caderinas formando complexos que por sua vez se ligam aos feixes de actina do citoesqueleto nas junções de aderência célula-célula. A presença da β -catenina nessas junções é fundamental para assegurar uma adequada adesão intercelular (7). Além do seu papel estrutural, a β -catenina atua também como um componente da cascata de sinalização da via WNT, altamente conservada entre as espécies, que regula a proliferação, a morfologia, a mobilidade e o destino celular, bem como a formação axial e a organogênese (8).

De acordo com o modelo canônico de sinalização da β -catenina, ligantes da ampla família de proteínas WNT, ricas em cisteína, se ligam a receptores de membrana formados pela associação de uma proteína do tipo *frizzled* com as proteínas 5 e 6 relacionadas ao receptor da lipoproteína de baixa densidade (*low-density-lipoprotein receptor-related protein*: LRP 5/6). Na ausência do ligante WNT, a β -catenina é fosforilada pela caseína quinase 1 na serina da posição 45. Essa fosforilação por sua vez possibilita que a β -catenina seja subsequentemente fosforilada pela glicogênio sintase 3 β (GSK-3 β) – uma quinase serina/treonina – nos aminoácidos das posições 41 (treonina), 37 (serina) e 33 (serina). A fosforilação desses dois últimos aminoácidos desencadeia a ubiquitinação da β -catenina e sua consequente degradação no proteossomo, resultando em baixos níveis dessa proteína no citoplasma (9, 10). O processo de fosforilação ocorre com a β -catenina

associada a um complexo multiprotéico contendo as proteínas Axina, e/ou sua homóloga Axina2/conductina, e APC (produto do gene supressor tumoral *APC – adenomatous polyposis coli*), além da GSK-3 β . Quando o ligante WNT se acopla ao receptor, o complexo multiprotéico se desfaz por meio da destruição da Axina, que é um componente essencial desse complexo (9). Na ausência do mesmo, a β -catenina deixa de ser degradada e se acumula no citoplasma, entrando então no núcleo, aonde vai se ligar aos fatores de transcrição da família LEF/TCF (*lymphoid enhancer factor/T cell factor*), estimulando a expressão de vários genes alvo tais como genes envolvidos na proliferação e diferenciação celulares, bem como na progressão tumoral (Figura 1) (10, 11).

Figura 1. Via de sinalização WNT. Quando o ligante WNT se acopla ao receptor desencadeia a ativação da via: a proteína *dishevelled* (dsh) bloqueia a degradação da β -catenina, que entra no núcleo e ativa a transcrição dos genes alvo. Na ausência do ligante a via é inativada através da fosforilação da β -catenina pela GSK3 β , o que desencadeia sua ubiquitinação pela β TrCP e degradação no proteossomo.

Recentemente foi descoberto um novo mecanismo de determinação da linhagem celular hipofisária regulado pela β -catenina. Ao invés de se ligar aos fatores de transcrição da família LEF/TCF, como ocorre na via canônica de sinalização WNT, a β -catenina interage diretamente com o PROP1 para determinar a diferenciação celular hipofisária. De acordo com esse modelo, admite-se que o complexo protéico PROP1/ β -catenina atue simultaneamente como repressor do *HESX1* e ativador do *PIT1*, dependendo dos co-fatores associados (12). O PROP1 é um fator de transcrição específico da hipófise do tipo *paired-like homeodomain*, assim denominado devido a sua homologia com a proteína da *Drosophila* descrita primeiramente. O HESX1 e PIT1 são fatores de transcrição envolvidos no desenvolvimento hipofisário cujas expressões obedecem a uma ordem tempo-espacial fundamental para a adequada diferenciação das linhagens celulares hipofisárias. O HESX1 é um repressor transcricional do tipo *paired-like homeodomain*, enquanto o PIT1 é um membro da família de fatores de transcrição POU *domain* (13).

Pacientes com mutações germinativas inativadoras no *PROP1* podem apresentar aumento hipofisário com imagens de ressonância nuclear magnética (RNM) da região selar muitas vezes semelhantes àsquelas dos craniofaringiomas, com hiperssinal em T1 (Figura 2). Por outro lado, camundongos com expressão persistente do *Prop1* exibem defeitos na regulação da proliferação celular hipofisária, incluindo cistos da bolsa de Rathke, hiperplasia adenomatosa e tumores, sugerindo que mutações com

ganho de função no *PROP1* também poderiam contribuir para a patogênese de tumores hipofisários em seres humanos (14).

A semelhança entre as imagens de RNM dos pacientes com craniofaringiomas e daqueles com aumento hipofisário devido a mutações inativadoras no *PROP1*, o fato de que camundongos transgênicos com expressão persistente do *Prop1* apresentam aumento da susceptibilidade a tumores hipofisários, e o fato de que a β -catenina – única proteína envolvida até o momento com a patogênese dos craniofaringiomas adamantinomatosos – interage com o *PROP1* para controlar a determinação da linhagem celular hipofisária deram base a nossa hipótese de que uma desregulação na expressão do *PROP1* em humanos poderia estar envolvida na patogênese dos craniofaringiomas adamantinomatosos.

1.1. O gene *CTNNB1*

O gene *CTNNB1* (ENSG00000168036) está localizado no braço curto do cromossomo 3 na posição 22-21.3 (3p 22-21.3); possui 15 exons e codifica uma proteína de 781 aminoácidos que possui uma região de repetição em *tandem* de 40 aminoácidos, que formam doze repetições da chamada região *armadillo*, primeiramente identificada na *Drosophila*, nas quais se ligam os fatores de transcrição que interagem com a β -catenina, bem como o APC e a Axina/conductina, de uma maneira mutuamente exclusiva (15). A estrutura cristalográfica da região *armadillo* é uma super-

hélice, semelhante a uma haste, formada de α -hélices (16). A porção amino-terminal da β -catenina possui os resíduos de serina e treonina relacionados à degradação dessa proteína.

1.2. O gene *PROP1*

O gene *PROP1* (ENSG00000175325) pertence à classe *homeobox* e está localizado no braço longo do cromossomo 5, posição 35.3 (5q 35.3); possui três exons e codifica uma proteína de 226 aminoácidos. O *homeobox* é uma sequência altamente conservada de DNA, com cerca de 180 pares de base. As proteínas codificadas por genes *homeobox* possuem um domínio de ligação de 60 aminoácidos, chamado *homeodomain*, através do qual a proteína se liga ao DNA dos genes alvo. O *homeodomain* é formado por três hélices, sendo a terceira especialmente importante para o reconhecimento do DNA (17). Fatores de transcrição do tipo *paired-like homeodomain* podem se ligar monomericamente a um *motif* TAAT isolado e dimericamente a uma sequência palindrômica contendo esse mesmo *motif* invertido, separado por três nucleotídeos (TAATTGAATTA) (18). Estudo recente mostrou através de ensaios de transfecção que o PROP1 quando ligado dimericamente ao DNA é capaz de ativar a transcrição. Porém, a ligação monomérica não teve efeito sobre a expressão gênica. Contudo não se pode negar a possibilidade de que a ligação monomérica possa modular a expressão gênica quando em conjunto com outros fatores que se ligam a sítios justapostos e/ou distantes

do sítio de ligação do PROP1 ao promotor (17). De fato, complexos proteína-proteína, formados pela interação entre fatores, podem controlar a expressão gênica de maneira tempo-espacial (12). Foi demonstrado ainda, que a porção carboxi-terminal do PROP1 possui potentes domínios de ativação transcricional, enquanto que a porção amino-terminal tem atividade repressora, sugerindo que o PROP1 possa funcionar tanto como ativador quanto como repressor transcricional (19, 20).

1.3. *CTNNB1* e câncer

Mutações no *CTNNB1* têm sido implicadas em vários tipos de câncer. Todas são localizadas no exon 3 do *CTNNB1* e afetam os resíduos de serina e treonina da porção amino-terminal, onde se liga a GSK-3 β . Quando mutada a β -catenina deixa de ser fosforilada, o que impede a sua degradação, resultando em ativação constitutiva desta via na ausência do ligante WNT (21).

O primeiro trabalho publicado demonstrando mutação no *CTNNB1* em craniofaringiomas foi de Sekine et al. em 2002, no qual foram analisados tecidos de 16 craniofaringiomas fixados em parafina, sendo 10 do subtipo adamantinomatoso e 6 papilíferos, submetidos à extração de DNA por meio da proteinase K, e posterior PCR e sequenciamento direto do exon 3. Todos os tumores do subtipo adamantinomatoso apresentaram mutação no *CTNNB1* em contraste com os tumores do tipo papilífero que não

apresentaram mutações (22). Em 2004, Kato et al. publicaram sua casuística composta por 14 craniofaringiomas adamantinomatosos e 1 papilífero; o DNA foi obtido pela digestão por proteinase K e extração pelo método do fenol/clorofórmio das amostras congeladas ou fixadas em parafina; foi realizada análise apenas do exon 3 e a frequência de mutação foi de 69% (9/13) nos adamantinomatosos e o único papilífero não apresentou mutação (23). Em 2005, mais dois trabalhos foram publicados. O primeiro, de Buslei et al. analisou 35 craniofaringiomas adamantinomatosos com mutação em 80% das amostras (28/35), e 6 papilíferos sem mutação; também analisou 60 adenomas pituitários (produtores de GH ou PRL ou FSH ou ACTH ou não funcionantes) nos quais não foi encontrada mutação (24); o DNA dessas amostras foi extraído pelo método automatizado BioRobot EZ1 conforme instruções do fabricante e amplificado para a análise do exon 3 por *single strand conformation polymorphism* (SSCP). O segundo trabalho publicado em 2005, de Oikonomou et al. evidenciou 16% de mutação nos craniofaringiomas adamantinomatosos (7/43) e de maneira semelhante às outras casuísticas, nenhum dos 8 craniofaringiomas papilíferos apresentou mutação, assim como nenhum dos 22 adenomas pituitários analisados (produtores de prolactina ou FSH/LH); o DNA foi extraído tanto de amostras congeladas quanto fixadas em parafina, porém não foi descrito o método de extração (25). Todas as mutações evidenciadas nos diversos trabalhos foram somáticas, *missense*, encontradas no exon 3 do *CTNNB1*, variando entre os códons 32, 33, 37, 41, 43 e 45 e apenas uma deleção de 81 pb compreendida entre os códons 35 e 63 (Tabela 1).

Tabela 1 – Mutações somáticas no exon 3 do *CTNNB1* em craniofaringiomas adamantinomatosos, descritas na literatura

Autor/ano	Presença de mutação/nº de casos	Frequência %	Códons afetados/ (nº de casos)	
Sekine/2002	10/10	100	32 (2)	33 (5)
			37 (2)	41 (1)
Kato/2004	9/13	69	32 (3)	33 (3)
			37 (1)	41 (1)
			43 (1)	
Buslei/2005	28/35	80	32 (8)	33 (9)
			37 (3)	41 (6)
			45 (1)	
			Del 35-63 (1)	
Oikonomou/2005	7/43	16	32 (1)	33 (2)
			37 (1)	41 (3)

Além dos craniofaringiomas, outros tumores também apresentam mutações no *CTNNB1* (21) (Tabela 2). No câncer colorretal esporádico sem mutação no APC (principal gene envolvido na patogênese desse tipo de câncer), aproximadamente 50% apresenta mutação no *CTNNB1*, o que representa menos de 10% dos tumores colorretais (10). Já em hepatoblastomas, tumores incidentes na infância, a proporção de mutações nesse gene chega a 70%, caindo para 25% em carcinomas hepatocelulares (26-29). No câncer gástrico a frequência de mutação varia entre os tipos intestinal e difuso, sendo no primeiro de 23 a 27% (30, 31) e, no segundo de

0 a 38% (30-32). Nos tumores carcinóides gastrointestinais, a frequência de mutação chega a 38% (33). No tumor pancreático do subtipo sólido pseudopapilar, de baixa malignidade, mutação no *CTNNB1* foi encontrada em 18 das 20 amostras analisadas (34). Em uma série que analisou carcinomas endometriais, porém sem diferenciar os subtipos histológicos, a frequência de mutação foi de 40% (35); em outra série que analisou 95 carcinomas endometriais endometrióides e 33 não endometrióides, apenas o primeiro subtipo mostrou mutação no *CTNNB1* em 15% das amostras (36). Em carcinomas de ovário mutações foram encontradas em 7 de 11 amostras; em outro estudo, 14 de 45 carcinomas endometrióides de ovário apresentaram mutação (37, 38). No câncer de próstata 5% das amostras apresentaram mutação (39). Carcinomas anaplásicos de tireóide também apresentam mutação em 61% das amostras (40); em outra série do mesmo autor, foi demonstrada frequência de 25 e 65,5% em carcinomas de tireóide pouco diferenciados e indiferenciados respectivamente (41). O tumor de Wilms, uma das neoplasias renais mais comuns da infância, também demonstrou mutação no *CTNNB1* em 15% das 40 amostras analisadas (42). A neoplasia que apresenta uma das maiores frequências de mutação – 95% - é o pilomatrixoma, que deriva do folículo piloso (43). Tumores desmóides, uma forma infiltrativa de fibromatose, possuem uma frequência de 50% de mutação (44, 45). Mutações no *CTNNB1* em tumores adrenocorticais também são descritas numa frequência de 19,5 a 27% em adenomas e 20 a 31% em carcinomas, sendo o primeiro defeito molecular nesse tipo de tumor que apresenta praticamente a mesma prevalência entre as lesões benignas

e malignas (46, 47). Como já mencionado, as mutações no *CTNNB1* encontradas nas diversas neoplasias, localizaram-se sempre no exon 3, afetando em sua maioria a região *hot spot* composta pelos resíduos de serina e treonina, ou aminoácidos adjacentes.

Tabela 2 – Frequência de mutação somática no exon 3 do *CTNNB1* em diversos tumores

Tumor	Frequência %	Autor/ano
Câncer colo-retal	10	Lustig/2003
Hepatoblastoma	70	Koch/1999 Park/2001 Taniguchi/2002
Carcinoma hepatocelular	25	De La Coste/1998 Taniguchi/2002
Câncer gástrico tipo intestinal	23-27	Clements/2002 Park/1999
Câncer gástrico tipo difuso	0-38	Clements/2002 Park/1999 Sasaki/2001
Carcinóide gastrointestinal	38	Fujimori/2001
Tumor pancreático sólido pseudo-papilar	90	Abraham/2002
Carcinoma endometrial	40	Mirabelli-Primdahl/1999
Carcinoma de ovário	63	Gamallo/1999
Câncer de próstata	5	Voeller/1998
Carcinoma anaplásico de tireóide	61	Garcia-Rostan/1999
Tumor de Wilms	15	Maiti/2000
Pilomatrixoma	95	Chan/1999
Tumor desmóide	50	Miyoshi/1998 Tejpar/1999
Adenoma adrenocortical	19,5-27	Masi/2009 Tissier/2005
Carcinoma adrenocortical	20-31	Masi/2009 Tissier/2005

1.4. *PROP1* e mutações inativadoras

Pacientes portadores de mutações germinativas inativadoras no *PROP1* geralmente apresentam hipófise de tamanho normal ou reduzido. Porém, há na literatura relatos de aumento hipofisário nesses pacientes (48-57). Em 1978, Parks et al. descreveram, provavelmente pela primeira vez, a associação de hipopituitarismo com aumento do volume da sela túrcica em três irmãos (54). Em 1999, Mendonça et al. publicaram o primeiro seguimento longitudinal de uma paciente com hipopituitarismo cujas imagens de RNM, realizadas aos 8 anos de idade, apresentavam aumento do lobo anterior da hipófise com hiperssinal em T1, semelhantes às imagens de craniofaringiomas; aos 15 anos de idade, numa nova RNM, revelou-se uma acentuada redução do tamanho hipofisário (Figura 2). Essa paciente possuía a deleção de 2 pb em homozigose (301-302 delAG) no exon 2 do *PROP1* (48). No mesmo ano, Rosenbloom et al. publicaram uma série com oito pacientes portadores de hipopituitarismo familiar que possuíam a mesma deleção 301-302 delAG em homozigose, sendo 6 irmãos de uma prole e dois de outra, na qual três pacientes da primeira prole apresentaram aumento da região selar visualizada à radiografia simples (55). Em 2002, Teinturier et al. diagnosticaram um paciente portador de hipopituitarismo como tendo um craniofaringioma intrasselar. Porém, a redução espontânea da massa os fez rever o diagnóstico que foi então atribuído a uma deleção no *PROP1* (50). Riepe et al., em 2001, publicaram o seguimento longitudinal de dois irmãos com hipopituitarismo devido a uma mutação em heterozigose

composta para as deleções 301-302 delAG e 150 delA; no início do seguimento ambos apresentavam um aumento hipofisário que após alguns anos deixou de ser evidenciado, dando lugar a uma hipófise hipoplásica, às custas da redução acentuada do lobo anterior (56). Em 2004, Voutetakis et al. publicaram uma série de 15 pacientes portadores de hipopituitarismo com mutações inativadoras do *PROP1*, dos quais cinco apresentavam aumento hipofisário nas imagens de RNM, consistente com uma lesão sem realce ao contraste, interposta entre o lobo anterior (normalmente realçado após o contraste) e a neurohipófise; a haste hipofisária estava deslocada anteriormente. Em três desses pacientes houve regressão espontânea da massa hipofisária, com normalização da posição da haste. Esse estudo demonstrou que embora uma hipófise reduzida seja geralmente observada em pacientes mais velhos, um número significativo de pacientes mais jovens apresenta aumento hipofisário com subsequente regressão, e que provavelmente esse aumento se origine do lobo intermediário (49). Numa outra série publicada em 2005 por Turton et al., dos 15 pacientes avaliados com hipopituitarismo e mutação no *PROP1*, em apenas um pôde ser evidenciado aumento hipofisário seguido de redução (52). Em um estudo publicado recentemente, a análise retrospectiva de 31 pacientes com hipopituitarismo e mutação no *PROP1* evidenciou dois pacientes que foram submetidos à cirurgia para remoção de tumor hipofisário. A análise histológica dos tecidos mostrou células epiteliais, parcialmente oxifílicas, formando estruturas microcísticas de aspecto glandular, preenchidas por colóide eosinofílico sem atipia ou aspecto proliferativo; a imunohistoquímica

evidenciou todos os tipos de células hormonais. Esses achados correspondem ao lobo intermediário da hipófise (58), corroborando os achados de imagem de Voutetakis et al. (49). Além desses, outros trabalhos também evidenciaram aumento hipofisário associado a mutações no *PROP1* (51, 53, 57). A mutação mais freqüente nos casos de hipopituitarismo familiar, presente em aproximadamente 50% desses pacientes, é a 301-302 delAG, sendo também a mais comumente envolvida nos casos com aumento hipofisário (53, 59), nos quais também foram identificadas outras mutações como 150delA, 112-124del, R73C/R99X (49, 52, 57).

A

B

Figura 2. **A** - RNM do paciente com mutação inativadora do *PROP1*. Painéis superiores aos 8 anos de idade com aumento hipofisário e hiperssinal em T1. Painéis inferiores aos 15 anos com redução hipofisária. **B** – RNM de pacientes com craniofaringioma, evidenciando o hiperssinal em T1.

2. Objetivos

1. Pesquisar a presença de mutações somáticas no exon 3 do gene *CTNNB1* em craniofaringiomas do subtipo adamantinomatoso.
2. Avaliar a expressão dos genes *PROP1* e *CTNNB1* em craniofaringiomas do subtipo adamantinomatoso.

3. Métodos

3.1. Considerações Éticas

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido para todos os pacientes.

3.2. Casuística

Foram avaliados 14 craniofaringiomas do subtipo adamantinomatoso obtidos de pacientes (9 do sexo feminino) submetidos à ressecção terapêutica no Hospital das Clínicas da FMUSP (n=12) ou em hospital privado (n=2). Todos os pacientes foram operados por via transcraniana pelo neurocirurgião pediátrico Dr. Hamilton Matushita. A idade dos pacientes variou entre 1 ano e 7 meses e 21 anos (média de 10 anos). Sete pacientes fizeram seguimento em outros hospitais e os dados clínicos de evolução

pós-operatória não foram disponíveis. Dentre os 7 pacientes que tiveram seguimento no Hospital das Clínicas 5 apresentaram recidivas tumorais.

Todas as amostras foram submetidas à pesquisa de mutações do exon 3 do *CTNNB1*. Para tanto, foi utilizado como *template* o cDNA obtido do RNA tumoral por meio de transcrição reversa.

Do total de 14 amostras apenas 12 foram submetidas à análise da expressão gênica uma vez que a extração do RNA de 2 amostras gerou material degradado.

3.3. Extração de RNA

O RNA total das amostras foi extraído a partir dos tecidos de craniofaringiomas coletados durante o ato operatório terapêutico e congelados em RNA^{later}® (Ambion, Austin, TX, USA) a -20 °C. Utilizou-se o método do reagente tiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A uma quantidade média de 100 mg de tecido foi adicionado 1 mL de TRIzol®. Essa mistura foi homogeneizada por trituração, os debris foram descartados e adicionou-se 200 µL de clorofórmio, agitando-se o tubo vigorosamente por 15 segundos, seguido por um repouso de 3 minutos em temperatura ambiente. A mistura foi então centrifugada a 12.000 x g por 15 minutos a 4 °C, após o qual se obteve uma solução trifásica formada por um sobrenadante translúcido contendo o RNA, uma fase intermediária leitosa contendo o DNA e uma fase inferior rosada

contendo proteínas. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, ao qual foi adicionado 500 µL de isopropanol, incubado por 10 minutos em temperatura ambiente e centrifugado a 12.000 x g por 10 minutos a 4 °C. Essa centrifugação permite a formação do *pellet* de RNA, que é então lavado através da adição de 1000 µL de etanol a 75% e centrifugação a 7500 x g por 5 minutos a 4 °C. O etanol é removido por inversão e o tubo contendo o pellet é deixado invertido para secar em temperatura ambiente por 30 minutos. O *pellet* é então ressuspensão em 50 µL de água livre de RNase e por fim, desnaturado a 65 °C por 10 minutos e estocado a -80 °C. A integridade do RNA extraído foi testada através da eletroforese em gel de agarose 1% e visualização em transiluminador ultravioleta para avaliação da presença das 2 bandas de RNA ribossômico (18S e 28S). As amostras que não apresentaram as duas bandas foram excluídas. As concentrações das amostras de RNA total foram avaliadas a partir da leitura em espectrofotômetro.

3.4. Transcrição Reversa

O DNA complementar (cDNA) de cada amostra foi sintetizado por transcrição reversa utilizando-se o *High Capacity cDNA Archive Kit*[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para a reação de transcrição reversa são preparadas duas soluções para cada amostra: a primeira contendo 1250 ng de RNA total diluídos em 25 µL de água livre de RNase; a segunda

contendo uma mistura de reagentes fornecidos pelo fabricante em quantidades indicadas pelo mesmo, sendo 5 µL de *buffer*, 2 µL de dNTP (trifosfato de nucleotídeo), 5 µL de *primers* randômicos, 2,5 µL de transcriptase reversa e 10 µL de água livre de RNase. Essas soluções são então misturadas obtendo-se um volume final de 50 µL que é aquecido a 25 °C por 10 minutos, e em seguida a 37 °C por 120 minutos. A concentração final de cDNA é de 25 ng/µl.

3.5. PCR

O exon 3 do *CTNNB1* foi amplificado utilizando-se *primers* exônicos a partir de 25 ng de cDNA. Cada reação de PCR foi realizada num volume final de 25 µL completado com água, que continha 5 µL de tampão 5x para PCR (KCl 50 mmol, MgCl₂ 1,5 mmol e Tris-HCl pH 9,0 10 mmol), 200 µmol de dNTP, 20 pmol de *primer sense* (5'-GATTTGATGGAGTTGGACATGG-3') e de *antisense* (5'-TGTTCTTGAGTGAAGGACTGAG-3') e 1,5 U de polimerase de DNA *GoTaq*® (*Promega*, Madison, WI, USA). Essa mistura foi então desnaturada por 5 minutos a 94 °C e submetida a 35 ciclos (94 °C por 45 s, 65 °C por 45 s e 72 °C por 60 s.), seguidos por uma extensão de 10 minutos a 72 °C. Os fragmentos amplificados tinham 218 pb, e foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta. Os produtos de PCR foram pré tratados com uma combinação de exonuclease I e fosfatase alcalina de

camarão (*United States Biochemical Corp.*, Cleveland, OH, USA) e diretamente sequenciados usando o *kit BigDye* para sequenciamento (*PE Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA) em um sequenciador automático *ABI Prism 3100* (*Perkin Elmer Corp.*).

3.6. Análise *in silico* das variantes alélicas identificadas

Foi utilizado o PolyPhen, um método de predição *in silico*, que classifica as mutações *missense* com base no seu potencial impacto sobre a função ou estrutura da proteína. O PolyPhen classifica as predições das mutações da seguinte forma: 1 - provavelmente danosa: grande chance de afetar a função ou estrutura da proteína; 2 - possivelmente danosa: poderia afetar a função ou estrutura da proteína; 3 – benigna: provavelmente sem efeito na proteína (60)

3.7. Estudo da expressão por PCR em tempo real

O cDNA obtido na transcrição reversa foi submetido a reações de PCR em tempo real para quantificação da expressão dos genes *PROP1*, *CTNNB1* e *PIT1* de 12 craniofaringiomas adamantinomatosos. Tal quantificação foi realizada por um sistema de detecção de sequências (SDS) *ABI Prism 7000* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA) utilizando-se para tanto o *TaqMan® Gene Expression Assay* (números de identificação:

PROP1 - Hs00196604_m1; *CTNNB1* - Hs00355045_m1; *PIT1* - Hs00230821_m1) que contém pares de *primers* exônicos específicos para cada gene, além de sonda específica para o fragmento amplificado. *Primers* e sonda são previamente testados por um sistema de desenvolvimento de ensaios da *Applied Biosystems*, de forma a garantir a amplificação apenas dos produtos desejados, bem como a não amplificação de DNA genômico. As sondas dos genes alvo *PROP1*, *CTNNB1* e *PIT1* são marcadas com uma fluorescência FAM, enquanto as dos genes endógenos *PGK1* (phosphoglyceratekinase 1 - 4326318E), *CYC* (cyclophilin A - 4326316E) e *HPRT1* (hypoxanthine phosphoribosyl-transferase 1 - 4326321E) são marcadas com fluorescência VIC. As diferentes fluorescências que marcam as sondas emitem comprimentos de onda bem distintos, permitindo a sua diferenciação quando captados pela câmera CCD do aparelho de detecção.

As reações de amplificação por PCR em tempo real foram realizadas em triplicata e *singleplex* utilizando-se 12.5 µL de *TaqMan® Universal PCR Master Mix*, 2 µL de cDNA (25 ng/ µL), 1,25 µL do ensaio contendo *primers* e sonda específicos para cada gene, em um volume final de 25 µL completado com água. Visando garantir a acurácia das reações, o desvio padrão máximo aceito entre as triplicatas foi de até 0,3.

Para se calcular o nível de expressão de cada gene nas diferentes amostras, foi realizada uma quantificação relativa utilizando-se o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$, onde C_T (*threshold cycle*) é o ciclo da PCR em tempo real no qual a amplificação atinge a fase logarítmica; ΔC_T é a diferença de expressão entre o gene alvo e o endógeno de uma determinada amostra e o $\Delta\Delta C_T$

corresponde à diferença entre o ΔC_T da amostra de cada paciente e o ΔC_T do calibrador (61). Calibrador é uma amostra cuja expressão é utilizada como base de comparação para obtenção dos resultados de expressão. Utilizamos como calibrador um *pool* comercial de 39 hipófises de adultos (636157 - *Human Pituitary Gland Poly A⁺ RNA*, Clontech, Palo Alto, CA, USA). Consideramos como indetectáveis as amostras com $C_T > 34$. Nesta condição a quantidade de cDNA do gene alvo se aproxima de cópia única, gerando resultados de pouca precisão e baixa reprodutibilidade.

3.8. Validação do método $2^{-\Delta\Delta C_T}$

Para utilizarmos o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ no cálculo da expressão relativa é preciso que a eficiência de amplificação do gene alvo e do endógeno seja aproximadamente igual. Para avaliar essa eficiência nós realizamos uma curva padrão de amplificação para cada gene utilizando a mesma amostra, o *pool* comercial de hipófises normais. Para a construção das curvas foi utilizada uma quantidade inicial de amostra que foi progressivamente diluída em 50%, obtendo-se um total de seis diluições nas quais a concentração da diluição anterior era o dobro da seguinte. Para garantir uma eficiência de amplificação perto de 100%, a inclinação (y) da curva padrão deve ser de $-3,3 \pm 0,3$; enquanto para garantir uma adequada acurácia entre as triplicatas o coeficiente de correlação (R^2) deve ser $\geq 0,99$ (Gráficos 1 e 2). Após a construção das curvas, para determinar se a eficiência de amplificação das reações de PCR do gene alvo e do endógeno eram aproximadamente

iguais, realizamos o ΔC_T (C_T alvo – C_T endógeno). Para tanto, utilizamos o C_T gerado para cada diluição equivalente do alvo e do endógeno. Em seguida construímos uma nova curva onde foram lançados os valores do ΔC_T versus os valores do logaritmo das diluições para se obter uma linha de regressão semilogarítmica cuja inclinação é utilizada como critério de validação para o uso de método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Gráfico 3). Tal método pode ser utilizado quando o valor de inclinação (y) da curva é $< 0,1$.

Gráfico 1 – Curva-padrão de amplificação do gene endógeno *CYC*

Gráfico 2 – Curva-padrão de amplificação do gene alvo *PROP1*

Gráfico 3 – Experimento de validação do método $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Validação para os genes alvo *PROP1* e endógeno *CYC*

3.9. Escolha dos genes endógenos

Quando se emprega a técnica de estudo de expressão em tempo real, para se obter uma interpretação confiável dos resultados bem como ser capaz de detectar pequenas mudanças nos níveis de expressão, é necessária uma normalização precisa. Nos cálculos da quantificação relativa uma estratégia comum de normalização é a amplificação de um ou mais genes endógenos controles, em paralelo ao gene alvo. Um gene endógeno ideal deve exibir uma expressão constitutiva e estável nas amostras investigadas. A escolha de um gene endógeno inadequado pode gerar resultados alterados. Sendo assim, para escolhermos quais seriam os melhores genes endógenos para os tecidos de craniofaringiomas deste estudo, nós testamos sete genes (Tabela 3), comumente utilizados como endógenos, através de um *software* criado e validado por Vandesompele et al., o *geNorm* (62). Esse programa avalia a estabilidade de expressão dos genes endógenos testados baseando-se nos níveis de expressão dos mesmos antes de serem normalizados e utiliza-se do princípio de que a razão entre a expressão de dois genes endógenos ideais é sempre a mesma para todas as amostras, independente das condições experimentais. Para cada gene é calculado um valor de estabilidade denominado M ; quanto menor o valor de M , mais estável é o gene. O uso de mais de um gene endógeno para normalização gera resultados mais acurados. Por isso, através do *geNorm* obtivemos os 3 genes endógenos com os menores valores de M entre os sete testados, que foram então considerados os mais

apropriados para as amostras de craniofaringiomas do presente estudo (Gráfico 4). Os genes escolhidos foram *PGK1*, *CYC* e *HPRT1*. A média geométrica da expressão dos três genes foi usada então, como gene endógeno no cálculo $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Tabela 3 - Genes alvo¹ e endógenos² estudados por PCR em tempo real

Símbolo	Nome do gene	Função	Número de identificação
<i>PROP1</i>¹	Profeta do <i>PIT1</i>	Fator de transcrição específico da hipófise	Hs00196604_m1
<i>CTNNB1</i>¹	β -catenina	Proteína da junção de aderência e da via Wnt	Hs00355045_m1
<i>PIT1</i>¹	PIT1	Fator de transcrição específico da hipófise	Hs00230821_m1
<i>ACTB</i>²	Beta-actina	Proteína estrutural citoesquelética	4326315E
<i>B2M</i>²	Beta-2-microglobulina	Molécula do complexo principal de histocompatibilidade I	4326319E
<i>GAPDH</i>²	Gliceraldeído-3-fosfatase-desidrogenase	Oxidoredutase na glicólise e gliconeogênese	4326317E
<i>HPRT</i>²	Hipoxantina-ribosil-transferase	Síntese de purinas	4326321E
<i>PGK1</i>²	Fosfoglicerato quinase 1	Enzima glicolítica	4326318E
<i>CYC</i>²	Ciclofilina A	Catalisa a isomerização cis-trans de ligações peptídicas	4326316E
<i>TBP</i>²	Proteína ligadora TATA-box	Fator de transcrição geral da RNA polimerase II	4326322E

Gráfico 4 – Valores de estabilidade da expressão (M) dos genes endógenos nos craniofaringiomas adamantinomatosos

3.10. Análise estatística

Foi utilizado o teste exato de Fisher para o cálculo do significado estatístico da expressão do *CTNNB1*.

4. Resultados

4.1. Sequenciamento

Foram identificadas 7 mutações somáticas no exon 3 do *CTNNB1* em 9 dos 14 craniofaringiomas adamantinomatosos estudados (Tabela 4). Todas as mutações são do tipo *missense*, em heterozigose. Cinco delas já foram previamente descritas nesses tumores (22-25) e duas delas ainda não. Uma das mutações não descritas resultou na substituição do aminoácido hidrofílico ácido aspártico, pelo aminoácido hidrofóbico valina no códon 32. A outra mutação não descrita resultou em substituição de uma serina por prolina, ambos classificados como aminoácidos polares sem carga, no códon 37.

Tabela 4 – Análise do exon 3 do *CTNNB1* em pacientes com craniofaringiomas adamantinomatosos

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Troca na sequencia de DNA	Troca de aminoácido
1	9	M	c.122C>T	p.Thr41Ile
2	4	M	Não encontrada	Não encontrada
3	1	F	c.110C>T	p.Ser37Phe
4	10	F	Não encontrada	Não encontrada
5	9	M	c.109T>C	p.Ser37Pro ¹
6	21	M	Não encontrada	Não encontrada
7	2	F	c.94G>A	p.Asp32Phe
8	1	M	c.122C>T	p.Thr41Ile
9	13	F	c.98C>T	p.Ser33Phe
10	17	F	c.94G>A	p.Asp32Phe
11	14	F	c.98C>G	p.Ser33Cys
12	11	F	Não encontrada	Não encontrada
13	9	F	Não encontrada	Não encontrada
14	4	F	c.95A>T	p.Asp32Val ¹

¹ Mutações ainda não descritas em craniofaringiomas adamantinomatosos

4.2. PCR em tempo real

4.2.1. Gene *CTNNB1*

Doze amostras foram submetidas à análise por PCR em tempo real, sendo que dessas, sete apresentavam mutação no *CTNNB1*. Em cinco dessas sete amostras observamos um aumento da expressão do *CTNNB1* que variou de 2,5 a 6,2 vezes maior que a expressão do *pool* de hipófise normal (amostras 3, 5, 9, 11, 14) (Gráfico 5). Com relação às cinco amostras sem mutação no *CTNNB1*, apenas duas apresentaram expressão de 3,6 e 4,6 vezes maior que a do *pool* de hipófise normal (amostras 13 e 4 respectivamente) (Gráfico 5). Contudo, não houve diferença estatisticamente significativa entre o número de amostras com hiperexpressão do *CTNNB1* nos grupos com e sem mutação neste gene ($p=0,558$).

Gráfico 5 – Expressão do *CTNNB1* por PCR em tempo real em craniofaringiomas adamantinomatosos com e sem mutação no *CTNNB1*, em relação ao *pool* de hipófise normal

4.2.2. Gene *PROP1*

A expressão do *PROP1* foi indetectável em dez das doze amostras avaliadas. Entretanto, as duas amostras que apresentaram valores detectáveis, embora hipoexpressos em relação ao *pool* de hipófise normal, também apresentaram expressão de *PIT1*, sugerindo contaminação com tecido hipofisário normal.

5. Discussão

Os craniofaringiomas são os tumores mais comuns da região hipotálamo-hipofisária em crianças (1). Apesar de serem histologicamente benignos, seu comportamento é agressivo e seu caráter invasivo para as estruturas adjacentes - como a hipófise, o nervo óptico, e o hipotálamo - pode resultar em sequelas com prejuízo frequente na qualidade de vida.

Mutações no gene *CTNNB1*, que codifica a proteína β -catenina, foram descritas numa frequência variável de 16 a 100% dos craniofaringiomas adamantinomatosos avaliados em diferentes séries (22-25). Essas mutações foram encontradas no exon 3, afetando sempre o sítio de degradação da β -catenina. Todas as mutações eram *missense*, exceto uma deleção de 81 pb, somáticas e em heterozigose.

No presente estudo identificamos mutações no *CTNNB1* em 64% das amostras. Tais mutações foram encontradas nos códons 33 (n=2), 37 (n=2) e 41 (n=2) afetando diretamente os resíduos de serina e treonina da β -catenina, que são o alvo de fosforilação pela GSK-3 β . Outro códon acometido foi o 32 (n=3), que flanqueia o sítio de fosforilação da GSK-3 β , o que provavelmente também impediria a ação dessa enzima, como acontece nas mutações nos códons 33, 37 e 41 (21) (Tabela 4).

Tanto as mutações já descritas encontradas nessa casuística quanto as duas mutações ainda não descritas (p.Ser37Pro e p.Asp32Val) em

craniofaringiomas foram classificadas pelo programa PolyPhen como provavelmente danosas, isto é, com grande chance de afetar a proteína.

Recentemente as mutações previamente descritas no *CTNNB1* tiveram seu papel demonstrado na etiopatogênese do craniofaringioma adamantinomatoso através do aumento da expressão dos genes alvo *Axin2* e *BMP4*, da via de sinalização WNT (63). O primeiro codifica a proteína Axina2, componente do complexo multiprotéico de degradação da β -catenina, que atua como regulador negativo da via WNT (64); o segundo codifica uma proteína de mesmo nome que exerce papel fundamental no processo de desenvolvimento dentário (65) e está aumentada em tumores com elevação da β -catenina (66). O aumento na expressão desses genes foi evidenciado em células tumorais com acúmulo nuclear de β -catenina que foram micro-dissecadas a laser. Ao contrário, as células sem acúmulo nuclear da β -catenina não apresentaram tal aumento. Por outro lado, estes autores também demonstraram que nem todas as células com presença de mutações no exon 3 do *CTNNB1* apresentavam acúmulo nuclear de β -catenina, sugerindo que talvez as mutações que alteram a degradação da proteína possam não ser suficientes *per se* para gerar tal acúmulo (63) e que talvez outro mecanismo esteja envolvido nesse processo.

Outros fatores além das mutações ativadoras no *CTNNB1* podem estar envolvidos no acúmulo citoplasmático e consequentemente nuclear da β -catenina. Entre eles, a ligação às caderinas e o transporte através da membrana nuclear. Quando ligada à caderina, fazendo parte das junções de aderência célula-célula, a β -catenina não entra no núcleo. A entrada e a

saída da β -catenina através do núcleo são processos que ocorrem sem gasto energético, mas dependem das repetições *armadillo* 10-12 e da região carboxi-terminal (67). O mesmo trabalho que avaliou a expressão da Axina2 e do BMP4 nas células com mutação no exon 3 e acúmulo nuclear de β -catenina não encontrou mutações nos exons que codificam as regiões responsáveis pela ligação às caderinas (exons 4, 9 e 13) e pelo transporte nuclear da β -catenina (exons 8-13), indicando um mecanismo de transporte nuclear e de ligação às junções de aderência intactos (63).

Em nossa casuística, avaliamos pela primeira vez a expressão do *CTNNB1* em craniofaringiomas adamantinomatosos. Observamos uma expressão variável nesses tumores, com hiperexpressão em 58% das amostras. Essa hiperexpressão ocorreu independentemente da presença ou ausência de mutações no *CTNNB1*. O aumento de expressão do *CTNNB1* poderia estar envolvido na patogênese dos tumores sem mutação nesse gene. Enquanto nos tumores com mutação, essa hiperexpressão poderia contribuir na patogênese ou modificar o fenótipo do tumor. No entanto, como essa é a primeira descrição desse achado, outros estudos com maior número de tumores são necessários para esclarecer o papel dessa hiperexpressão.

A patogênese dos craniofaringiomas sem alterações no *CTNNB1* ainda permanece sem explicação. Para investigar outros genes provavelmente envolvidos nesse processo, analisamos a expressão do *PROP1*. Esse gene foi escolhido baseado no fato de que a β -catenina – única proteína envolvida até o momento com a patogênese – interage com o

PROP1 para controlar a determinação da linhagem celular hipofisária (12) e de que camundongos transgênicos com expressão persistente do *Prop1* têm defeitos no controle da proliferação celular com aumento da susceptibilidade a tumores hipofisários (14). Além disso, pacientes com mutações inativadoras do *PROP1* podem apresentar aumento hipofisário (48-57). Portanto, a desregulação na expressão do *PROP1* poderia resultar no desenvolvimento de craniofaringiomas adamantinomatosos nos quais não foram identificadas alterações no *CTNNB1*. Contudo, nenhuma das amostras apresentou expressão de *PROP1*, exceto as que também expressaram *PIT1*, sendo consideradas, portanto, contaminadas com tecido hipofisário normal. Inicialmente nós imaginamos que as amostras sem alteração no *CTNNB1* poderiam apresentar um padrão de expressão de *PROP1* diferente do observado nas amostras com mutação, especialmente uma hiperexpressão, o que eventualmente poderia ser responsável pela patogênese dessas amostras. Contudo, nossos achados não foram capazes de provar essa hipótese, uma vez que tanto as amostras com mutação quanto as sem mutação no *CTNNB1* apresentaram níveis indetectáveis de *PROP1*, indicando que tal gene não deve ter relação com a tumorigênese dos craniofaringiomas adamantinomatosos.

6. Conclusões

- 1- Identificamos mutações com ganho de função no *CTNNB1* em 64% dos tumores sendo cinco já descritas e duas mutações ainda não descritas em craniofaringiomas adamantinomatosos.
- 2- Observamos aumento da expressão do *CTNNB1* em 58% das amostras sugerindo o envolvimento também da hiperexpressão desse gene na etiopatogenia do craniofaringioma adamantinomatoso.
- 3- Observamos ausência de expressão do *PROP1* em todas as amostras, afastando o envolvimento desse fator de transcrição na etiopatogenia do craniofaringioma adamantinomatoso.

7. Referências

1. Bunin GR, Surawicz TS, Witman PA, Preston-Martin S, Davis F, Bruner JM. The descriptive epidemiology of craniopharyngioma. *J Neurosurg*. 1998 Oct;89(4):547-51.
2. Karavitaki N, Cudlip S, Adams CB, Wass JA. Craniopharyngiomas. *Endocr Rev*. 2006 Jun;27(4):371-97.
3. Van Effenterre R, Boch AL. Craniopharyngioma in adults and children: a study of 122 surgical cases. *J Neurosurg*. 2002 Jul;97(1):3-11.
4. Goldberg GM, Eshbaugh DE. Squamous cell nests of the pituitary gland as related to the origin of craniopharyngiomas. A study of their presence in the newborn and infants up to age four. *Arch Pathol*. 1960 Sep;70:293-9.
5. Asa SL, Kovacs K, Bilbao JM. The pars tuberalis of the human pituitary. A histologic, immunohistochemical, ultrastructural and immunoelectron microscopic analysis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1983;399(1):49-59.
6. Adamson TE, Wiestler OD, Kleihues P, Yasargil MG. Correlation of clinical and pathological features in surgically treated craniopharyngiomas. *J Neurosurg*. 1990 Jul;73(1):12-7.
7. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*. 1991 Mar 22;251(5000):1451-5.

8. Gooding JM, Yap KL, Ikura M. The cadherin-catenin complex as a focal point of cell adhesion and signalling: new insights from three-dimensional structures. *Bioessays*. 2004 May;26(5):497-511.
9. Kikuchi A, Yamamoto H, Kishida S. Multiplicity of the interactions of Wnt proteins and their receptors. *Cell Signal*. 2007 Apr;19(4):659-71.
10. Lustig B, Behrens J. The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2003 Apr;129(4):199-221.
11. Hurlstone A, Clevers H. T-cell factors: turn-ons and turn-offs. *EMBO J*. 2002 May 15;21(10):2303-11.
12. Olson LE, Tollkuhn J, Scafoglio C, Kronen A, Zhang J, Ohgi KA, et al. Homeodomain-mediated beta-catenin-dependent switching events dictate cell-lineage determination. *Cell*. 2006 May 5;125(3):593-605.
13. Zhu X, Gleiberman AS, Rosenfeld MG. Molecular physiology of pituitary development: signaling and transcriptional networks. *Physiol Rev*. 2007 Jul;87(3):933-63.
14. Cushman LJ, Watkins-Chow DE, Brinkmeier ML, Raetzman LT, Radak AL, Lloyd RV, et al. Persistent Prop1 expression delays gonadotrope differentiation and enhances pituitary tumor susceptibility. *Hum Mol Genet*. 2001 May 15;10(11):1141-53.
15. von Kries JP, Winbeck G, Asbrand C, Schwarz-Romond T, Sochnikova N, Dell'Oro A, et al. Hot spots in beta-catenin for interactions with LEF-1, conductin and APC. *Nat Struct Biol*. 2000 Sep;7(9):800-7.

16. Huber AH, Weis WI. The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell*. 2001 May 4;105(3):391-402.
17. Nakayama M, Kato T, Susa T, Sano A, Kitahara K, Kato Y. Dimeric PROP1 binding to diverse palindromic TAAT sequences promotes its transcriptional activity. *Mol Cell Endocrinol*. 2009 Aug 13;307(1-2):36-42.
18. Tucker SC, Wisdom R. Site-specific heterodimerization by paired class homeodomain proteins mediates selective transcriptional responses. *J Biol Chem*. 1999 Nov 5;274(45):32325-32.
19. Showalter AD, Smith TP, Bennett GL, Sloop KW, Whitsett JA, Rhodes SJ. Differential conservation of transcriptional domains of mammalian Prophet of Pit-1 proteins revealed by structural studies of the bovine gene and comparative functional analysis of the protein. *Gene*. 2002 May 29;291(1-2):211-21.
20. Sornson MW, Wu W, Dasen JS, Flynn SE, Norman DJ, O'Connell SM, et al. Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. *Nature*. 1996 Nov 28;384(6607):327-33.
21. Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev*. 2000 Aug 1;14(15):1837-51.
22. Sekine S, Shibata T, Kokubu A, Morishita Y, Noguchi M, Nakanishi Y, et al. Craniopharyngiomas of adamantinomatous type harbor beta-catenin gene mutations. *Am J Pathol*. 2002 Dec;161(6):1997-2001.

23. Kato K, Nakatani Y, Kanno H, Inayama Y, Ijiri R, Nagahara N, et al. Possible linkage between specific histological structures and aberrant reactivation of the Wnt pathway in adamantinomatous craniopharyngioma. *J Pathol.* 2004 Jul;203(3):814-21.
24. Buslei R, Nolde M, Hofmann B, Meissner S, Eyupoglu IY, Siebzehnrbul F, et al. Common mutations of beta-catenin in adamantinomatous craniopharyngiomas but not in other tumours originating from the sellar region. *Acta Neuropathol.* 2005 Jun;109(6):589-97.
25. Oikonomou E, Barreto DC, Soares B, De Marco L, Buchfelder M, Adams EF. Beta-catenin mutations in craniopharyngiomas and pituitary adenomas. *J Neurooncol.* 2005 Jul;73(3):205-9.
26. de La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, Buendia MA, Soubrane O, et al. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jul 21;95(15):8847-51.
27. Koch A, Denkhaus D, Albrecht S, Leuschner I, von Schweinitz D, Pietsch T. Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the beta-catenin gene. *Cancer Res.* 1999 Jan 15;59(2):269-73.
28. Park WS, Oh RR, Park JY, Kim PJ, Shin MS, Lee JH, et al. Nuclear localization of beta-catenin is an important prognostic factor in hepatoblastoma. *J Pathol.* 2001 Apr;193(4):483-90.

29. Taniguchi K, Roberts LR, Aderca IN, Dong X, Qian C, Murphy LM, et al. Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Oncogene*. 2002 Jul 18;21(31):4863-71.
30. Clements WM, Wang J, Sarnaik A, Kim OJ, MacDonald J, Fenoglio-Preiser C, et al. beta-Catenin mutation is a frequent cause of Wnt pathway activation in gastric cancer. *Cancer Res*. 2002 Jun 15;62(12):3503-6.
31. Park WS, Oh RR, Park JY, Lee SH, Shin MS, Kim YS, et al. Frequent somatic mutations of the beta-catenin gene in intestinal-type gastric cancer. *Cancer Res*. 1999 Sep 1;59(17):4257-60.
32. Sasaki Y, Morimoto I, Kusano M, Hosokawa M, Itoh F, Yanagihara K, et al. Mutational analysis of the beta-catenin gene in gastric carcinomas. *Tumour Biol*. 2001 Mar-Apr;22(2):123-30.
33. Fujimori M, Ikeda S, Shimizu Y, Okajima M, Asahara T. Accumulation of beta-catenin protein and mutations in exon 3 of beta-catenin gene in gastrointestinal carcinoid tumor. *Cancer Res*. 2001 Sep 15;61(18):6656-9.
34. Abraham SC, Klimstra DS, Wilentz RE, Yeo CJ, Conlon K, Brennan M, et al. Solid-pseudopapillary tumors of the pancreas are genetically distinct from pancreatic ductal adenocarcinomas and almost always harbor beta-catenin mutations. *Am J Pathol*. 2002 Apr;160(4):1361-9.
35. Mirabelli-Primdahl L, Gryfe R, Kim H, Millar A, Luceri C, Dale D, et al. Beta-catenin mutations are specific for colorectal carcinomas with

- microsatellite instability but occur in endometrial carcinomas irrespective of mutator pathway. *Cancer Res.* 1999 Jul 15;59(14):3346-51.
36. Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sanchez C, Sarrio D, Cassia R, Garcia-Rostan G, et al. Abnormalities of the APC/beta-catenin pathway in endometrial cancer. *Oncogene.* 2002 Nov 14;21(52):7981-90.
 37. Gamallo C, Palacios J, Moreno G, Calvo de Mora J, Suarez A, Armas A. beta-catenin expression pattern in stage I and II ovarian carcinomas : relationship with beta-catenin gene mutations, clinicopathological features, and clinical outcome. *Am J Pathol.* 1999 Aug;155(2):527-36.
 38. Wu R, Zhai Y, Fearon ER, Cho KR. Diverse mechanisms of beta-catenin deregulation in ovarian endometrioid adenocarcinomas. *Cancer Res.* 2001 Nov 15;61(22):8247-55.
 39. Voeller HJ, Truica CI, Gelmann EP. Beta-catenin mutations in human prostate cancer. *Cancer Res.* 1998 Jun 15;58(12):2520-3.
 40. Garcia-Rostan G, Tallini G, Herrero A, D'Aquila TG, Carcangiu ML, Rimm DL. Frequent mutation and nuclear localization of beta-catenin in anaplastic thyroid carcinoma. *Cancer Res.* 1999 Apr 15;59(8):1811-5.
 41. Garcia-Rostan G, Camp RL, Herrero A, Carcangiu ML, Rimm DL, Tallini G. Beta-catenin dysregulation in thyroid neoplasms: down-regulation, aberrant nuclear expression, and CTNNB1 exon 3

mutations are markers for aggressive tumor phenotypes and poor prognosis. *Am J Pathol.* 2001 Mar;158(3):987-96.

42. Maiti S, Alam R, Amos CI, Huff V. Frequent association of beta-catenin and WT1 mutations in Wilms tumors. *Cancer Res.* 2000 Nov 15;60(22):6288-92.
43. Chan EF, Gat U, McNiff JM, Fuchs E. A common human skin tumour is caused by activating mutations in beta-catenin. *Nat Genet.* 1999 Apr;21(4):410-3.
44. Miyoshi Y, Iwao K, Nawa G, Yoshikawa H, Ochi T, Nakamura Y. Frequent mutations in the beta-catenin gene in desmoid tumors from patients without familial adenomatous polyposis. *Oncol Res.* 1998;10(11-12):591-4.
45. Tejpar S, Nollet F, Li C, Wunder JS, Michils G, dal Cin P, et al. Predominance of beta-catenin mutations and beta-catenin dysregulation in sporadic aggressive fibromatosis (desmoid tumor). *Oncogene.* 1999 Nov 11;18(47):6615-20.
46. Masi G, Lavezzo E, Iacobone M, Favia G, Palu G, Barzon L. Investigation of BRAF and CTNNB1 activating mutations in adrenocortical tumors. *J Endocrinol Invest.* 2009 Jul-Aug;32(7):597-600.
47. Tissier F, Cavard C, Groussin L, Perlemoine K, Fumey G, Hagnere AM, et al. Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both

- benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer Res.* 2005 Sep 1;65(17):7622-7.
48. Mendonca BB, Osorio MG, Latronico AC, Estefan V, Lo LS, Arnhold IJ. Longitudinal hormonal and pituitary imaging changes in two females with combined pituitary hormone deficiency due to deletion of A301,G302 in the PROP1 gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Mar;84(3):942-5.
 49. Voutetakis A, Argyropoulou M, Sertedaki A, Livadas S, Xekouki P, Maniati-Christidi M, et al. Pituitary magnetic resonance imaging in 15 patients with Prop1 gene mutations: pituitary enlargement may originate from the intermediate lobe. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 May;89(5):2200-6.
 50. Teinturier C, Vallette S, Adamsbaum C, Bendaoud M, Brue T, Bougneres PF. Pseudotumor of the pituitary due to PROP-1 deletion. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2002 Jan;15(1):95-101.
 51. Nascif SO, Vieira TC, Ramos-Dias JC, Lengyel AM, Abucham J. Waxing and waning of a pituitary mass in a young woman with combined pituitary hormone deficiency (CPHD) due to a PROP-1 mutation. *Pituitary.* 2006;9(1):47-52.
 52. Turton JP, Mehta A, Raza J, Woods KS, Tiulpakov A, Cassar J, et al. Mutations within the transcription factor PROP1 are rare in a cohort of patients with sporadic combined pituitary hormone deficiency (CPHD). *Clin Endocrinol (Oxf).* 2005 Jul;63(1):10-8.

53. Abrao MG, Leite MV, Carvalho LR, Billerbeck AE, Nishi MY, Barbosa AS, et al. Combined pituitary hormone deficiency (CPHD) due to a complete PROP1 deletion. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006 Sep;65(3):294-300.
54. Parks JS, Tenore A, Bongiovanni AM, Kirkland RT. Familial hypopituitarism with large sella turcica. *N Engl J Med*. 1978 Mar 30;298(13):698-702.
55. Rosenbloom AL, Almonte AS, Brown MR, Fisher DA, Baumbach L, Parks JS. Clinical and biochemical phenotype of familial anterior hypopituitarism from mutation of the PROP1 gene. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Jan;84(1):50-7.
56. Riepe FG, Partsch CJ, Blankenstein O, Monig H, Pfaffle RW, Sippell WG. Longitudinal imaging reveals pituitary enlargement preceding hypoplasia in two brothers with combined pituitary hormone deficiency attributable to PROP1 mutation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Sep;86(9):4353-7.
57. Vallette-Kasic S, Barlier A, Teinturier C, Diaz A, Manavela M, Berthezene F, et al. PROP1 gene screening in patients with multiple pituitary hormone deficiency reveals two sites of hypermutability and a high incidence of corticotroph deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Sep;86(9):4529-35.
58. Zygmunt-Gorska A, Starzyk J, Adamek D, Radwanska E, Sucharski P, Herman-Sucharska I, et al. Pituitary enlargement in patients with PROP1 gene inactivating mutation represents cystic hyperplasia of the

- intermediate pituitary lobe. Histopathology and over 10 years follow-up of two patients. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2009 Jul;22(7):653-60.
59. Cogan JD, Wu W, Phillips JA, 3rd, Arnhold IJ, Agapito A, Fofanova OV, et al. The PROP1 2-base pair deletion is a common cause of combined pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 Sep;83(9):3346-9.
 60. Ramensky V, Bork P, Sunyaev S. Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res.* 2002 Sep 1;30(17):3894-900.
 61. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8.
 62. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002 Jun 18;3(7):RESEARCH0034.
 63. Holsken A, Kreutzer J, Hofmann BM, Hans V, Oppel F, Buchfelder M, et al. Target gene activation of the Wnt signaling pathway in nuclear beta-catenin accumulating cells of adamantinomatous craniopharyngiomas. *Brain Pathol.* 2009 Jul;19(3):357-64.
 64. Jho EH, Zhang T, Domon C, Joo CK, Freund JN, Costantini F. Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol Cell Biol.* 2002 Feb;22(4):1172-83.

65. Ohazama A, Tucker A, Sharpe PT. Organized tooth-specific cellular differentiation stimulated by BMP4. *J Dent Res*. 2005 Jul;84(7):603-6.
66. Kim JS, Crooks H, Dracheva T, Nishanian TG, Singh B, Jen J, et al. Oncogenic beta-catenin is required for bone morphogenetic protein 4 expression in human cancer cells. *Cancer Res*. 2002 May 15;62(10):2744-8.
67. Koike M, Kose S, Furuta M, Taniguchi N, Yokoya F, Yoneda Y, et al. beta-Catenin shows an overlapping sequence requirement but distinct molecular interactions for its bidirectional passage through nuclear pores. *J Biol Chem*. 2004 Aug 6;279(32):34038-47.