



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

DIANA MARCELA MEJÍA GRANADOS

CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E MOLECULAR NA
LIPOMATOSE MÚLTIPLA FAMILIAL

CAMPINAS

2018

DIANA MARCELA MEJÍA GRANADOS

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E MOLECULAR NA
LIPOMATOSE MÚLTIPLA FAMILIAL**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências Médicas, área de concentração Genética Médica.

ORIENTADOR: PROF.DR. CARLOS EDUARDO STEINER

COORIENTADORA: PROFA. DRA. CARMEN SÍLVIA BERTUZZO

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna **DIANA MARCELA MEJÍA GRANADOS** e orientada pelo **PROF. DR. CARLOS EDUARDO STEINER**

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, 01P3368/2017

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2233-7387>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

M479c Mejía Granados, Diana Marcela, 1986-
Caracterização clínica e molecular na lipomatose múltipla familiar / Diana Marcela Mejía Granados. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Carlos Eduardo Steiner.
Coorientador: Carmen Sílvia Betuzzo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Lipomatose múltipla familiar. 2. Genética molecular. 3. Hereditariedade. 4. Proteína HMGA2. 5. Sequenciamento de nova geração. I. Steiner, Carlos Eduardo, 1969-. II. Bertuzzo, Carmen Sílvia, 1963-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Clinical and molecular characterization of familial multiple lipomatosis

Palavras-chave em inglês:

Familial multiple lipomatosis

Molecular genetics

Heredity

HMGA2 protein

Next-generation sequence

Área de concentração: Genética Médica

Titulação: Mestra em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Carlos Eduardo Steiner [Orientador]

Andréa Trevas Maciel Guerra

Camila Andréa de Oliveira

Data de defesa: 30-01-2018

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO
DIANA MARCELA MEJÍA GRANADOS

ORIENTADOR: PROF. DR. CARLOS EDUARDO STEINER

MEMBROS:

1. PROF. DR. CARLOS EDUARDO STEINER

2. PROF^a. DR^a. ANDRÉA TREVAS MACIEL GUERRA

3. PROF^a. DR^a. CAMILA ANDRÉA DE OLIVEIRA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 30/01/2018

À memória da
minha querida e sábia avó, Lolita.

AGRADECIMENTOS

Desejo expressar o meu profundo agradecimento ao Professor Doutor Carlos Eduardo Steiner, por ter me acolhido desde o primeiro momento da minha chegada neste encantador país. Agradeço-lhe a oportunidade de eu poder conhecer o Serviço de Genética Médica da Unicamp e de se oferecer na orientação e revisão deste trabalho. Sua paciência e ensinamentos constantes foram e serão fundamentais para a minha senda científica e profissional.

À Professora Doutora Carmen Sílvia Bertuzzo, coorientadora deste trabalho, agradeço a sua humildade, otimismo transbordante e confiança em mim depositada para a execução desse projeto. Você me demonstrou que não existem barreiras que não possam ser superadas com determinação e perseverança.

Agradeço também a todos os pacientes e cada um de seus familiares que aceitaram participar desta pesquisa e permitiram a construção deste trabalho.

Aos integrantes da equipe do Laboratório de Genética Molecular da Faculdade de Ciências Médicas, especialmente meus colegas Luciana Cardoso Bonadia, Marilza Santos Silva, Marcella Bergamini de Baptista, Luciana Montes Rezende, Stéphanie Vila-Nova Pereira; Ilária Cristina Sgardioli, Cynthia Silveira e Roby Will Vencatto, que com sua experiência, paciência e gentileza lograram guiar meus primeiros passos na biologia molecular.

Aos meus amigos Maria Dora Jazmin Lacarrubba Flores, Saúl Lindo, Joana Rosa Marques Prota, Helena Tadiello de Moraes e Carolina Valencia, por coincidir no meu caminho e por ter me oferecido a sua solidariedade e assistência em todo momento.

À Rosana Eugênia Soares Elias Lugli, por se tornar a minha mãe adotiva e por conquistar o meu coração com a sua delicadeza e doçura.

Às Professoras Doutoradas Cláudia Viana Maurer Morelli, Antonia Paula Marques de Faria, Andréa Trevas Maciel Guerra, Vera Lúcia Gil da Silva Lopes e Mônica Barbosa de Melo por sua preocupação, boa vontade e apoio nos períodos mais críticos deste processo.

Ao meu melhor amigo, cúmplice e esposo, Julián Ávila Díaz. Obrigada meu bem por ter me escolhido como a sua colega de viagem. Com você aprendi que para ir longe é necessário possuir um espírito criativo e disciplinado. Você tem me ajudado a evoluir e ser melhor pessoa cada dia.

Finalmente, aos melhores conselheiros do meu universo, meus pais Juan Bautista, Ana Mercedes e a meu irmãozinho Dieguito. Obrigada por fazerem parte da minha vida e dos meus sonhos. Junto a vocês compreendi que o sucesso se constrói a partir dos riscos e das oportunidades que surgem a cada instante nas nossas vidas. Mesmo estando longe vocês sempre representarão meu principal estímulo de luta e determinação. Amo vocês infinitamente.

Somente como guerreiro pode-se suportar o Caminho do Conhecimento.

Um guerreiro não pode queixar-se nem lamentar nada.

*Sua vida é um desafio interminável,
e não há modo de que os desafios possam ser bons ou maus.*

Os desafios são simplesmente desafios.

A Roda do Tempo

Carlos Castaneda

RESUMO

A Lipomatose Múltipla Familiar (LMF) é um transtorno autossômico dominante da hipoderme, caracterizado pela formação lenta e progressiva de nódulos encapsulados de tecido adiposo não dolorosos distribuídos em tronco e extremidades. Acomete na sua maioria indivíduos adultos a partir da quarta década de vida. Por não existir uma etiologia definida e ser confundida com outras síndromes dermatológicas, sua base molecular e biológica precisa ser melhor compreendida. Estudos prévios em tecido tumoral sugerem que aproximadamente 70% dos lipomas esporádicos são decorrentes de rearranjos citogenéticos envolvendo a banda 12q13-15. Isto leva a variações na expressão do gene *HMGA2* (*High Mobility Group AT-hook 2*) que codifica proteínas não histonas responsáveis por alterações conformacionais do DNA, proliferação celular aberrante e desenvolvimento de tumores benignos de tecidos mesenquimais. O objetivo desse trabalho foi realizar uma caracterização clínica e molecular em DNA constitucional de sete indivíduos pertencentes a cinco famílias não aparentadas com LMF. Para a análise do gene candidato *HMGA2* foi usada a técnica de sequenciamento por Sanger. Para o estudo de outros genes envolvidos em lipomatoses síndrômicas como o *AKT1*, *APC*, *PIK3CA*, *MEN-1* e o *PTEN* foi utilizado sequenciamento de alta performance. Os resultados clínicos na presente amostra mostram uma frequência aumentada da LMF em mulheres a partir dos 28 anos com IMC acima de 25. Além disso, presume-se que esta condição possa estar relacionada a comorbidade gastrointestinal tanto benigna quanto maligna e com achados histopatológicos que indicam um padrão típico de angiolipomas. Duas variantes idênticas foram achadas no éxon 5 do gene *HMGA2* em dois pacientes de famílias distintas. Porém as análises *in silico* feitas mediante diversos algoritmos revelaram resultados contraditórios. Não houve alterações adicionais nos éxons 2 a 4 do gene *HMGA2*. O painel gênico dos genes *AKT1*, *APC*, *PIK3CA*, *MEN-1* e o *PTEN* foi normal em todos os pacientes. Em resumo, a LMF é uma doença heterogênea com expressividade variável ampla, que precisa de novas pesquisas para estabelecer uma base genética mais acurada, facilitando seu diagnóstico, abordagem clínica e aconselhamento genético.

Palavras-chave: lipomatose múltipla familiar, caracterização molecular, autossômica dominante, *HMGA2*, sequenciamento de nova geração.

ABSTRACT

Familial Multiple Lipomatosis (FML) is an autosomal dominant disorder of the hypodermis characterized by the slow-growing of encapsulated non-painful fatty nodules spread across the limbs and trunk. Adults over the age of 40 are commonly affected and sometimes this disorder overlaps with other dermatological syndromes, due to its aesthetic features. Currently, a specific etiology has not been identified, therefore, its molecular and biological basis needs to be better understood. Previous studies focused only on tumoral tissue/specimen suggested that around 70% of sporadic lipomas result from cytogenetic rearrangements involving the 12q13-15 band. This leads to deregulated expression of the *HMGA2* (High Mobility Group AT-hook 2) gene which encodes non-histones chromatin proteins responsible for DNA conformational changes, aberrant cell proliferation and development of benign mesenchymal tumors. This study aimed to perform a clinical and molecular characterization from constitutional DNA of seven individuals belonging to five unrelated families diagnosed with FML. *HMGA2* gene analysis was made using Sanger sequencing. Other candidate genes, such as *AKT1*, *APC*, *PIK3CA*, *MEN-1* and *PTEN* which are associated with syndromic lipomatosis, were investigated by Next- Generation high throughput sequencing techniques. Clinical results showed an increased frequency of FML among women reaching the age of thirty and who presented a BMI greater than 25. We observed that some FML cases were associated with both, benign and malignant gastrointestinal comorbidity. Regarding the histopathological findings in FML, there was a predominance of angiolipomatous lesions. Two identical variants were found in exon 5 of the *HMGA2* gene in two members of different families. *In silico* analysis of those alterations revealed contradictory results. There were no additional changes in exons 2 to 4 of the *HMGA2* gene. Multi-gene panel of *AKT1*, *APC*, *PIK3CA*, *MEN-1* and *PTEN* was normal in all cases. In summary, FML is a heterogeneous medical condition with variable expressivity. More research needs to be addressed covering other genes to establish accurate genetic basis to facilitate its diagnosis, clinical management and genetic counseling.

Keywords: Familial multiple lipomatosis, molecular characterization, autosomal dominant, *HMGA2*, next generation sequencing.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT1	Gene RAC-alfa serina/treonina proteína quinase
AP-1	Fator de transcrição ativador de proteína
APC	Gene da polipose adenomatosa do cólon
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
dNTP	Deoxyribonucleotide Triphosphate (desoxirribonucleotídeos trifosfatos)
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i> (ácido etilenodiamino tetra-acético)
EMT	<i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i> (transição epitelial mesenquimal)
E₂F₁	Fator de Transcrição E ₂ F ₁
E₄F₁	Fator Repressor Transcricional
ExoSap	<i>Exonuclease I Shrimp Alkaline Phosphatase</i> (exonuclease I e fosfatase alcalina de camarão)
FATHMM	<i>Functional Analysis Through Hidden Markov Models</i> (análise funcional mediante modelos ocultos de Markov)
FISH	<i>Fluorescent in situ Hybridization</i> (hibridização fluorescente <i>in situ</i>)
Fos	Gene do Osteosarcoma Finkel-Biskis-Jinkis
G1	Fase Gap 1
HDAC1	Histona Deacetilase 1
Hi-Di	Highly Deionized
HMG	<i>High Mobility Group</i> (proteínas do grupo de alta mobilidade)

HMGA	<i>High Mobility Group AT-Hook</i> (proteínas do grupo de alta mobilidade, motivos AT-hook)
HMGA1	<i>High Mobility Group A2 gene</i> (gene que codifica as proteínas do grupo de alta mobilidade tipo A1)
HMGA2	<i>High Mobility Group A2 gene</i> (gene que codifica as proteínas do grupo de alta mobilidade tipo A2)
HMGA2Tr	Proteína HMGA2 truncada
HMGB	<i>High Mobility Group Box</i> (proteínas do grupo de alta mobilidade com domínio Box)
HMGI-C	<i>High Mobility Group Protein Isoform I-C</i> (proteínas do grupo de alta mobilidade isoforma I-C)
HMGN	<i>High Mobility Group Nucleosome Binding</i> (proteínas do grupo de alta mobilidade de ligação a nucleossomo)
IL	Interleucina
IMC	Índice de Massa Corporal
Let-7	<i>Lethal-7</i>
LMF	Lipomatose Múltipla Familiar
LMS	Lipomatose Múltipla Simétrica
LPP	<i>Lipoma Preferred Partner Gene</i>
MEN-1	Gene da Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 1
miRNA	Micro RNA
NER	<i>Nucleotide Excision Repair</i> (reparo por excisão de nucleotídeos)
NF1	Neurofibromina
pb	Pares de Bases

pCAF	Fator Associado p300/CBP Acetiltransferase
PIK3CA	Fosftidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase, subunidade catalítica alfa
PCR	Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)
pRB	Proteína do Retinoblastoma
PROVEAN	<i>Protein Variation Effect Analyzer</i> (analisador de efeito de variação de proteína)
PTEN	Gene da Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatase
rpf	<i>Retroperitoneal Fat</i> (gordura retroperitoneal)
RSB	<i>Reaction Stop Buffer</i> (tampão de parada de reação)
RT-PCR	<i>Reverse transcription Polymerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa)
SC	<i>Super Cluster</i>
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
sf	<i>Subcutaneous Fat</i> (gordura subcutânea)
SIFT	Sorting Intolerant from Tolerant
Ta	Temperatura de Anelamento
Taq	<i>Thermus Aquaticus</i>
TBE	Tris-acetato-EDTA
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Tris	Tris (hidroximetil) Aminometano
TrisHCl	Tris Hydrochloride (tris hidrocloreto)
UTR	<i>Untranslated Region</i> (região não traduzida)
VEP	Variant Effect Predictor

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 Diagnósticos diferenciais da LMF.....	28
Tabela 2 <i>Primers</i> utilizados nas reações de PCR e sequenciamento.....	51
Tabela 3 Resumo das características clínicas dos sujeitos com LMF.....	56

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Pág.
Figura 1 Pintura mostrando a “Mona Lisa”.....	20
Figura 2 Expressão de <i>HMGA2</i> na adipogênese e formação de lipoma.....	23
Figura 3 Aspecto histológico de um lipoma.....	24
Figura 4 Lipomas múltiplos.....	25
Figura 5 Diagnósticos diferenciais da LMF.....	27
Figura 6 Representação da translocação mais comum em lipomas t(3;12)(q28;q14).....	31
Figura 7 Níveis de expressão dos éxons 1-2 e 4-5 de <i>HMGA2</i> em tumores lipomatosos.....	33
Figura 8 Classificação das proteínas do grupo de alta mobilidade HMG.....	34
Figura 9 Representação esquemática das proteínas do grupo de alta mobilidade subfamília A (HMGA) em humano.....	35
Figura 10 a) Ideograma do cromossomo 12, banda 12q14.3 e posição genômica do gene <i>HMGA2</i> (49). b) Representação do gene <i>HMGA2</i>	36
Figura 11 Esquema representativo da ação das proteínas HMGA.....	37
Figura 12 I. Etapas da ativação do fator de transcrição E2F1 pelo grupo de alta mobilidade subfamília A2 (HMGA2). II. Esquema do efeito mediado pelas proteínas HMGA2 sobre o complexo AP1.....	39
Figura 13 Níveis de expressão do gene <i>HMGA2</i> em tecidos adultos normais.....	41
Figura 14 Análise do tecido adiposo por Ressonância Magnética em três tipos de camundongos.....	42

Figura 15	Perda de repressão de <i>HMGA2</i> mediada por microRNA (miRNA) em tumores mesenquimatosos.....	44
Figura 16	Papel da família Let-7.....	45
Figura 17	Condições utilizadas na PCR.....	52
Figura 18	Condições utilizadas na reação de sequenciamento.....	53
Figura 19	Heredograma representativo da família A.....	57
Figura 20	Heredograma representativo da família B.....	57
Figura 21	Heredograma representativo da família C.....	58
Figura 22	Heredograma representativo da família D.....	58
Figura 23	Heredograma representativo da família E.....	59
Figura 24	Parte dos lipomas presentes em membros no caso A.....	59
Figura 25	Parte dos lipomas presentes em membros e cicatriz da exérese no caso B1.....	60
Figura 26	Aspecto histológico de um dos lipomas presentes no caso B1.....	60
Figura 27	Parte dos lipomas presentes em antebraços, abdome e coxa no caso B2.....	61
Figura 28	Aspecto histológico de um dos lipomas presentes no caso C.....	61
Figura 29	Parte dos lipomas presentes em antebraços no caso D1.....	62
Figura 30	Aspecto histológico de um dos lipomas presentes no caso D1.....	62
Figura 31	Amplificação dos éxons 2 e 3 do gene <i>HMGA2</i> por PCR.....	63
Figura 32	Amplificação dos éxons 4 e 5 do gene <i>HMGA2</i> por PCR.....	63
Figura 33	Eletoferograma com alterações no éxon 5 do gene <i>HMGA2</i>	64

SUMÁRIO

	Pág.
1- INTRODUÇÃO.....	19
1.1- Lipomatose múltipla familiar.....	19
1.2- História.....	19
1.3- Epidemiologia.....	20
1.4- Padrão de herança.....	21
1.5- Fisiopatologia.....	21
1.6- Quadro clínico.....	23
1.7- Condições clínicas concomitantes à LMF.....	25
1.8- Diagnóstico.....	26
1.9- Diagnósticos diferenciais.....	26
1.10- Tratamento.....	30
1.11- Descoberta do gene HMGA2 em estudos de tumores mesenquimais: a linhagem somática.....	30
1.11.1- Grupo de proteínas de alta mobilidade (HMG).....	32
1.11.2- Grupo de alta mobilidade, subfamília A (HMGA).....	34
1.11.3- Gene <i>HMGA2</i>	35
1.11.4- Mecanismo de ação e transformação do grupo HMGA. O destaque do gene <i>HMGA2</i>	35
1.11.5- HMGA2 na proliferação e diferenciação celular durante o desenvolvimento.....	40
1.11.6- <i>HMGA2</i> e a hipótese da tumorigênese.....	43
1.11.7- <i>HMGA2</i> e tumores benignos não mesenquimais.....	43
1.11.8- <i>HMGA2</i> em neoplasias malignas.....	43
1.11.9- <i>HMGA2</i> e a sua relação com os miRNAs.....	44
1.12- Justificativa.....	46

2- OBJETIVOS.....	47
2.1- Objetivo Geral.....	47
2.2- Objetivos Específicos.....	47
3- CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	48
3.1- Aspectos éticos.....	48
3.2- Características da população.....	48
3.3- Procedimentos e Estratégia de estudo.....	49
3.3.1- Coleta de dados retrospectivos.....	49
3.3.2- Coleta de dados prospectivos.....	49
3.3.3- Extração de DNA.....	49
3.3.4- Sequenciamento.....	50
4- RESULTADOS.....	55
4.1- Clínicos.....	55
4.2- Moleculares.....	62
5- DISCUSSÃO.....	66
6- CONCLUSÕES.....	69
7- REFERÊNCIAS.....	70
8- APÊNDICE.....	77
8.1-Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	77
9- ANEXO.....	82
9.1- Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa.....	82

INTRODUÇÃO

1.1- Lipomatose múltipla familiar

A Lipomatose Múltipla Familiar (LMF, OMIM%151900) é um transtorno autossômico dominante da hipoderme, caracterizado pela formação lenta e progressiva de nódulos encapsulados de tecido adiposo não dolorosos à palpação. Esta condição apresenta uma distribuição anatômica variável com localização preferencial em extremidades e tronco e usualmente acomete indivíduos do sexo masculino a partir da quarta década^(1,2). Embora na atualidade não exista uma etiologia definida, estudos prévios sugerem que ao menos uma parte dos casos de lipomas isolados sejam decorrentes de rearranjos citogenéticos envolvendo o braço longo do cromossomo 12, o que leva a variações na expressão do gene *HMGA2* (High Mobility Group A2) que codifica proteínas não histonas envolvidas nas alterações conformacionais do DNA e no desenvolvimento de tumores benignos dos tecidos mesenquimais⁽³⁾.

1.2- História

O reconhecimento de formações tumorais lipomatosas data do século XVI, desde o auge do renascimento. Dequeker et al. apontam que na mais notável obra de Leonardo da Vinci, “Mona Lisa”, pode ser visualizada uma discreta proeminência arredondada e bem definida na face dorsal da mão direita da mulher, que eventualmente poderia corresponder a um lipoma (Figura 1)⁽⁴⁾.

Em 1846, Sir Benjamin Brodie foi o primeiro a relatar dois indivíduos com lipomas simétricos localizados na nuca e, cinco anos mais tarde, foi feita pelos pesquisadores Addison e Gull outra descrição com a definição formal do termo - lipoma -^(6,7). Logo após, entre 1891 e 1892, Blaschko e Alsberg observaram uma incidência aumentada dos lipomas entre homens pertencentes a uma mesma família e, além disso, viram que os tumores se desenvolveram em diferentes idades, sendo manifestados desde início da puberdade até a idade adulta⁽⁸⁾.

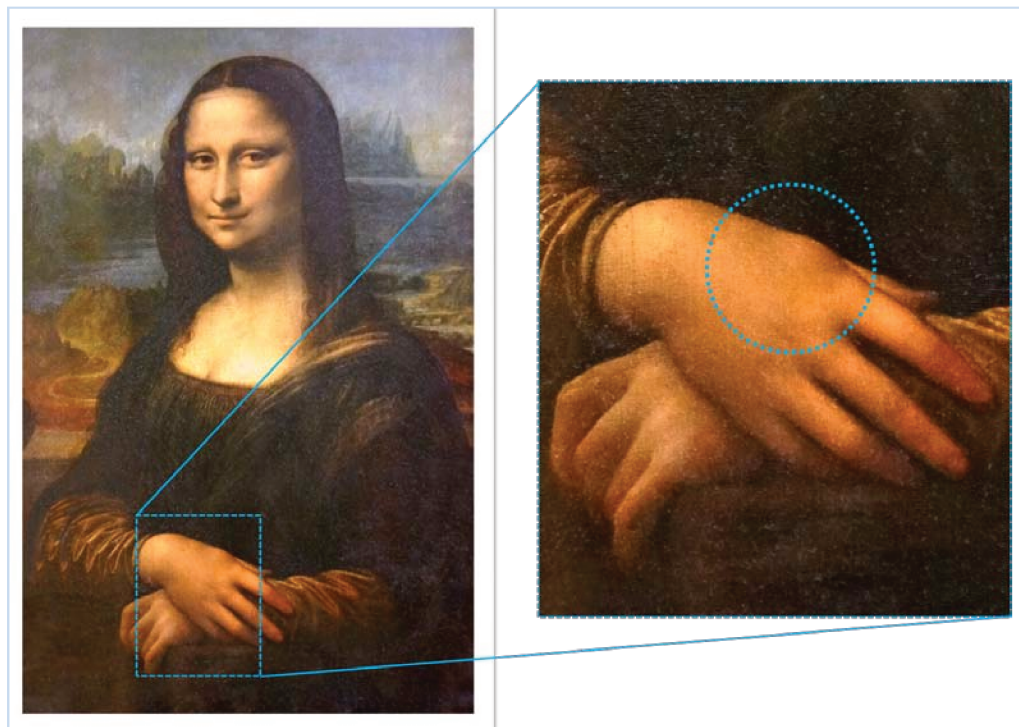


Figura 1- Pintura mostrando a “Mona Lisa”⁽⁵⁾.

Já nos anos subsequentes a 1933, Cockayne, Miller, Murchinson, Kurzweg e Spencer se dedicaram a descrever famílias com quadros altamente sugestivos de LMF⁽⁹⁻¹¹⁾. Finalmente em 1970 o cirurgião Das Gupta fez uma classificação dos tumores lipomatosos de acordo com seu comportamento, história natural, tamanho e distribuição em três categorias: solitários ou esporádicos, LMF e Lipomatose Múltipla Simétrica (LMS)^(12,13).

1.3- Epidemiologia

O lipoma é a neoplasia benigna mais comum dos tecidos moles em adultos e compreende quase metade de todos os tumores mesenquimatosos benignos. Raramente apresenta degeneração maligna. A incidência anual varia entre 1 a 2,1 afetados para cada 1000 pessoas⁽¹³⁾, sendo que a presença de múltiplos lipomas pode estar presente em 5% dos indivíduos⁽¹⁴⁾. Acredita-se, porém, que pode haver uma subestimativa dessas cifras, pois em muitas oportunidades somente são diagnosticados quando se tornam esteticamente desagradáveis,

ou quando causam dor ou prejuízos funcionais^(15,16). A incidência exata da LMF é desconhecida, mas calcula-se que aproximadamente 0,002% dos indivíduos da população geral possuem esse diagnóstico^(17,18). Devido à singularidade e natureza benigna da LMF, estudos pouco aprofundados têm sido realizados até o momento para confirmar esses dados.

Quanto à distribuição entre sexos, presume-se que esta condição exhibe uma predileção pelos homens, mostrando uma relação 2:1 ou superior (até 4,6:1) em relação às mulheres⁽¹⁷⁻²⁰⁾. No entanto, alguns autores afirmam que essa proporção é ainda mais próxima do 1:1^(2,17).

Embora a faixa etária média de aparecimento dos nódulos situe-se entre a terceira e quarta década da vida, este quadro pode ter início desde a infância ou adolescência, sendo que o pico máximo de formação dos lipomas é observado a partir dos 50 anos e atinge uma frequência elevada sujeitos com obesidade^(9,16).

1.4- Padrão de herança

Em referência à hereditariedade, o mecanismo de transmissão da LMF é frequentemente associado a um padrão autossômico dominante com penetrância completa; não obstante, há casos de provável herança autossômica recessiva e ligada ao sexo. Outras hipóteses se baseiam em etiologia multifatorial, onde condições locais como, por exemplo, eventos pós-trauma, disfunção do tecido adiposo, alterações endócrinas e suscetibilidade genética somado a fatores ambientais (radiação ionizante) e medicamentos (corticosteroides, quimioterápicos ou insulina) poderiam favorecer o crescimento nodular gradativo^(13,20-25).

1.5- Fisiopatologia

A expansão do tecido adiposo é observada durante o desenvolvimento normal, bem como na obesidade, e é resultado de dois processos que ocorrem em simultâneo: hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos. A hipertrofia é considerada o evento inicial e é secundária ao incremento do volume máximo dos adipócitos

maduros devido ao aumento da lipogênese e armazenamento unilocular de triglicerídeos. Por outro lado, a hiperplasia resulta da diferenciação e expansão clonal mitótica de células tronco pluripotentes e pré-adipócitos. Em lipomas a hipertrofia não ocorre com rapidez suficiente e, portanto, é necessária a geração de novos pré-adipócitos para continuar a expansão de massa de tecido celular subcutâneo. Assim, acredita-se que a expressão aumentada do gene *HMGA2* induz a hiperplasia e proliferação aberrante de adipócitos maduros diferenciados, a qual pode ou não estar associada ao estímulo dietético exógeno (Figura 2)⁽²⁶⁾.

Por outro lado, alguns autores apontam que os adipócitos de menor comprimento têm um efeito protetor sobre o metabolismo da glicose e a lipólise por sua maior afinidade pelos ácidos graxos livres e triglicerídeos, evitando seu acúmulo nos tecidos não adiposos como os do músculo esquelético, do pâncreas e do fígado. O tecido adiposo subcutâneo pode secretar alguns “fatores benéficos” tais como a adiponectina e leptina, os quais melhoram o metabolismo da glicose e dos lipídios mediante o aumento da sensibilidade à insulina⁽¹⁷⁾.

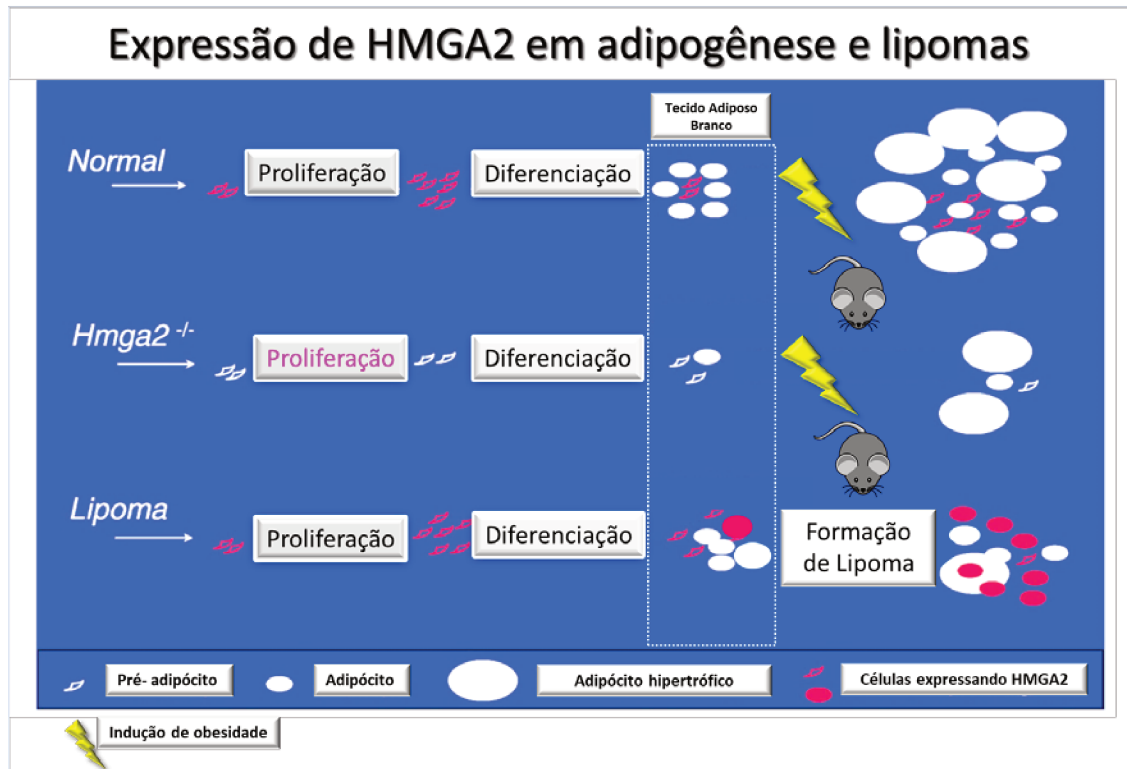


Figura 2- Expressão de *HMGA2* na adipogênese e formação de lipomas. Em camundongos normais a proliferação e a diferenciação dos pré-adipócitos ocorre de maneira regulada. Sob condições que induzem obesidade, a população de pré-adipócitos sofre expansão (hiperplasia) e uma maior capacidade de armazenamento de gordura (hipertrofia). Em camundongos *knockout Hmga2*^{-/-}, e sob condições que induzem obesidade, não existe expansão de pré-adipócitos e o aumento do peso é unicamente devido à hipertrofia. Em lipomas, a expressão alterada de *Hmga2* nos adipócitos maduros diferenciados leva a uma proliferação aberrante. Modificado de Ashar et al.⁽²⁶⁾.

1.6- Quadro clínico

No estrito sentido da palavra, o termo lipomatose é atribuído ao crescimento difuso e excessivo do tecido celular subcutâneo, mas geralmente também é usado para se referir à presença de vários lipomas^(7,15). Compostos por adipócitos maduros e demarcados por uma fina cápsula fibrosa são o tipo de

neoplasia mesenquimal benigna mais comum, que surge a partir do tecido gorduroso (Figura 3)⁽²⁷⁾. Com um amplo espectro clínico, os lipomas são considerados nódulos subcutâneos, móveis, de textura macia e mole, não dolorosos, distribuídos principalmente em extremidades e na região abdominal. Podem estar presentes em quantidades variáveis.

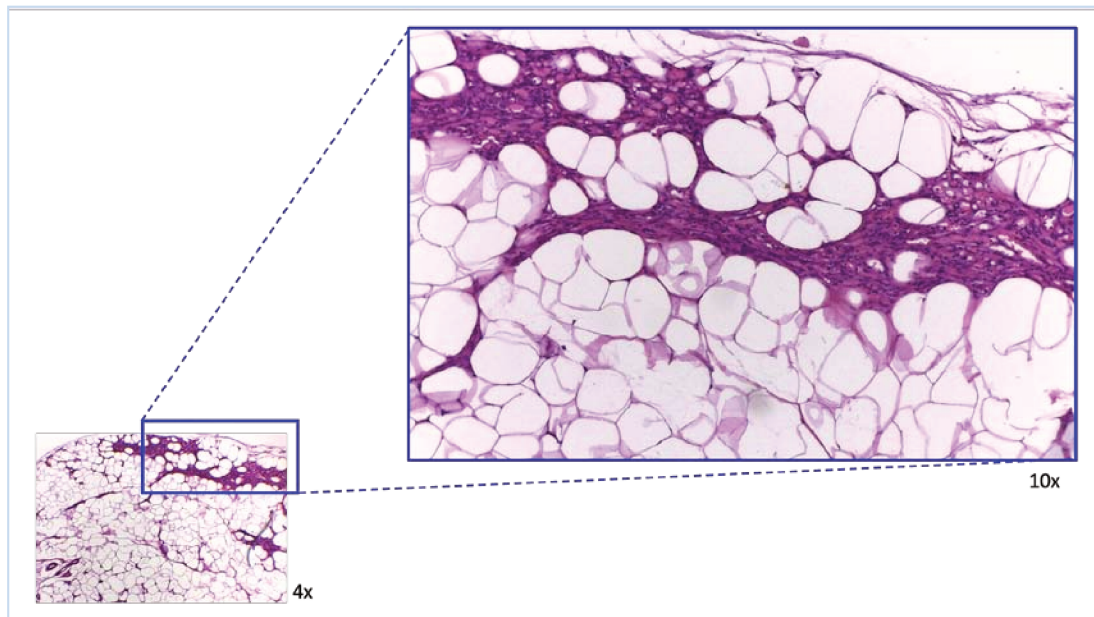


Figura 3- Aspecto histológico de um lipoma. Tecido adiposo maduro com variável quantidade de feixes colágenos e vasos sanguíneos. Arquivo do departamento de anatomia patológica - Faculdade de Ciências Médicas - Unicamp.

Segundo a sua localização anatômica são categorizados como superficiais ou profundos. Os primeiros são muito mais comuns, sendo que os profundos representam cerca de 1% dos casos⁽¹⁵⁾. A maioria dos lipomas mede menos de 5cm de diâmetro, mas existem relatos de lipomas gigantes de mais de 20cm de diâmetro. As lesões solitárias são mais comuns (80%), especialmente nas mulheres. Os lipomas múltiplos (lipomatose) (Figura 4) são mais comuns nos homens^(16,28,29).



Figura 4- Lipomas múltiplos. Mulher de 60 anos com múltiplos nódulos em antebraços. Arquivo do departamento de genética médica - Faculdade de Ciências Médicas - Unicamp.

Devido a seu padrão de crescimento progressivo, usualmente tendem a se manifestar depois da terceira década da vida, mas casos isolados podem acontecer na infância ou na adolescência. Aparentemente os homens são duas vezes mais afetados que as mulheres. Estes tipos de tumores só chegam a ser sintomáticos quando atingem dimensões extremas já que podem se sobrepor aos tendões ou estimular estruturas nervosas presentes na própria cápsula fibrosa, causando sensação de desconforto à manipulação, movimentação ou se forem submetidos a abrasão por roupas. Apesar de não alterar a qualidade da vida diária dos indivíduos, distúrbios psicológicos aparecem quando os lipomas são múltiplos e grandes⁽⁹⁾⁽³⁰⁾.

1.7- Condições clínicas concomitantes à LMF

Baseados em relatos de casos, já foram descritas algumas condições clínicas que se apresentaram concomitantemente à LMF, porém nem todas demonstraram representar uma associação causal propriamente dita. Entre os

exemplos reportados na literatura estão os tumores estromais e lipomatose. gastrointestinais, lipomas gigantes e invasivos do coração, lipoma cerebral. Além dessas condições, pode coexistir em contextos de trombose venosa profunda, doença celíaca e parkinsonismo. Finalmente pode se manifestar secundariamente a efeitos citotóxicos de tratamentos com quimioterápicos^(23,31-39).

1.8- Diagnóstico

O diagnóstico se faz por meio de anamnese e um exame físico minucioso. O ultrassom pode ser utilizado como estudo inicial e provê informações sobre a natureza, tamanho e profundidade das lesões, bem como sua relação com vasos sanguíneos, nervos e demais estruturas próximas, especialmente aquelas de difícil localização. A aparência típica consiste em uma massa elíptica ou arredondada paralela à superfície da pele a qual é hiperecoica em relação ao músculo adjacente. A análise mediante tomografia computadorizada de alta resolução geralmente pode ser diagnóstica, mesmo que a ressonância magnética mostre melhor definição dos tecidos moles. No entanto, o padrão ouro continua sendo a biópsia para estudo histopatológico, a qual vai confirmar a presença de vacúolos de tecido adiposo maduro rodeados por uma fina cápsula fibrosa^(19,21,27).

1.9- Diagnósticos diferenciais

A infiltração de gordura e a presença de múltiplos lipomas podem estar presentes em um grande número de síndromes, dependendo do mecanismo de mutação envolvido, seja por um evento somáticos, da função mitocondrial ou da linhagem germinativa⁽⁴⁰⁾ (Figura 5).

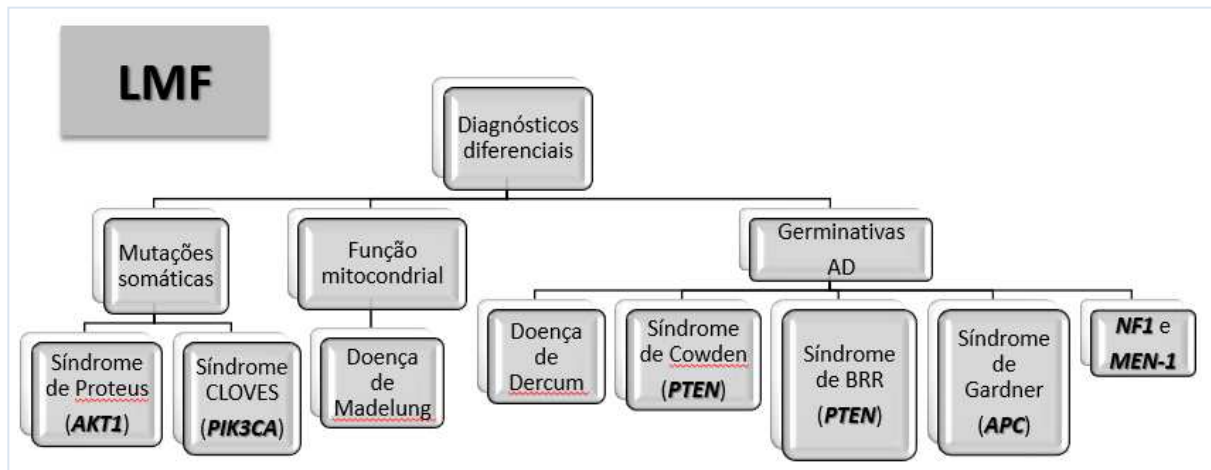


Figura 5- Diagnósticos diferenciais da LMF. **AKT1:** gene codificador da RAC-alfa serina/treonina proteína quinase; **APC:** gene codificador da polipose adenomatosa do cólon; **NF1:** gene codificador da neurofibromina 1; **PIK3CA:** gene codificador da fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase, subunidade catalítica alfa; **MEN-1:** gene codificador da neoplasia endócrina múltipla tipo 1; **PTEN:** gene codificador da fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatase. AD: autossômico dominante.

Estão descritas condições associadas cuja manifestação é unicamente o desenvolvimento de lipomas; por outro lado, existe o espectro onde os tumores lipomatosos, além de infiltrar o tecido celular subcutâneo, vêm acompanhados de outras anomalias. As semelhanças e diferenças são descritas na Tabela 1.

Tabela 1- Diagnósticos diferenciais da LMF^(1,30,40,43)

DOENÇA/SÍNDROME	HERANÇA	IDADE	CLÍNICA	GENE ASSOCIADO
Doença de Madelung (Lipomatose Múltipla simétrica)	Alteração da função mitocondrial	≥ 30 anos	Mais comum em homens. Massas de tecido adiposo não encapsulado no pescoço, ombros e tronco superior. Algumas vezes afetam o mediastino. Associada a consumo de álcool. Cursa com neuropatia.	
Doença de Dercum (Adipose Dolorosa)	AD	≥ 30 anos	Relação homem-mulher 1:5. Dor crônica (≥ 3 meses) do tecido adiposo das extremidades proximais, tronco e nádegas. Obesidade. Artralgias, distúrbios psiquiátricos (depressão e/ou ansiedade) alterações do sono. Múltiplos lipomas bem circunscritos.	Desconhecido. Etiologias propostas: disfunção do sistema nervoso, pressão mecânica sobre os nervos, disfunção do tecido adiposo e trauma.
Doença de Cowden	AD	Adultos	Obesidade, pólipos hamartomatosos do trato gastrointestinal, macrocefalia, triquilemomas, pápulas papilomatosas, risco aumentado de neoplasias benignas e malignas de tireoide, endométrio e mama. Lipomas subcutâneos.	PTEN
Síndrome de Proteus	Mutação somática	Infância	Hipercrescimento segmentário pós-natal afetando a arquitetura óssea. Lesões cutâneas como nevo cerebriforme do tecido conjuntivo e nevo verrucoso linear podem estar presentes. Macrodistrofia lipomatosa e alterações do sistema nervoso central são características.	AKT1
Síndrome CLOVES	Casos Isolados	Pré-natal	Hipercrescimento lipomatoso assimétrico, malformações vasculares, nevo epidérmico, anomalias esqueléticas e na coluna vertebral.	PIK3CA
MEN1	AD	Adultos	Combinação variável de mais de 20 tumores endócrinos e não endócrinos principalmente da glândula paratireoide, pituitária, tumores bem diferenciados gastro-entero-pancreáticos, tumores carcinóides e adrenocorticais.	MEN1
Síndrome de Bannayan-Riley-Ruvacalba	AD	Congênito	Macrocefalia, polipose hamartomatosa intestinal, lipomas, máculas hiperpigmentadas no glande do pênis.	PTEN
NF1	AD (50% de novo)	Infância	≥6 manchas café com leite >5 mm de diâmetro em pré-púberes ou >15 mm pós púberes; dois o mais neurofibromas; qualquer tipo de neurofibroma plexiforme; efélides axilares ou inguinais; glioma óptico; dois o mais nódulos de Lisch; displasia do esfenóides ou pseudoartrose da tibia; parente em primeiro grau acometido.	NF1
Síndrome de Gardner	AD	7-36 anos	Síndrome de predisposição ao câncer de cólon. ≥100 pólipos adenomatosos do cólon. Outras manifestações incluem: pólipos do fundus gástrico e duodeno, osteomas, anomalias dentárias, hipertrofia congênita do epitélio pigmentário da retina (CHRPE) e tumores de tecidos moles como lipomas ou lipofibromas.	APC

DOENÇA/ SÍNDROME	HERANÇA	IDADE	CLÍNICA	GENE ASSOCIADO
DOENÇA DE MADELUNG (Lipomatose Múltipla Simétrica)	Alteração da função mitocondrial	Homens A partir dos 30 anos	Massas de tecido adiposo não encapsulado no pescoço, ombros e tronco superior. Algumas vezes no mediastino. Associada a consumo de álcool. Cursa com neuropatia.	Mutação no DNA mitocondrial
DOENÇA DE DERCUM (Adipose Dolorosa)	AD	Relação homem/mulher 1:5 A partir dos 30 anos	Dor crônica do tecido adiposo das extremidades proximais, tronco e nádegas. Usualmente obesidade etiológica como disfunção do sistema nervoso, pressão mecânica generalizada, artralgias, distúrbios psiquiátricos como depressão e ansiedade, alterações do sono. Múltiplos lipomas bem circunscritos	Desconhecido, sendo propostas etiologias como disfunção do sistema nervoso, pressão mecânica sobre os nervos, disfunção do tecido adiposo e trauma
DOENÇA DE COWDEN	AD	Adultos	Obesidade, pólipos hamartomatosos de trato gastrointestinal, lesões mucocutâneas, risco aumentado de neoplasias malignas. Lipomas subcutâneos.	Mutação no gene PTEN
SÍNDROME DE PROTEUS	Mutação somática	Manifesta-se na infância	Distúrbio grave do sobre crescimento desproporcionado e assimétrico de qualquer tecido, nevus de tecido conectivo, nevus epidérmico, malformações vasculares. Lipomas.	Mutação do gene AKT1
SÍNDROME CLOVES (Congenital Lipomatous Overgrowth, Vascular malformations and Epidermal Nevi)	Casos Isolados	Sobre crescimento Pré-natal – Congênito	Hemihipertrofia, assimetria facial, malformações vasculares, nevo epidérmico linear, macrodactilia, sobre crescimento lipomatoso.	Mutação somática do gene PIK3CA
MEN 1 (Multiple Endocrine Neoplasia)	AD	6ª década	Combinação de vários tumores das paratireóides, das ilhotas do pâncreas, das células endócrinas, duodenais, hipófise anterior. Lipomas subcutâneos.	Mutação no gene MEN-1
SÍNDROME DE BANNAYAN-RILEY-RUVACALBA	AD	Desde a infância	Macrocefalia, autismo, pseudopapiledema, hemangiomas múltiplos, sobre crescimento. Lipomas.	Mutação no gene PTEN (Alelo da Doença de Dercum)
NF 1 (Neurofibromatose tipo 1)	AD 50% de novo	Desde a infância	Manchas café com leite, nódulos de Lisch, tumores fibromatosos da pele. Aumenta a susceptibilidade para tumores benignos e malignos	Mutação no gene NF1
SÍNDROME DE GARDNER (Polipose adenomatosa familiar tipo 1)	AD	Jovens	Desenvolvimento de centenas de pólipos adenomatosos no intestino grosso e no reto. Tem predisposição ao câncer. Lipomas e lipofibromas podem estar presentes.	Mutação no gene APC

Legenda: AD: autossômico dominante

1.10- Tratamento

A proposta terapêutica está dirigida a melhorar o aspecto estético das lesões. Poucos estudos têm sido feitos e as estratégias atuais se baseiam em relatos de casos. Dentro da via farmacológica estão recomendados: o uso de beta agonistas cujo mecanismo de ação é aumentar a lipólise adrenérgica e reduzir o acúmulo de gordura; o uso de agentes lipolíticos como os fibratos, a lecitina e as injeções subcutâneas de fosfatidilcolina também foram descritos, porém com eficácia questionável^(41,42). O tratamento invasivo consiste na remoção cirúrgica convencional ou mediante lipoaspiração assistida, a qual resulta uma excelente alternativa em casos de lipomas de tamanho mediano e múltiplos. Segundo Al Basti e cols, o uso desta técnica reduz a deformação das cicatrizes e garante a remoção de todo o tumor, evitando assim a recorrência em anos, e portanto, sendo uma opção minimamente invasiva, segura, simples e efetiva⁽²⁹⁾. Geralmente o prognóstico é bom por ser uma condição de evolução lenta e que raramente se torna maligna.

1.11- Descoberta do gene *HMGA2* em estudos de tumores mesenquimais: a linhagem somática

Desequilíbrios do gene *HMGA2* decorrentes de translocações que envolvem a região 12q13-15 são uma característica frequente nos tumores benignos de origem mesenquimal nos humanos, incluindo lipomas, leiomiomas uterinos, hamartomas condrais do pulmão, fibroadenomas de tórax e mama, pólipos endometriais, adenomas pleomorfos das glândulas salivais e angiomixomas⁽⁴⁴⁾.

Os lipomas têm sido amplamente analisados por citogenética com bandamento G em grandes séries de pesquisa e múltiplas aberrações estruturais foram encontradas, com frequências que oscilam entre 55 até 75%, principalmente em indivíduos adultos. Por sua vez, dentro desse grupo, ao redor de 75% apresentam cariótipos aparentemente balanceados. Alterações numéricas para este tipo de tumores são, entretanto raras e ocorrem ao acaso^(15,27).

Apesar do padrão de anomalias citogenéticas ser bastante heterogêneo, em lipomas isolados podem ser evidenciados eventos cariotípicos não aleatórios, os quais são classificados em quatro grupos principais dependendo da ordem de frequência:

1) Translocações envolvendo a banda 12q13-15

Dentro das aberrações cromossômicas encontradas no grupo dos lipomas, a $t(3;12)(q27-28;q13-15)$ está presente em 20% dos tumores (Figura 6). Na maioria dos casos, o ponto de quebra ocorre na extensão do terceiro íntron do *HMGA2* (>140 Kb) que separa os domínios de ligação do DNA (motivos AT-hook) do extremo ácido-terminal, resultando na desregulação da expressão, truncamento ou fusão com diversos genes, que acabam codificando transcritos que contém os primeiros três éxons do *HMGA2* e sequências ectópicas de outros genes que em ocasiões contribuem na adição de poucos aminoácidos^(45,46).

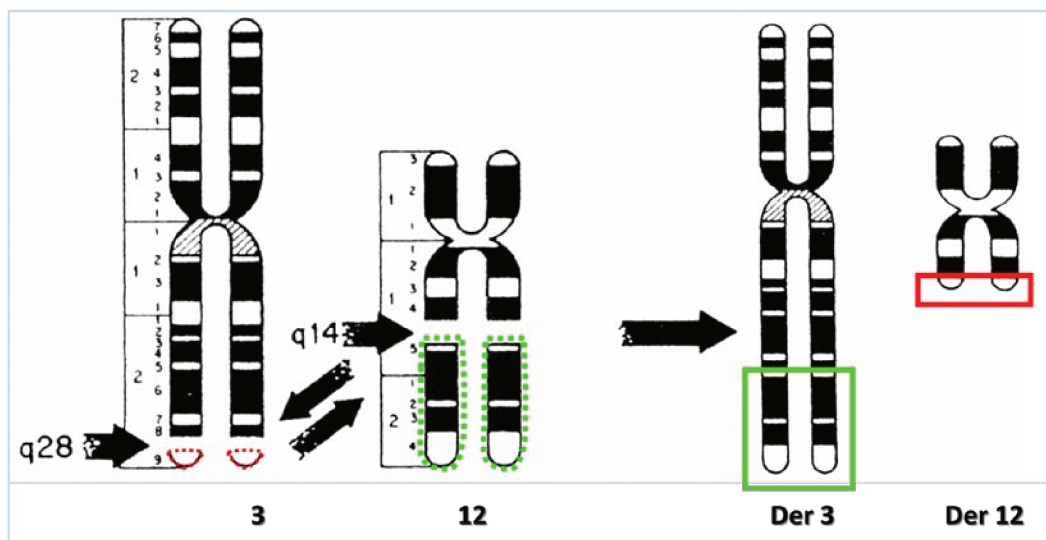


Figura 6- Representação da translocação mais comum em lipomas $t(3;12)(q28;q14)$. A ruptura em 12q14 envolve o gene *HMGA2* e em 3q28 envolve o gene *Lipoma Preferred Partner (LPP)*. Modificado de Sandberg AA⁽¹⁴⁾.

- 2) Deleção parcial do braço longo do cromossomo 13 (13q-).
- 3) Cromossomos em anel supranumerários (procedentes do cromossomo 12).
- 4) Rearranjos cromossômicos comprometendo a banda 6p21, que levam a disrupção do gene do grupo de alta mobilidade A1 (*HMGA1*).

Todo o exposto anteriormente sugere que o *HMGA2* estaria implicado na etiologia de tumores mesenquimatosos benignos e sua relevância no desenvolvimento de lipomas esporádicos está bem documentada (Figura 7).

1.11.1- Grupo de proteínas de alta mobilidade (HMG)

As proteínas do grupo de alta mobilidade (HMG) estão entre as mais abundantes e melhor caracterizadas proteínas nucleares e foram nomeadas de acordo ao seu comportamento de alta mobilidade eletroforética em gel de poliacrilamida^(44,47). Conhecidas como proteínas não-histonas associadas à cromatina, constituem uma classe heterogênea de moléculas que desempenham um papel fundamental na estrutura e função dos cromossomos, assim como na regulação da atividade gênica.

Estas proteínas têm a habilidade de reconhecer e se ligar a estruturas específicas do DNA ou da cromatina, independente da sequência de nucleotídeos através de seus motivos proteicos funcionais. Este grupo de proteínas não possui atividade transcricional intrínseca *per se*, mas estas são capazes de modular a transcrição de seus genes alvo alterando a estrutura da cromatina mediante acentuadores ou *enhancers*. Assim, são chamadas de fatores ou elementos arquitetônicos que facilitam e melhoram algumas atividades DNA-dependentes como transcrição, replicação, recombinação e reparo⁽⁴⁴⁾.

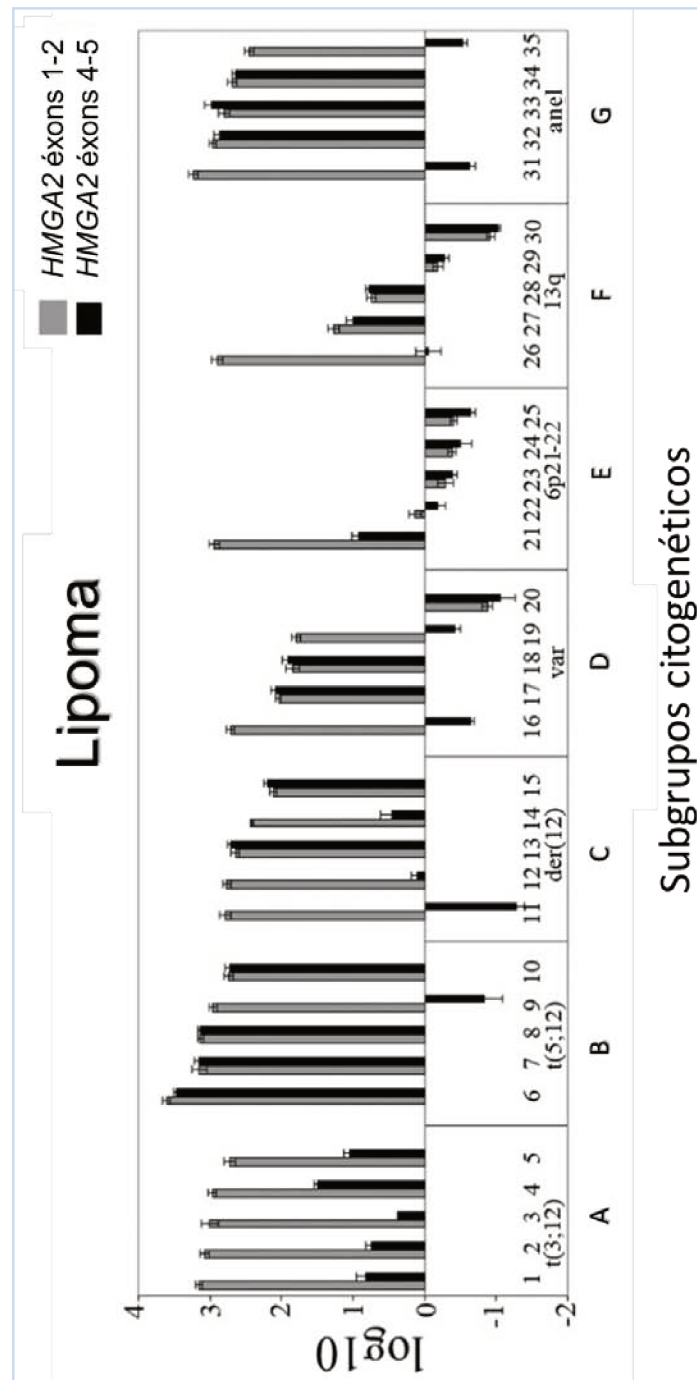


Figura 7- Níveis de expressão dos éxons 1-2 e 4-5 de *HMGA2* em tumores lipomatosos de sete subgrupos citogenéticos. Escala logarítmica ($\log_{10}$). Nível 0 corresponde à função basal esperada. **A)** t(3;12)(q27;q13-15); **B)** t(5;12)(q32-33;q14-15); **C)** Lipomas com vários outros rearranjos de 12q14-15; **D)** Lipomas sem qualquer das características citogenéticas conhecidas de lipoma; **E)** Rearranjo estrutural de 6p21-22; **F)** Deleção 13q; **G)** Cromossomos em anel. Modificado de Bartuma et al.⁽³⁾.

Com base em seus domínios de ligação ao DNA localizados na região amino-terminal, as HMG são subdivididas em três subfamílias: HMGA (contendo três pequenas repetições básicas chamadas *AT-hooks*), HMGB (contendo caixas HMG) e HMGN (contendo domínios de ligação aos nucleossomos) (Figura 8)^(45,48).

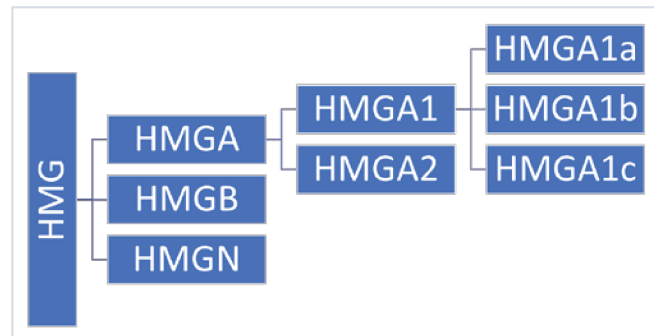


Figura 8- Classificação das proteínas do grupo de alta mobilidade HMG. Modificado de Ozturk et al.⁽⁴⁸⁾.

1.11.2- Grupo de alta mobilidade, subfamília A (HMGA)

A subfamília HMGA nos mamíferos é constituída por dois genes funcionais. O Grupo de Alta Mobilidade A1 (*HMGA1*), localizado no cromossomo humano 6 (6p21) e o Grupo de Alta Mobilidade A2 (*HMGA2*), mapeado na banda 12q14-15. Este último contém cinco éxons dispersos numa região genômica de ≥ 140 Kb e é considerado maior do que o *HMGA1* devido a possuir longos trechos nas regiões não traduzidas (UTR) 5' e 3' e ao tamanho de seu terceiro íntron⁽⁴⁴⁾.

O gene *HMGA1* dá origem a três transcritos, as isoformas HMGA1a (107 aminoácidos, 11.7 kDa), HMGA1b (96 aminoácidos, 10.6 kDa), HMGA1c (179 aminoácidos, 19.7 kDa), enquanto o transcrito do gene *HMGA2* gera uma proteína completa de 109 aminoácidos e 12kDa. À exceção de HMGA1c, todas conservam alta homologia na sequência de aminoácidos ($\pm 55\%$) e contêm três domínios de ligação ao DNA independentes localizados em éxons diferentes e um extremo ácido C-terminal. Essa característica determina a preferência de ligação das proteínas HMGA tanto nos trechos de DNA ricos em adenina-timina (motivos *AT hook*) do sulco menor, quanto para a união nos nucleossomos (Figura 9)⁽⁴⁴⁾.

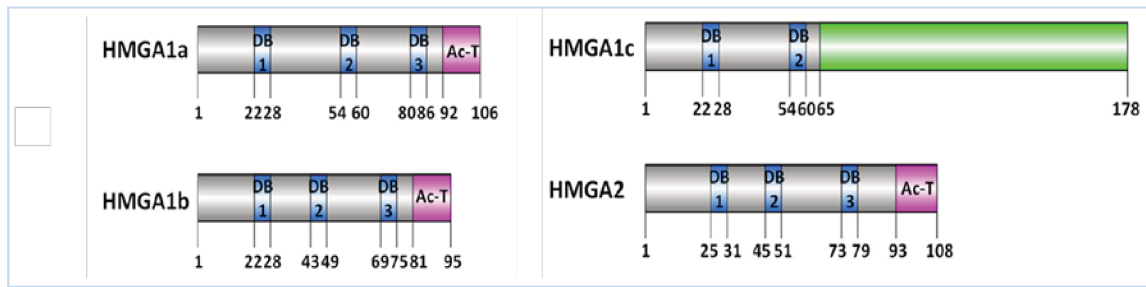


Figura 9- Representação esquemática das proteínas do grupo de alta mobilidade subfamília A (HMGA) em humanos. As proteínas HMGA1a, HMGA1b, HMGA1c e HMGA2 contêm domínios específicos de ligação ao DNA (azul), com um motivo *AT-hook* característico e um domínio ácido C terminal (rosa). À exceção de HMGA1c, todas as demais proteínas conservam alta homologia e contêm três domínios de ligação ao DNA. Modificado de Ozturk et al.⁽⁴⁸⁾.

1.11.3- Gene *HMGA2*

O gene *HMGA2* tem múltiplos pontos de iniciação no trecho altamente polimórfico da região 5' UTR. Os três motivos *AT-hook* são codificados pelos éxons 1 e 3; o domínio ácido deriva do éxon 5; e finalmente o éxon 4 codifica uma pequena região que liga o terceiro motivo *AT-hook* à cauda ácida da proteína *HMGA2* (Figura 10)⁽¹⁴⁾. A função do extremo ácido C-terminal ainda não foi totalmente compreendida, mas acredita-se que contribui na modulação das interações proteína-proteína e pode potencializar a atividade dos fatores de transcrição⁽⁴⁴⁾.

1.11.4- Mecanismo de ação e transformação do grupo HMGA. O destaque do gene *HMGA2*

Como mencionado, as proteínas HMGA têm funções na montagem e modulação de macromoléculas que estão envolvidas em vários processos biológicos, através da ligação direta ao DNA, modificando sua conformação e consequentemente facilitando sua união a diferentes fatores de transcrição gerando complexos multiproteicos estereoespecíficos.

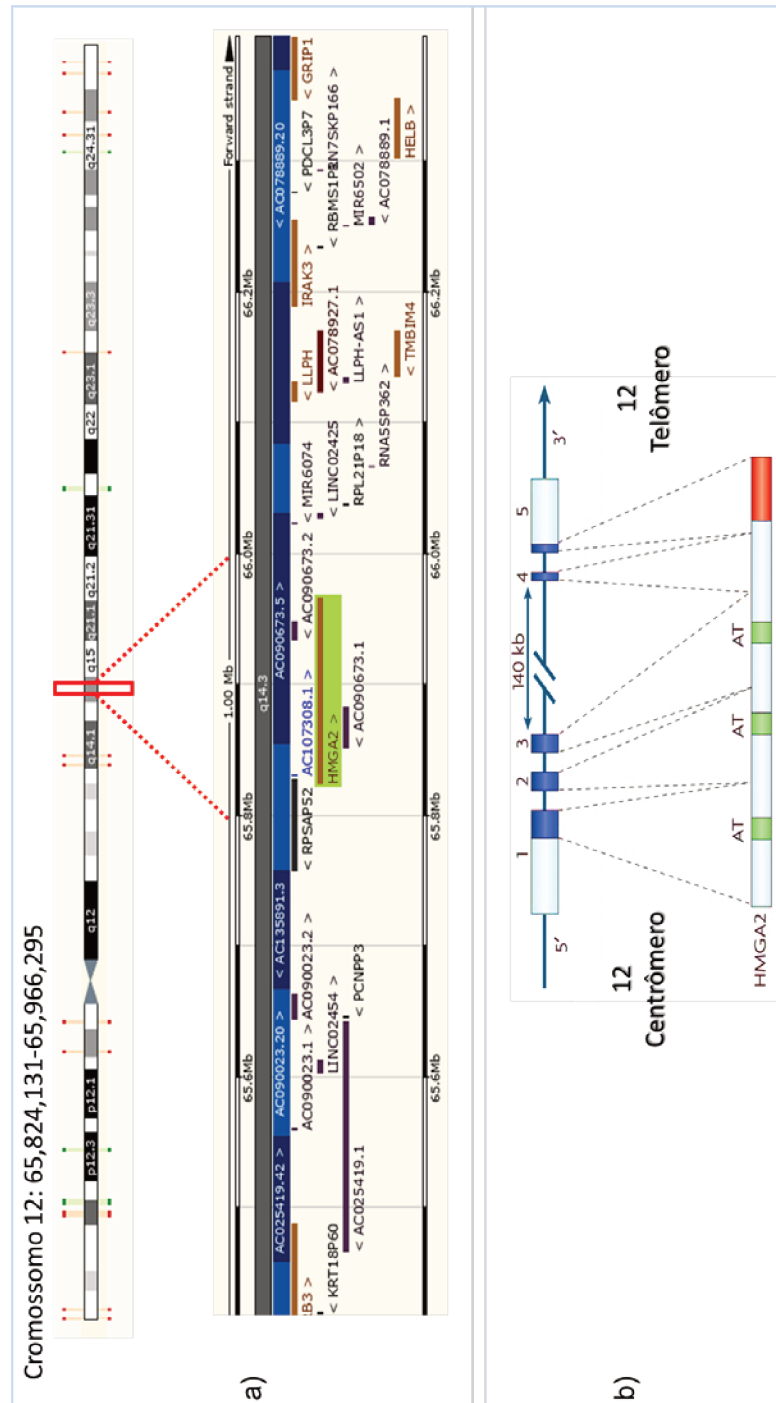


Figura 10- **a)** Ideograma do cromossomo 12, banda 12q14.3, e posição genômica do gene *HMGA2*⁽⁴⁹⁾. **b)** Representação do gene *HMGA2*. Constituído por cinco éxons abrange mais de 140 Kb. Os éxons 1 ao 3 codificam um domínio AT-hook. O éxon 4 codifica uma região espaçadora que não possui homologia com o grupo de alta mobilidade A1 (HMGA1). Finalmente, o quinto éxon codifica a cauda ácido C terminal (bloco vermelho). Modificado de Fusco A et al.⁽⁴⁵⁾.

A ativação e a expressão gênica são feitas pela interação entre complexos e as regiões livres potencializadoras ou *enhancers* dos nucleossomos (Figura 11). Elas também podem influenciar a transcrição gênica por meio da interação proteína-proteína com os fatores de transcrição modificando sua conformação e acentuando a afinidade das ligações ao DNA. Finalmente, possuem a habilidade de alterar a cromatina mediante o reconhecimento de regiões ricas em sequências AT independentes da topologia dos domínios do DNA, deslocando assim a histona 1 (H1)⁽⁴⁵⁾.

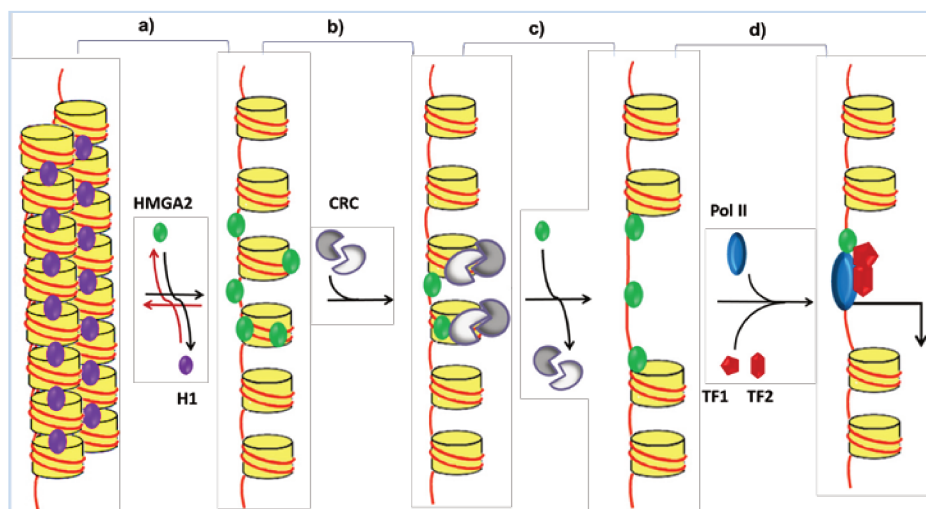


Figura 11- Esquema representativo da ação das proteínas HMGA (ovais verdes).
a) Mediante ligações específicas ao DNA, as proteínas HMGA competem e deslocam a histona 1 (H1) fazendo com que ocorra descompactação da cromatina. **b)** O afrouxamento da cromatina induz a ancoragem e recrutamento de complexos remodeladores (estruturas cinzas). **c)** A ligação deste complexo é reforçada pelas proteínas HMGA e levam ao despejo das histonas à mobilização dos octâmeros de histonas. **d)** Os eventos de remodelação da cromatina tornam acessível o DNA aos fatores de transcrição (pentágono e hexágono vermelhos). As proteínas HMGA facilitam a formação de complexos de transcrição que se ligam a sequências específicas do DNA. Por fim, a RNA polimerase II (Pol II, oval azul) é recrutada para dar início à transcrição. Modificado de Ozturk N et al.⁽⁴⁸⁾.

O mecanismo de ação do grupo HMGA é bastante amplo e abrange uma diversidade de processos dinâmicos que incluem mudanças da configuração dos cromossomos e da cromatina (descondensação) a curto e longo alcance; inibição dos sistemas de reparo do DNA, como por exemplo, o mecanismo por excisão de nucleotídeos (NER); regulação da transcrição e expressão gênica, assim como da interação proteínas-proteína; regulação da expressão de proteínas implicadas na resposta inflamatória; formação de *enhancers*; modificações pós-traducionais (fosforilação, acetilação e metilação); integração e expressão de retrovírus; inativação da apoptose induzida por p53; entre outros^(44,45).

A seguir alguns desses mecanismos explicados em detalhe:

a) Indução da atividade do fator de transcrição E_2F_1

Dados recentes indicam que o gene *HMGA2* potencializa a atividade do E_2F_1 mediante a sua ligação à proteína do retinoblastoma (pRB). Essas duas proteínas são fundamentais no controle da fase de síntese de DNA no ciclo celular. O processo de potencialização ocorre através de quatro etapas: **1)** ligação HMGA2-pRB; **2)** Deslocamento da histona deacetilase 1 (HDAC1); **3)** Recrutamento de histonas acetilases (pCAF/p300) o qual atenua a repressão transcricional; **4)** As histonas acetilases agem no E_2F_1 , estabilizando-o na forma livre ativa; **5)** Liberação do complexo HMGA2-pRB do E_2F_1 (Figura12-I).

b) Indução da expressão da Ciclina A

O *HMGA2* intervém direta ou indiretamente com o ciclo celular devido a seu efeito sobre o E_2F_1 e o fator repressor transcricional E_4F_1 , os quais regulam a expressão de várias ciclinas (entre elas a ciclina A) e outras proteínas fundamentais para a entrada na fase de síntese do DNA do ciclo celular e a transição da fase G2 para a mitose. Outra forma do gene *HMGA2* de induzir a expressão da ciclina A é mediante ativação do complexo transcricional AP1. Este último está composto por três proteínas JUN (Jun, JunB e JunD), quatro proteínas Fos (Fos, FosB, FRA1 ou FosL1) e FRA2 ou FosL2, as quais geram uma ampla variedade de homo e heterodímeros que se ligam às mesmas sequências de DNA e são encarregadas da ativação de genes alvo responsáveis pela proliferação celular, tumorigênese e metástase (Figura12-II).

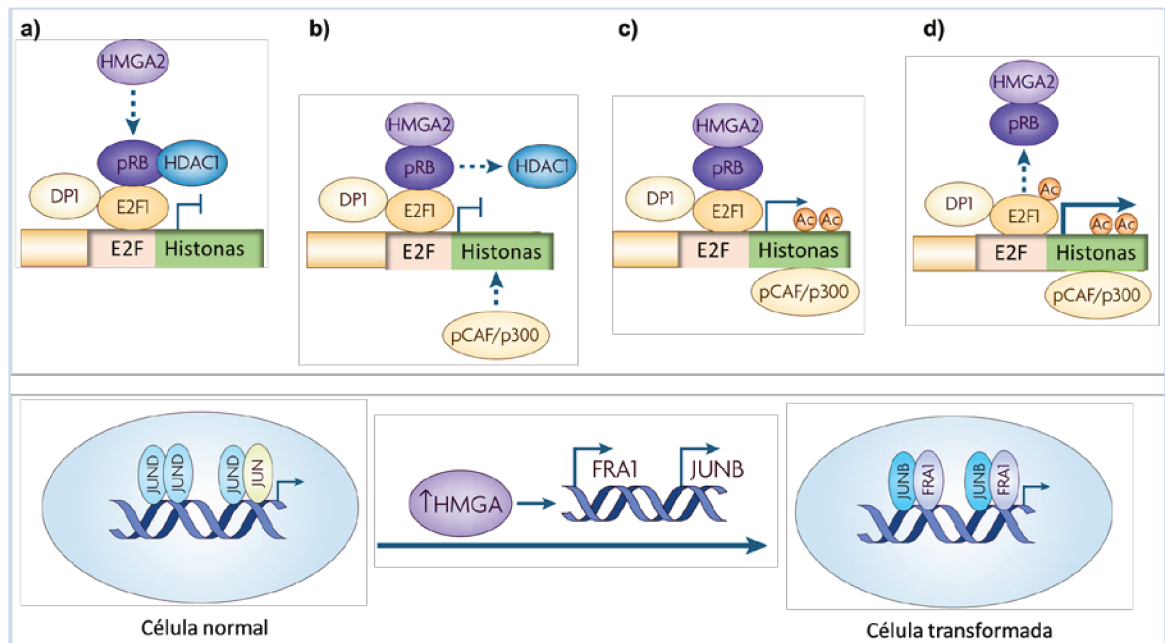


Figura 12- Parte I - Etapas da ativação do fator de transcrição E_2F_1 pelas proteínas do grupo de alta mobilidade subfamília A2 (HMGA2). **a)** Ligação de HMGA2 à proteína do Retinoblastoma (pRB) a qual se encontra em um complexo junto à histona desacetilase 1 (HDAC1). **b)** Separação da HDAC1. **c)** Em ausência de HDAC1, ocorre recrutamento de histonas acetilases (pCAF/p300) e através de acetilação de histonas é liberada a repressão transcricional. **d)** Histonas acetilases também acetilam o E_2F_1 , estabilizando-o na forma ativa “livre”. Finalmente, HMGA2 e pRB são liberadas de E_2F_1 . **Parte II-** Esquema do efeito mediado pelas proteínas HMGA2 sobre o complexo AP1. Após a transformação celular, os níveis de proteína HMGA2 aumentam causando uma acentuação da transcrição dos genes JUNB e FOSL1. Uma vez gerados os respectivos produtos (JUNB e FRA1), estes são acumulados nas células transformadas ocasionando alterações de composição no complexo AP1 e favorecendo a atividade transcricional. Modificado de Fusco A et al.⁽⁴⁵⁾.

c) As proteínas HMGA modulam a transição epitelial-mesenquimatosa (EMT)

Durante o desenvolvimento embrionário e em tumores epiteliais avançados, pode ser evidenciado o fenômeno EMT, no qual as células epiteliais se desdiferenciam para um estado mais fibroblástico e recuperam a sua capacidade de invadir, migrar e/ou proliferar de forma descontrolada. Estudos demonstraram que o fator de crescimento transformante β provoca EMT através da indução do *HMGA* por meio da via das proteínas smad (transmitem sinais extracelulares para o núcleo)⁽⁴⁵⁾.

d) As proteínas HMGA regulam a expressão de miRNAs

De maneira recíproca, mediante a modulação dos miRNA, o grupo HMGA consegue regular a expressão de genes importantes no processo de carcinogênese.

1.11.5- HMGA2 na proliferação e diferenciação celular durante o desenvolvimento

As proteínas HMGA2 se encontram presentes em níveis elevados em vários tecidos indiferenciados durante os primeiros estágios do desenvolvimento embrionário na fase G1 do ciclo celular⁽⁵⁰⁾. A expressão do gene *HMGA2* é principalmente limitada ao mesênquima e dificilmente é detectável em tecidos adultos saudáveis (Figura 13), devido a seu silenciamento durante a transcrição mediado por miRNA^(3,44,51). De outro lado, baixas quantidades têm sido observadas em células tronco hematopoiéticas CD34-positivas, em pré adipócitos e espermátócitos de camundogos⁽⁴⁵⁾.

Estudos *in vivo* em modelo animal demonstram que a caracterização fenotípica resultante da disrupção do gene *HMGA2* ocasiona diferentes fenótipos segundo o mecanismo, seja por silenciamento ou mediante expressão de produtos proteicos distintos.

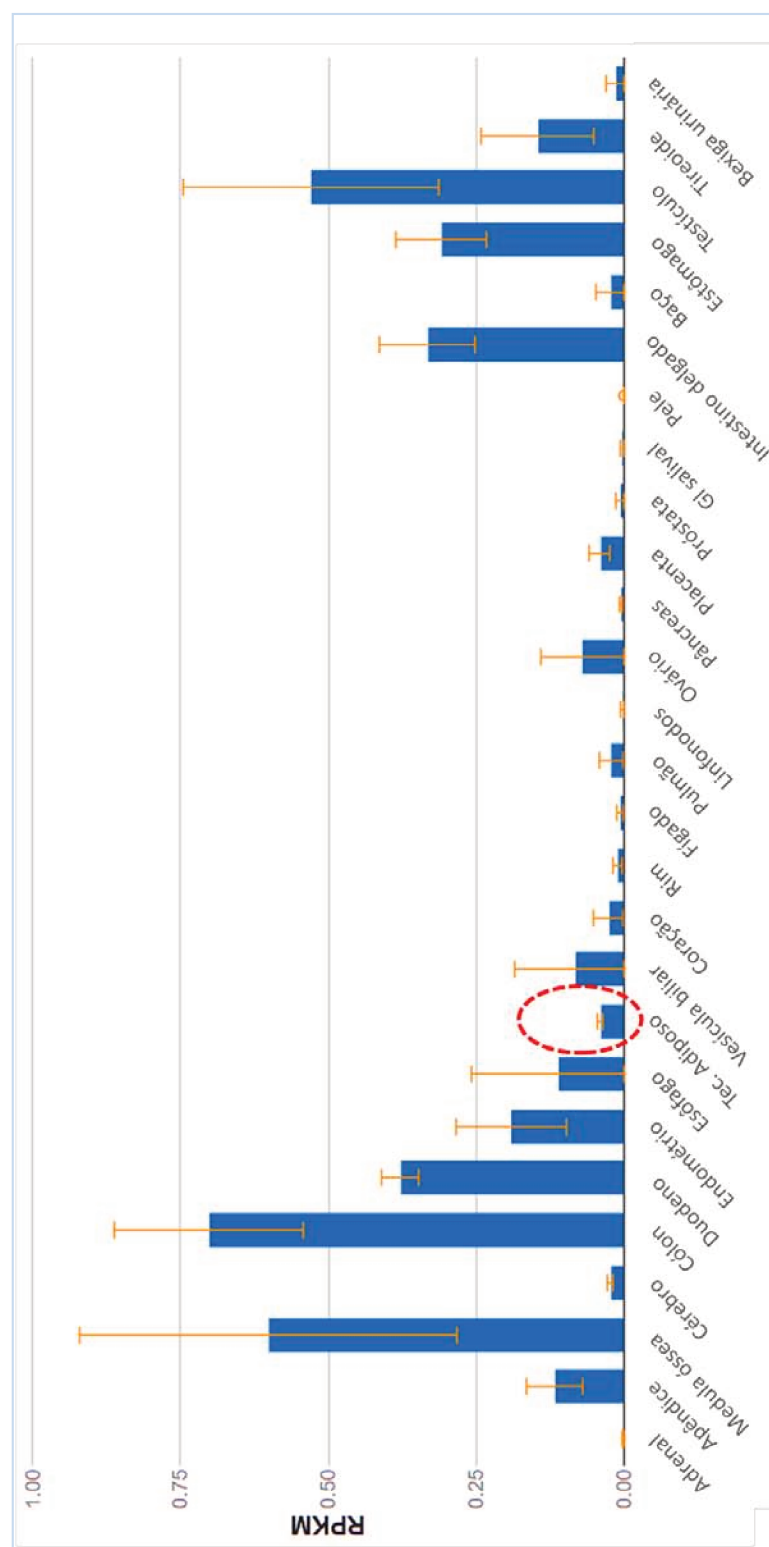


Figura 13- Níveis de expressão do gene *HMGA2* em tecidos adultos normais. RNA-seq realizado de amostras de tecido de 95 seres humanos representando 27 tecidos diferentes. Extraído de National Center for Biotechnology Information, U.S⁽⁵²⁾.

Exemplos englobam a formação de proteínas truncadas, de fusão e de tamanho completo. Ao comparar camundongos *knock out* e heterozigotos com modelos transgênicos expostos a fatores estimulantes (dieta/hormônios), os primeiros revelaram um fenótipo “pigmeu”, apresentando uma diminuição do tamanho corporal (peso e comprimento) de aproximadamente 20% em heterozigotos e 60% em homozigotos somado a uma drástica redução do tecido adiposo, em contraste com os últimos que exibiram sobrecrecimento e lipomatose (Figura 14)

Estes achados permitiram reconhecê-lo como “gene de resposta primária”, sugerindo assim uma função significativa no controle do crescimento corporal, da proliferação e da diferenciação de adipócitos^(44,45,53-55).

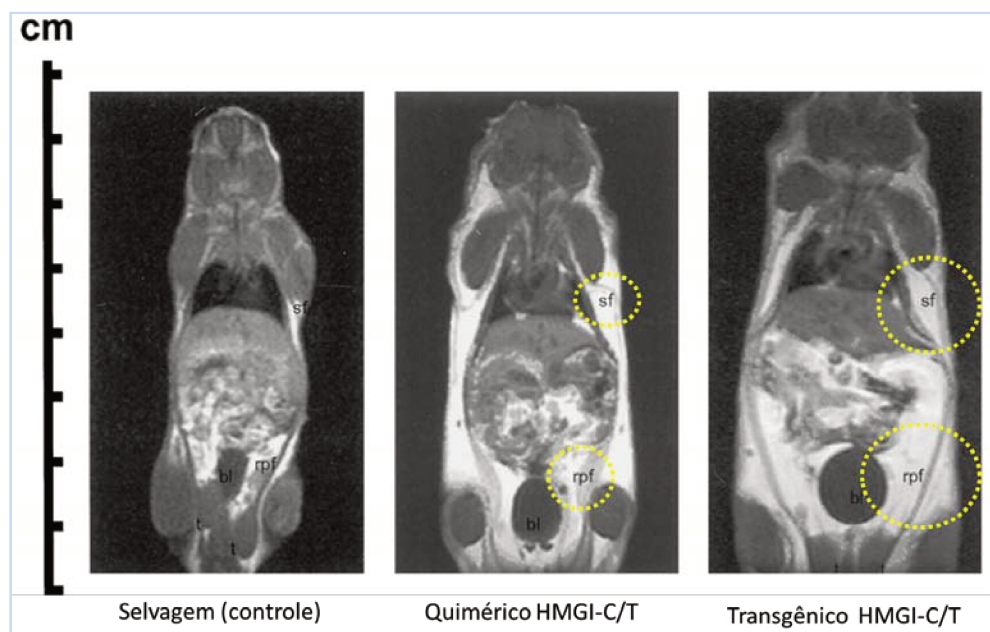


Figura 14- Análise do tecido adiposo por Ressonância Magnética em três tipos de camundongos. Nos tipos quimérico e transgênico, o acúmulo de tecido adiposo branco é maior nas áreas subcutânea (sf) e retroperitoneal (rpf). Modificado de Battista et al.(56).

1.11.6- *HMGA2* e a hipótese da tumorigênese

Análises feitas em tumores diferentes do lipoma determinam que, ainda com a perda só do extremo carbóximo-terminal e a região 3' UTR, o gene *HMGA2* rearranjado gera uma proteína quimérica ou truncada (denominada HMGA2Tr) que mantém sua capacidade de ligação ao DNA e de interação com outras proteínas. Desse modo, ratifica-se que o requisito mínimo para a tumorigênese seria a ativação de *HMGA2* secundária a rearranjos estruturais que deixam intactos, pelo menos, os éxons 1, 2 e 3, que codificam os domínios AT-hook⁽⁴⁴⁾.

1.11.7- *HMGA2* e tumores benignos não mesenquimais

Exemplo desta classe de tumor é o adenoma hipofisiário, o qual foi associado tanto a desequilíbrios numéricos como a alterações estruturais envolvendo o cromossomo 12, gerando como consequência uma hiperexpressão do gene *HMGA2*. Usando técnicas como FISH, RT-PCR, *Western Blot* e imuno-histoquímica, pesquisadores demonstraram que em prolactinomas, as alterações citogenéticas mais frequentes foram secundárias a aneuploidias de tipo trissomia e variações na estrutura como os derivados do cromossomo 12^(57,58).

1.11.8- *HMGA2* em neoplasias malignas

A hiperexpressão da proteína HMGA2 tem sido descrita em carcinomas do pâncreas, pulmão, da cavidade oral e em astrocitomas de baixo grau. Também tem sido relatada em síndromes mielodisplásicas, nas quais níveis elevados do gene estavam relacionados à ativação transcricional da interleucina 2 (IL2) e IL5 e de seus receptores, estimulando o aparecimento de linfomas e a baixas taxas de sobrevida, portanto a um mau prognóstico. Por outro lado, experiências *in vitro* mostram que tanto HMGA2Tr como HMGA2/LPP (*Lipoma preferred partner*) são capazes de induzir a transformação neoplásica de fibroblastos NIH-3T3⁽⁵⁹⁾.

1.11.9- *HMGA2* e a sua relação com os miRNAs

Novas descobertas assinalam que o processo que desencadeia a conduta oncogênica do *HMGA2* não é meramente a disrupção ou ativação dos genes parceiros, mas sim a perda da sua região 3' UTR. A remoção da região 3' UTR por rearranjos cromossômicos em tumores mesenquimatosos induz a expressão do oncogene *HMGA2*, normalmente reprimido pela ação da família de miRNAs *Let-7*. Estas moléculas realizam uma regulação negativa do gene *HMGA2* mediante inibição da tradução e/ou através da degradação do RNA mensageiro (mRNA) (Figura 15).

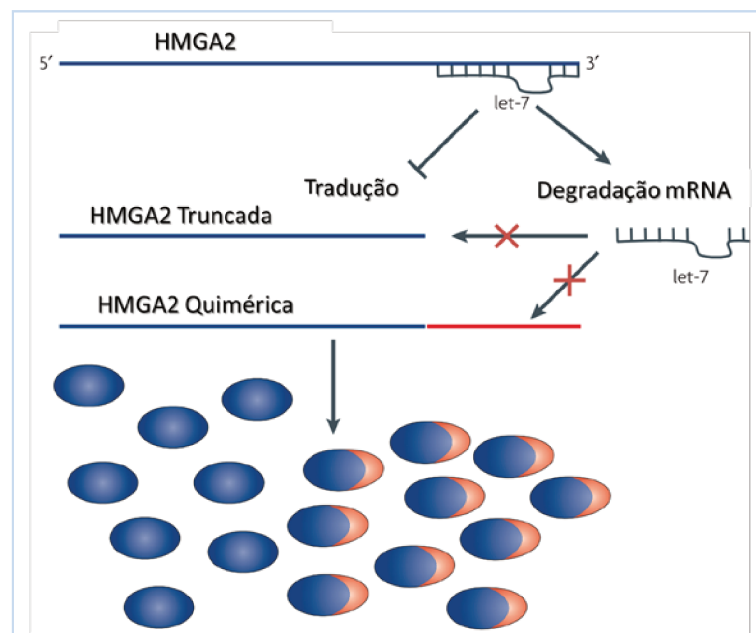


Figura 15- Perda de repressão de *HMGA2* mediada por microRNA (miRNA) em tumores mesenquimatosos. O miRNA Let-7 se liga à região 3' do gene *HMGA2* e assim ocorre uma hipoeexpressão de *HMGA2* inibindo a tradução e/ou causando a degradação do mRNA. Após truncamento ou fusão com sequências ectópicas, *HMGA2* perde as regiões anteriormente reconhecidos por Let-7, resultando em aumento de *HMGA2*. Modificado de Fusco et al.⁽⁴⁵⁾.

Tem se documentado que a expressão de Let-7 durante o desenvolvimento é inversamente correlacionada com a de *HMGA2*, levando à hipótese de que Let-7 possa atuar como um repressor de *HMGA2* (Figura 16)^(44,60). Contudo, publicações prévias ressaltam que a probabilidade do gene *HMGA2* truncado ou fusionado (*HMGA2-LPP*) de se transformar em células malignas é potencialmente baixo^(45,59). Nesse contexto, constata-se que o *HMGA2* desempenha um papel crucial na tumorigênese e senescência celulares^(47,50,61).

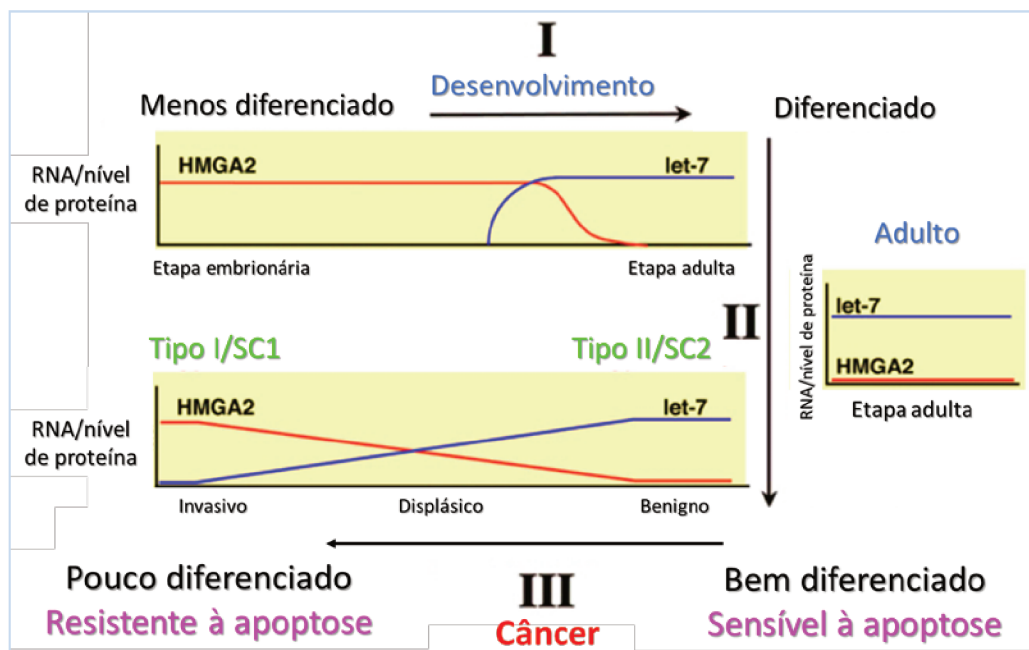


Figura 16- Papel da família Let-7. Modelo sugerido que explica o controle da expressão de genes embrionários durante o desenvolvimento embrionário e o câncer. O gene *HMGA2* é altamente expresso durante as primeiras etapas do desenvolvimento embrionário e suprimido tardiamente através da hiperexpressão do Let-7, o qual permanece alto durante a etapa adulta. Somente durante a progressão do câncer quando a expressão de Let-7 é perdida, o *HMGA2* se torna expresso em vários tecidos onde usualmente não o é. Isso faz com que as células cancerosas do fenótipo Tipo II / SC2 se tornem mais móveis e invasivas e menos suscetível aos efeitos tóxicos de medicamentos antineoplásicos. Modificado de Park et al.⁽⁶⁰⁾.

1.12- Justificativa

Por ser uma condição benigna, progressiva e pouco frequente na população geral os estudos disponíveis na literatura têm sido focados unicamente em relatos clínicos de casos isolados. Baseados nesses dados foi considerada a necessidade de explorar as bases moleculares mediante a investigação de vários genes candidatos que poderiam ser responsáveis pela gênese da LMF. Deste modo, poderiam ser identificadas pessoas com risco de desenvolver o quadro além de poder adotar uma conduta preventiva que vise pelo reconhecimento precoce dessa doença, evitado assim o crescimento excessivo dos nódulos e as suas implicações estéticas subsequentes.

OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

Caracterizar as bases clínicas e moleculares de indivíduos com Lipomatose Múltipla Familiar atendidos no Serviço de Genética Clínica do Hospital das Clínicas da Unicamp.

2.2- Objetivos Específicos

- Identificar variantes do gene *HMGA2* e testar se há correlação com o fenótipo dos indivíduos afetados;
- Nos casos negativos, avaliar variantes em genes conhecidos associados às lipomatoses como *PTEN*, *AKT1*, *PIK3CA*, *MEN-1* e *APC*.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1- Aspectos éticos

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp sobre o parecer Nº 1.313.164 (Anexo 1). Para cada um dos participantes, foi apresentado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 1), em duas vias, que assegurou o direito de desligar-se da pesquisa e retirar o consentimento em qualquer de suas etapas, sem prejuízos ao seu atendimento no Ambulatório de Genética Médica do HC/Unicamp.

Os resultados dos exames e suas implicações para fins de aconselhamento genético foram transmitidos aos médicos responsáveis pelos pacientes e seus familiares. O aconselhamento genético, quando solicitado, foi conduzido por geneticista clínico.

Também foram garantidas a confidencialidade, a privacidade e a proteção das fotos dos voluntários e de suas informações. O material biológico e os dados obtidos na pesquisa foram usados exclusivamente para este projeto, sendo oferecida a possibilidade de armazenamento por cinco anos para eventual realização de outros exames adicionais, condicionado a aprovação ética ou por novo consentimento informado dos indivíduos.

3.2- Características da população

Foram selecionados indivíduos adultos com LMF em acompanhamento regular nos ambulatórios do Serviço de Genética Clínica do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Foram elegíveis durante as consultas ambulatoriais de rotina conforme os seguintes critérios de inclusão:

- 1-** Idade acima de 18 anos;
- 2-** Diagnóstico clínico de lipomas múltiplos e/ou histológico por biópsia confirmando lipoma ou angioliipoma;
- 3-** Recorrência familiar sugerindo herança autossômica dominante.

3.3- Procedimentos e estratégia de estudo

3.3.1- Coleta de dados retrospectivos

Houve revisão dos dados clínicos a partir dos prontuários médicos, compreendendo iniciais do paciente, idade, gênero, história evolutiva da doença, histórico familiar e exame físico. Também foram anotados resultados de exames relevantes ao caso, tais como histologia de lipomas eventualmente biopsiados.

3.3.2- Coleta de dados prospectivos

As amostras de sangue para obtenção de DNA foram obtidas a partir de punção de veia periférica por profissional habilitado (médico, enfermeira ou biomédico). Não foi realizado nenhum procedimento *in vivo* que pudesse causar riscos ou desconfortos.

Após a coleta de sangue periférico em tubo vacutainer® com aticoagulante EDTA, o DNA genômico foi extraído pelo método fenol-clorofórmio utilizado pelo Laboratório de Genética Molecular da Faculdade de Ciências Médicas/FCM/Unicamp.

3.3.3- Extração de DNA

O DNA genômico das amostras coletadas foi obtido mediante o método de adição dos reagentes fenol e clorofórmio⁽⁶²⁾. A extração de DNA consistiu inicialmente da obtenção de 10 a 15mL de sangue venoso colhido de cada indivíduo recrutado para o estudo. As amostras foram centrifugadas a 1080 G por 10 minutos e a parte intermediária, onde se localizavam os leucócitos, foi transferida para um tubo de fundo cônico de polipropileno. Em seguida foram adicionadas as soluções de RSB (*Reaction Stop Buffer*, contendo 0,1M de Tris pH 7,0; 0,1M de KCl; 0,1M de MgCl₂) até completar o volume de 11mL no tubo e 60μL de Nonidet®.

Esta solução foi homogeneizada por 10 minutos em agitador e posteriormente centrifugada a 1080 G por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Após a adição de 3mL de solução de SDS para sangue (0,5% de dodecil sulfato de sódio, 1M de Tris pH 7,6 - 8, 1M de KCl, 1M de MgCl₂, 0,4M de NaCl e 20mM de EDTA) e 10µL de proteinase K (100µg/mL) as amostras foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após essa etapa foram adicionados 3mL de fenol. As amostras foram homogeneizadas por 10 minutos em agitador, centrifugadas a 1080 G por mais 10 minutos e a parte orgânica da solução foi descartada. Esse processo foi repetido com 1,5mL de fenol e 1,5mL de solução de álcool isoamílico e clorofórmio (1:24), seguida por mais uma repetição desse processo com 3mL de solução de álcool isoamílico e clorofórmio (1:24). A precipitação do DNA genômico foi feita com 6mL de etanol absoluto e o DNA extraído foi armazenado em tubo cônico de polipropileno de 1,5mL com 200µL de água para injeção.

3.3.4- Sequenciamento

3.3.4.1- Gene *HMGA2*

Para o sequenciamento do gene *HMGA2* foi utilizado o método de Sanger⁽⁶³⁾.

3.3.4.2- Desenho de *primers*

Cinco éxons do gene *HMGA2* foram amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando oligonucleotídeos iniciadores ou *primers* que flanqueiam essas regiões (Tabela 2). Foram desenhados a partir das ferramentas bioinformáticas Primer3[®] (versão 0.4.0) e primer-BLAST⁽⁶⁴⁾⁽⁶⁵⁾, respeitando as seguintes condições: tamanho entre 18 e 22 nucleotídeos; ausência de complementaridade entre os *primers*; ausência de estruturas de DNA secundárias como os “*hairpin loops*”; ausência de auto-dímeros; ausência de regiões 3’ finalizadoras ricas em GC; porcentagem semelhante do conteúdo de G e C dos

dois *primers* (entre 40-60%); temperaturas de anelamento parecidas (entre 55-60°C) e tamanho do fragmento a ser amplificado até 300 pares de bases.

Tabela 2- *Primers* utilizados nas reações de PCR e sequenciamento

Éxon	Primer Sense	Primer Antisense	Temperatura anelamento	Tamanho do produto
1	CCAGCCCTATCACCTCATCT	CGTACTGACTTGCTGCTGCT	59,2°C	216 pb
2	TCTTGCCACAACAGCATTTT	GGCAGGCTCCTGTAGTCAGT	59,3°C	185 pb
3	GTCAGGTAGAAAATAATGACTTCC	TTACTCACCCATTTCCTAGGTCTG	58,1°C	100 pb
4	TTTCCTCCTTAGCCACAACAA	TGCAGGACGATAACCAAAAG	59°C	146 pb
5	CAAGAGCAGCCACACAGTA	CACCCAGATGAAAGTGGAA	60,5°C	224 pb

Posteriormente as amostras foram submetidas a sequenciamento dos fragmentos amplificados pelos mesmos *primers* já utilizados na PCR para término da triagem de mutações.

3.3.4.3- Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os éxons alvo do gene em estudo foram amplificados por PCR utilizando os *primers* específicos em termociclador Eppendorf®. Cada reação teve um volume final de 10µL contendo 100ng de DNA genômico/100pmol de cada primer (*forward* e *reverse*), 1,25mM de dNTP, 2,5mM de MgCl₂, 10mM de Tris-HCl pH 8,3, 50mM de KCl, 2,5U de Taq DNA polimerase. Foram submetidas a uma desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguidas por 35 ciclos de 30s de desnaturação a 94°C, 45s em temperatura de anelamento (Ta) e 40 s de extensão a 72°C. Depois do último ciclo as amostras passaram por uma extensão final de 10 min a 72°C (Figura 17).

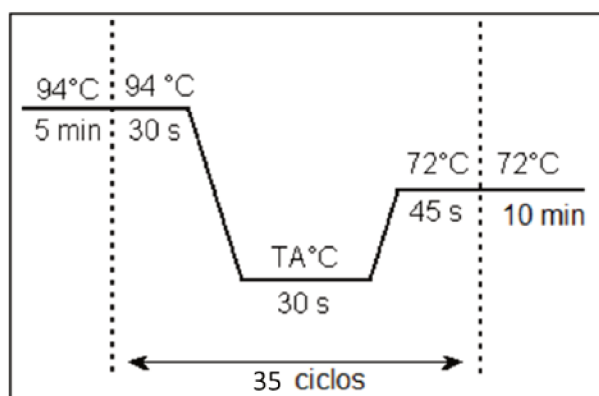


Figura 17- Condições utilizadas na PCR

Para determinar a temperatura de anelamento ideal dos pares de *primers*, foram realizados PCRs com gradientes de temperatura. Os produtos de amplificação (*amplicons*) foram visualizados em gel de poliacrilamida 12% e posteriormente suspenso em 100ml de solução TBE 1x corado com *SYBR[®] Safe DNA stain*.

Após essa etapa, as amostras foram submetidas a purificação com Exo-sap (exonuclease I e fosfatase alcalina de camarão) para remover o excesso de *primers* e de nucleotídeos. Adicionou-se 0,7µL de Exosap a 1,5µL de PCR. As amostras foram incubadas a 37°C por 15 minutos e depois aquecidas a 80°C por mais 15 minutos. Desse modo ficaram em condições para sequenciamento automático por eletroforese capilar no equipamento ABI 3500xL (*Life Technologies[®]*) utilizando o método de Sanger com o *Kit BigDye[®] Terminator Cycle Sequencing Standart Version 3.1*, seguindo as instruções do fabricante.

A reação de sequenciamento foi realizada com volume final de 10µL contendo 4,5µL de água destilada, 1µL de *BigDye[®]*, 2µL de solução tampão (fornecido pelo fabricante), 0,5µL de *primer sense* ou *antisense* (10pmol/µL) e 2µL do produto tratado com Exo-sap.

As reações foram realizadas em termociclador Eppendorf[®] nas seguintes condições: 35 ciclos de 10 segundos a 96°C, cinco segundos a temperatura de anelamento de cada *primer* descrito na tabela 2 e quatro minutos a 60°C (Figura 18).

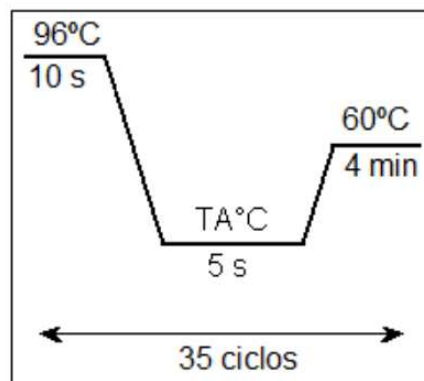


Figura 18- Condições utilizadas na reação de sequenciamento

A purificação das amostras para sequenciamento foi realizada com EDTA (125mM) e etanol de acordo com as instruções do fabricante. Após a finalização do processo de purificação as amostras foram ressuspensas em 10µL de formamida *Hi-Di*[®].

Os resultados obtidos através do sequenciamento foram salvos em eletroferogramas e analisados com o programa *Chromas*. As sequências foram comparadas com as sequências normais do gene *HMGA2* (número ENST00000403681) disponibilizado no banco de dados *Ensembl Genome Browser*⁽⁴⁹⁾. As alterações inéditas encontradas foram analisadas *in silico* nos programas *VEP* (variant effect predictor), *FATHMM* (functional analysis through hidden Markov Models), *UMD-predictor*, *SIFT* (Sorting Intolerant From Tolerant), *PROVEAN* (Protein Variation Effect Analyzer) e *Mutation taster*. Esses *softwares* avaliaram a substituição da base nitrogenada fundamentando-se na combinação de parâmetros funcionais e estruturais das proteínas.

3.3.4.4- Genes *PTEN*, *AKT1*, *PIK3CA*, *MEN-1* e *APC*

Para os genes *AKT1*, *APC*, *MEN-1*, *PIK3CA* e o *PTEN* foi utilizado sequenciamento de alta performance em laboratório terceirizado (© Invitae Corporation).

O DNA genômico obtido a partir da amostra submetida foi enriquecido para regiões específicas a partir de um protocolo baseado em hibridação e sequenciado usando a tecnologia Illumina. Todas as regiões segmentadas foram sequenciadas com $\geq 50\times$ de profundidade ou foram complementadas com análises adicionais. As leituras foram alinhadas a uma sequência de referência (GRCh37). O foco de enriquecimento e análise se concentra na sequência de codificação dos transcritos indicados, 10pb de sequência intrônica flanqueadora e regiões 3' e 5' UTRs. As deleções e duplicações foram avaliadas pela técnica de MLPA. As seguintes transcrições foram usadas nesta análise: *AKT1* (NM_005163.2), *APC* (NM_000038.5), *MEN1* (NM_130799.2), *PIK3CA* (NM_006218.2), *PTEN* (NM_000314.4).

RESULTADOS

4.1- Clínicos

Foram incluídos sete indivíduos de cinco famílias (A, B1, B2, C, D1, D2 e E). As famílias eram procedentes dos estados de São Paulo e da Bahia. Em nenhum caso foi identificada consanguinidade parental. Todos os participantes referiram pelo menos um parente em primeiro grau acometido com o mesmo quadro clínico, sendo que as famílias A e B mostraram ainda comprometimento de três gerações (Figura 19 a 23). Não foi possível detalhar a origem étnica dessas famílias, sendo em sua maioria referidos como “mista”, representada por ibéricos, italianos, russos, franceses, afro-brasileiros e indígenas. A razão de sexo entre os pacientes incluídos foi de 1:6 (H:M). Entretanto, considerando os demais afetados referidos conforme evidenciado nos heredogramas foi de 10:13 (H:M).

A idade média na inclusão ao estudo foi de $42 \pm 11,8$ anos, enquanto a idade média de aparecimento das lesões foi $28 \pm 6,6$ anos. As mulheres apresentaram o pico máximo de surgimento dos nódulos após as gestações.

As características mais comumente observadas das lesões foram: nódulos múltiplos, não aderidos, de consistência mole ou elástica, não dolorosos. A distribuição anatômica preferencial dos lipomas ocorreu nas extremidades. O número mínimo de lipomas avaliados ao exame físico (palpáveis) em um mesmo sujeito foi 3 e o máximo foi 20 (Figuras 24, 25, 27 e 29). À exceção do indivíduo A, em nenhum caso houve relato de dor ou desconforto ao manuseio das lesões.

Três propósitos tinham biópsia dos nódulos, sendo que em todos foi confirmado o diagnóstico anatomopatológico de angiolipoma (Figuras 26, 28 e 30). Além do critério clínico, não foram feitos estudos de imagem adicionais para avaliar tais lesões. Três participantes tinham algum tipo de comorbidade associada a distúrbios do trato gastrointestinal como diverticulite e pólipos (caso A) constipação crônica importante (caso D2) e câncer colorretal (caso C).

Um resumo detalhado dos principais achados clínicos encontra-se disponível na Tabela 3.

Tabela 3- Resumo das características clínicas das pessoas com LMF

Paciente	Sexo	Data 1ª consulta	Idade 1ª consulta	Idade de aparecimento das lesões	Afetados na família	Clínica	Localização	Comorbidades
A	M	15/07/2010	47	30	• Avô paterno • Pai • Irmão (1) • Filhos (2)	Múltiplos nódulos arredondados em tecido celular subcutâneo, de tamanhos variados, consistência amolecida, não aderidos a planos profundos. IMC: obesidade Gil. Biópsia: Angiolipoma.	• Extremidades superiores e inferiores • Tronco • Coxa	• Hernia discal/lesão nervo ciático • Fibromialgia • Doença de Dercum • Esteatose Hepática • Cisto renal e de ovário • Divertículos do cólon e pólipos retal
B1	M	21/05/2015	58	35	• Mãe • Irmão (1) • Filhos (2)	Múltiplas lesões nodulares em subcutâneo, consistência elástica, não aderidas, indolor. O maior +/- 10 cm de diâmetro. IMC: Obesidade GI. Biópsia: Angiolipoma	• Extremidades superiores • Tronco • Coxa	
B2	H	18/05/2017	32	20	• Mãe • Irmão (1)	Nódulos subcutâneos sem dor, não aderidos. IMC: normal.	• Extremidades superiores • Tronco • Coxa	
C	M	06/10/2015	38	37	• Pais • Irmão (1)	Nódulos múltiplos bem delimitados. IMC: sobrepeso. Biópsia: lipoma	• Extremidades superiores • Tronco	• Câncer colorretal: adenocarcinoma mucinoso com predomínio anel de sinete
D1	M	08/06/2006	50	27	• Filhas (2)	Múltiplos tumores subcutâneos, de tamanhos variados de 2-10 cm, de consistência amolecida (os menores) a firme (os maiores), não aderidos a planos profundos, não dolorosos. IMC: sobrepeso. Biópsia: Angiolipoma	• Extremidades superiores • Tronco • Coxa	
D2	M	25/06/2015	36	30	• Mãe • Irmã	Nódulos discretos em superfícies extensoras. IMC: normal	• Extremidades superiores	• Sangramento intestinal? • Constipação importante
E	M	20/10/2016	37	20	• Irmãos (2) • Mãe	Nódulos múltiplos móveis. IMC: sobrepeso	• Extremidades superiores • Coxas	

IMC: índice de massa corporal. **M:** mulher. **H:** homem.

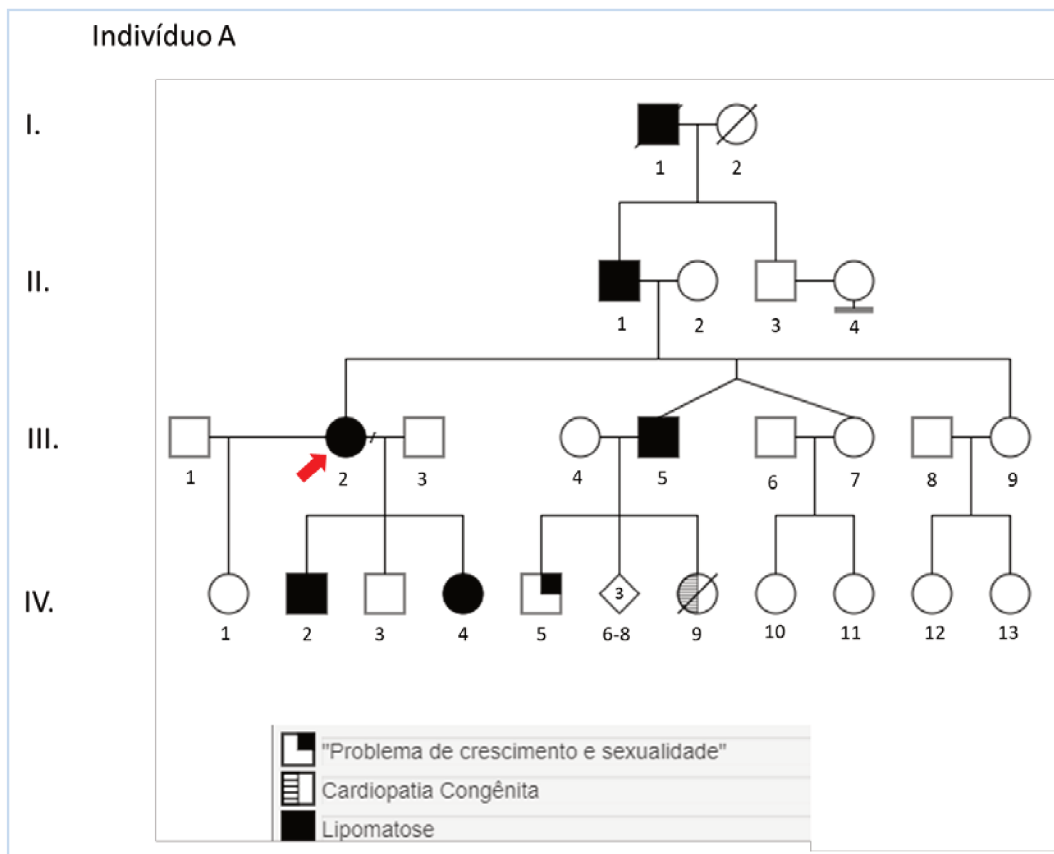


Figura 19- Heredograma representativo da família A

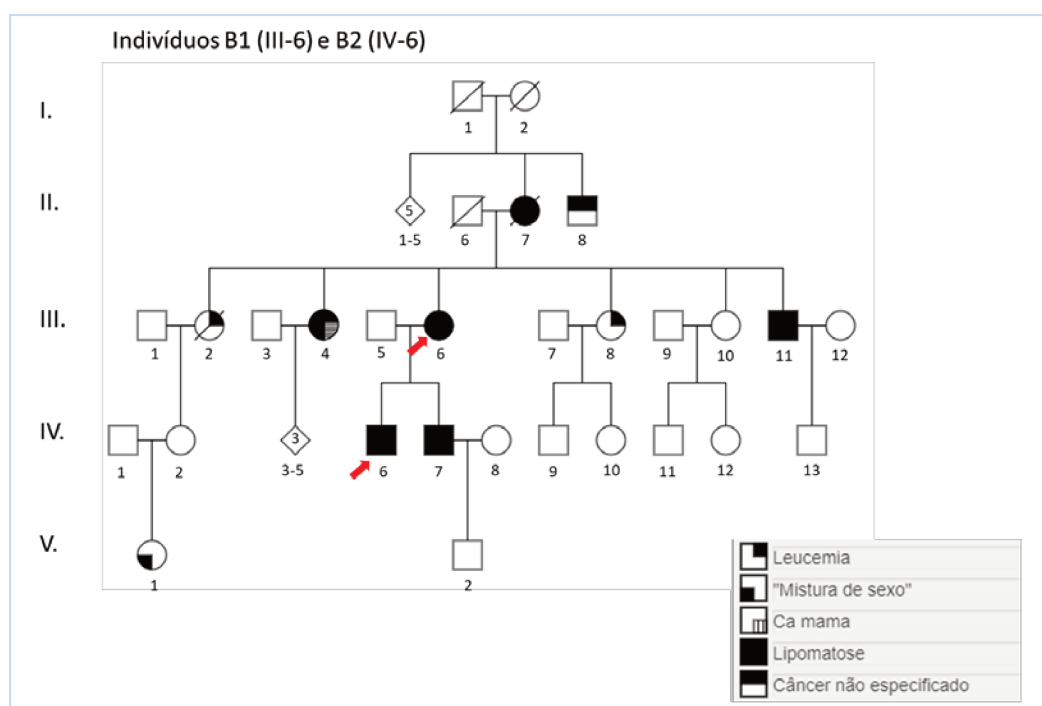


Figura 20- Heredograma representativo da família B

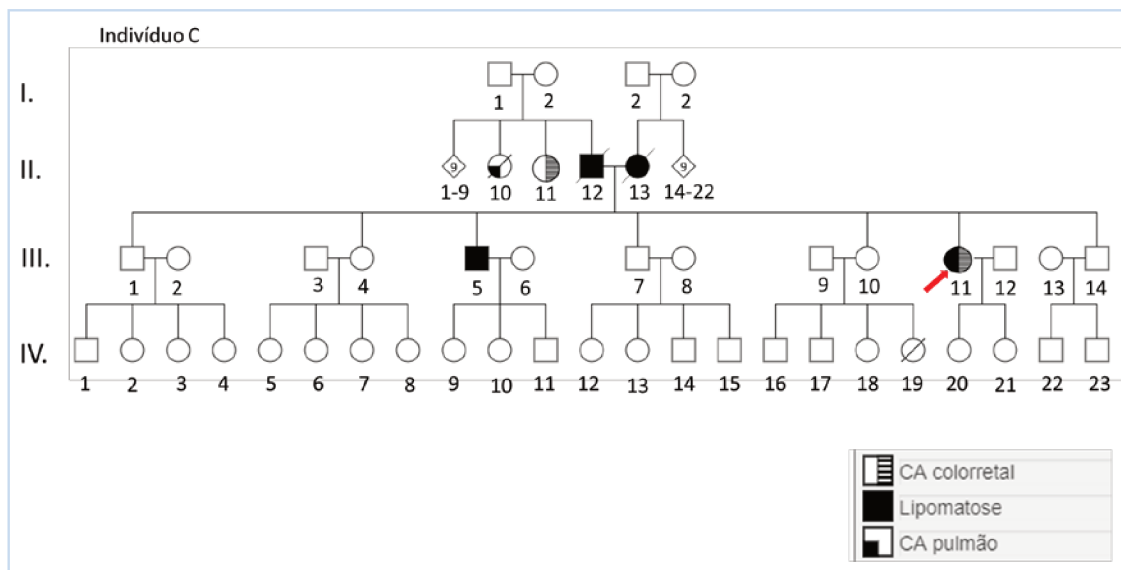


Figura 21- Heredograma representativo da família C

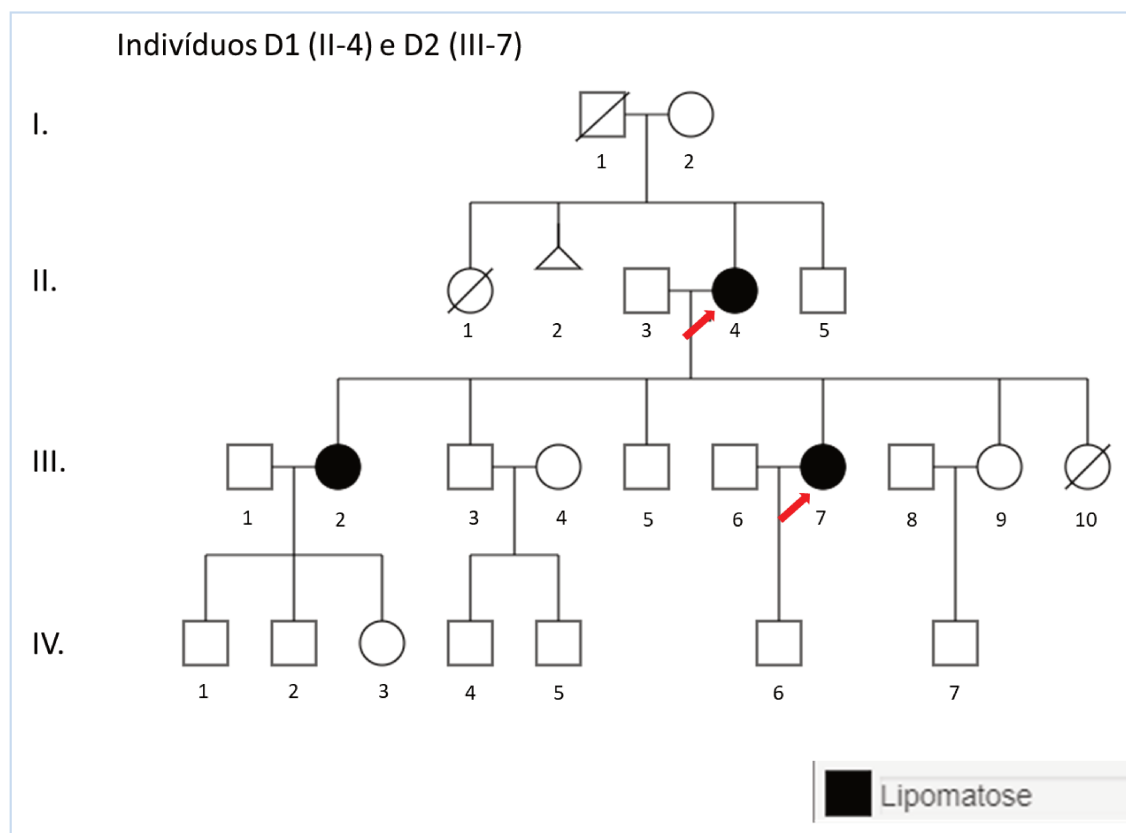


Figura 22- Heredograma representativo da família D

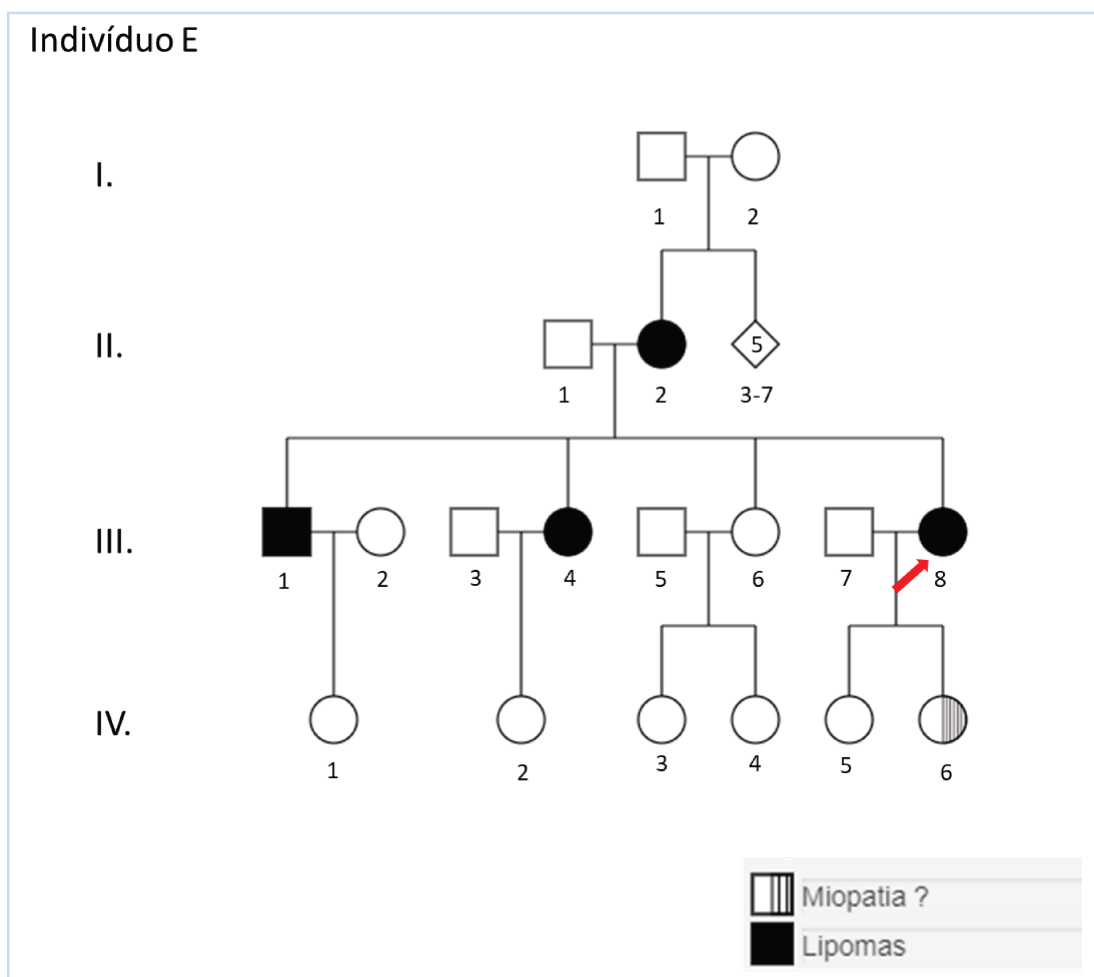


Figura 23- Heredograma representativo da família E



Figura 24- Parte dos lipomas presentes em membros no caso A



Figura 25- Parte dos lipomas presentes em membros e cicatriz da exérese no caso B1

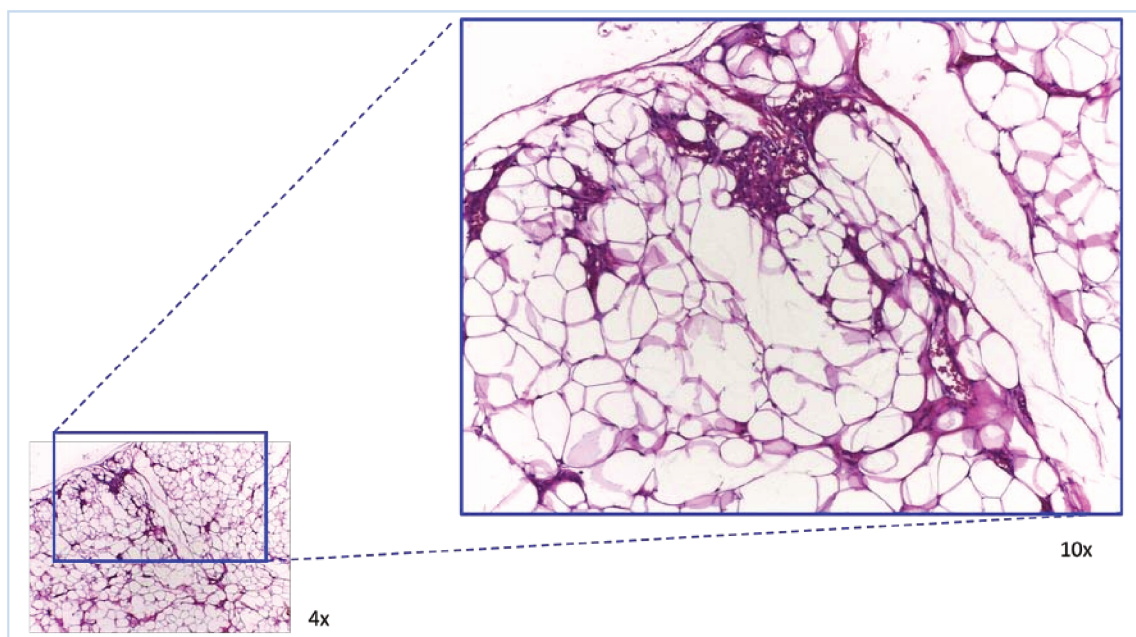


Figura 26- Aspecto histológico de um dos lipomas presentes no caso B1

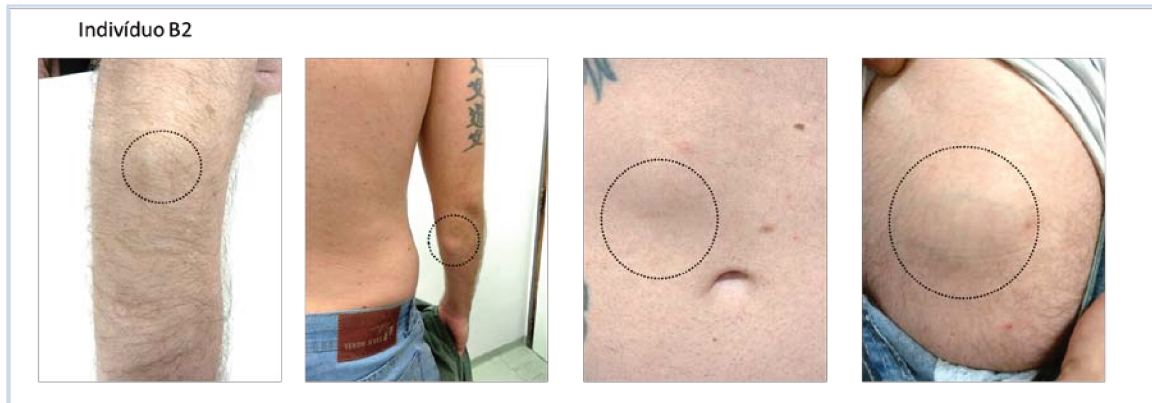


Figura 27- Parte dos lipomas presentes em antebraços, abdome e coxa no caso B2

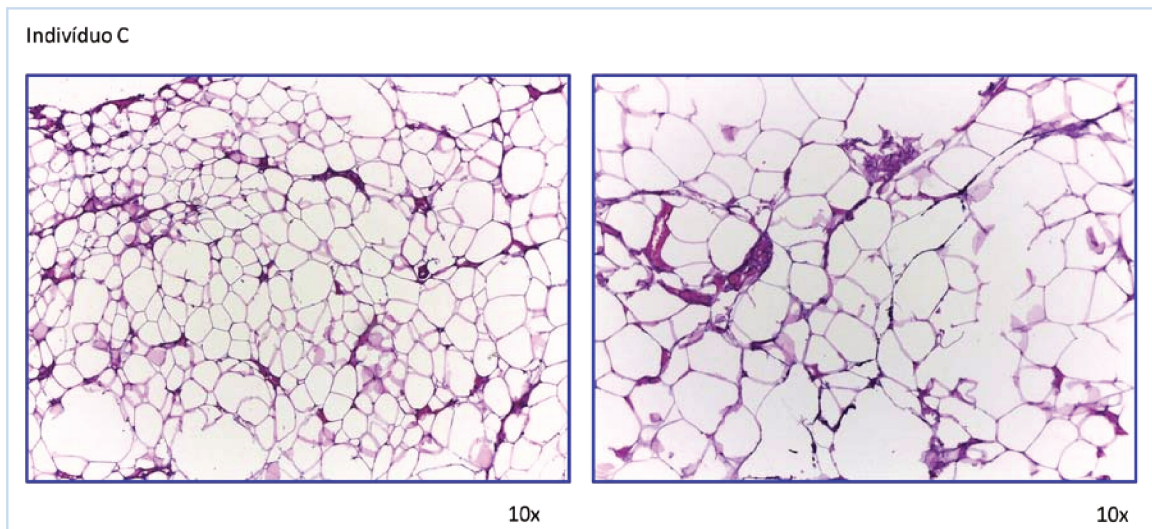


Figura 28- Aspecto histológico de um dos lipomas presentes no caso C

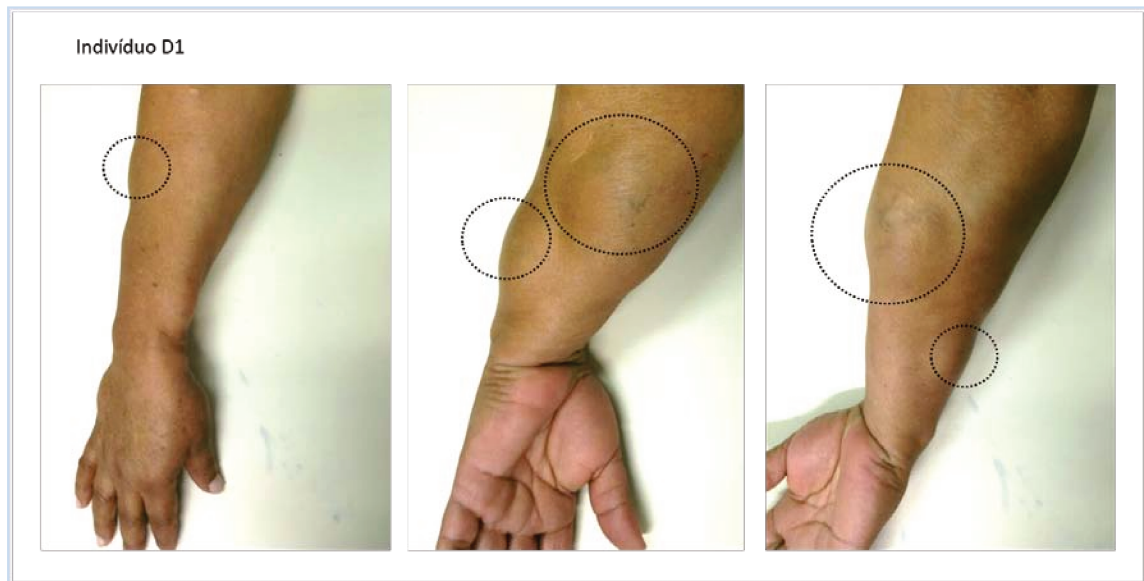


Figura 29- Parte dos lipomas presentes em antebraços no caso D1

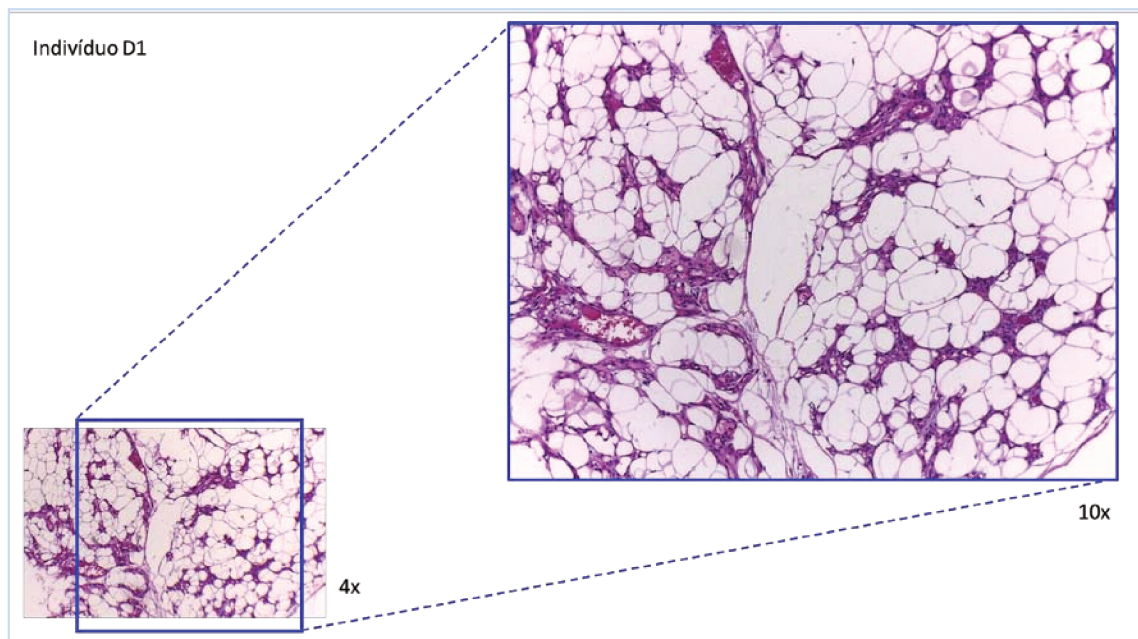


Figura 30- Biópsia de um dos lipomas presentes no caso D1

4.2- Moleculares

Da análise molecular dos genes *HMGA2*, *AKT1*, *APC*, *MEN-1*, *PIK3CA* e *PTEN*, foram encontradas alterações unicamente no gene *HMGA2*, descritas a seguir.

Os cinco éxons do gene *HMGA2* foram amplificados por PCR utilizando os *primers* descritos na Tabela 2, que flanqueiam essas regiões e as respectivas junções íntron-éxon (Figura 31 e Figura 32).

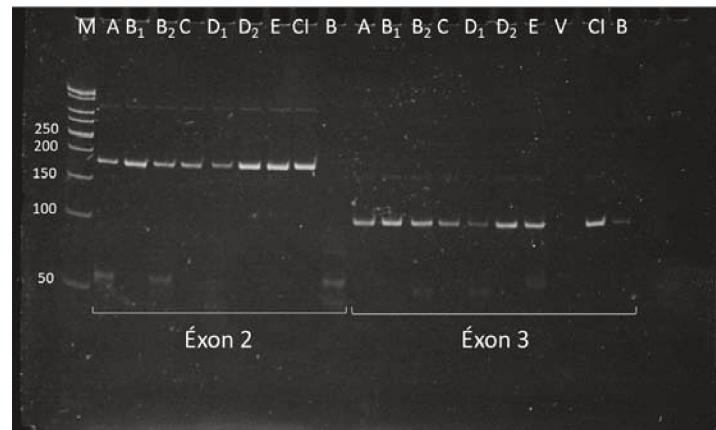


Figura 31- Amplificação dos éxons 2 e 3 do gene *HMGA2* por PCR em gel de poliacrilamida 12%. **M:** marcador de 50 pares de bases (pb). **A-E:** indivíduos pertencentes às cinco famílias; **CI:** controle interno; **B:** branco. Éxon 2 (185 pb); Éxon 3 (100 pb).

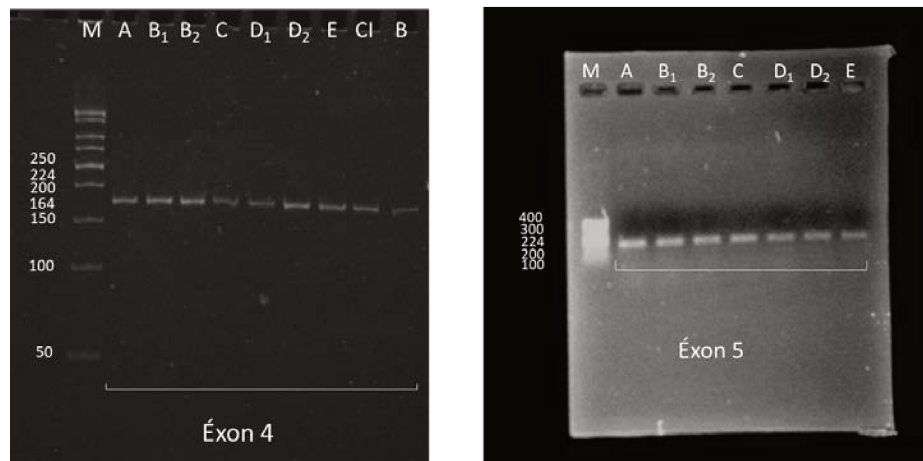


Figura 32- Amplificação dos éxons 4 e 5 do gene *HMGA2* por PCR em gel de poliacrilamida 12% e agarose 2% respectivamente. **M:** marcador de 50 pares de bases (pb). **A-E:** indivíduos pertencentes às cinco famílias; **CI:** controle interno; **B:** branco. Éxon 4 (164 pb); Éxon 5 (224 pb).

As duas alterações não foram localizadas em três bancos de dados consultados (The global alliance for genomics and health, ExAC e o ABraOM). Posteriormente e para um melhor entendimento das variantes encontradas, foi realizado uma análise de predição *in silico* utilizando os algoritmos *VEP*, *FATHMM*, *UMD-predictor*, *SIFT*, *PROVEAN* e *Mutation taster* que permitem a avaliação de variantes sinônimas e variantes envolvendo *stop* códons.

Em todos os recursos empregados com exceção do *Mutation taster* e conforme à nomenclatura respectiva utilizada por cada um deles, a variante c.327C>T foi considerada de baixo impacto, neutra, em 33% de probabilidade de corresponder a um polimorfismo ou tolerada. Já para a segunda variante c.328T>C, os preditores *VEP* e *UMD-predictor* a classificaram como de alto impacto ou 100% patogênica, respectivamente.

Entretanto, a ferramenta *Mutation Taster* identificou a alteração c.327C>T como causadora de doença e a alteração c.328T>C como um polimorfismo.

Quanto ao painel de genes realizado nas cinco famílias para detectar mudanças nas sequências de *AKT1*, *APC*, *MEN-1*, *PIK3CA* e *PTEN*, genes também associados com algumas das lipomatoses síndrômicas, não foram identificadas variantes patogênicas nem deleções ou duplicações exônicas em nenhum caso.

DISCUSSÃO

A caracterização clínica da LMF na nossa casuística revelou diferenças quanto aos dados existentes na literatura. Primeiro, houve um número maior de mulheres diagnosticadas com LMF. Esse fato pode ser um viés do presente estudo devido a aspectos como o pequeno tamanho amostral e a maior procura das mulheres aos serviços de saúde em decorrência de questões estéticas. Também foi verificada uma quantidade total de lipomas mais elevada nas participantes avaliadas. Características como sobrepeso e crescimento exacerbado dos nódulos durante e após as gestações sugerem que mecanismos exógenos (dieta), metabólicos (dislipidemia ou alterações na desaturação de ácidos graxos) e hormonais podem estar envolvidos na hiperplasia dos adipócitos. Yee e col., compararam diferenças nos índices de desaturação enzimática (estearoil-CoA) entre pessoas com doenças raras do tecido adiposo e obesos controles e concluíram que indivíduos com LMF e obesidade mostravam os maiores índices de desaturação, incrementando assim o processo de lipogênese^(24,66).

Outro resultado clínico considerado relevante foi o evidenciado na participante A, que foi a única dentro da casuística e dentro de seu grupo familiar a manifestar dor importante à manipulação dos lipomas, incapacidade progressiva para a execução de atividades cotidianas e comorbidade psiquiátrica (transtorno do humor do tipo depressão crônica e transtorno de ansiedade). Esses sintomas estão fortemente associados à Doença de Dercum, a qual pode ser considerada como diagnóstico diferencial ou uma variante da LMF. Baseados na nova classificação da Doença de Dercum proposta por Hansson e col., poderíamos estar frente à forma nodular generalizada, reconhecida por um padrão de dor generalizada do tecido adiposo acompanhada de dor intensa da superfície e ao redor dos lipomas⁽³⁰⁾. Outro estudo que reforça essa hipótese é o publicado por Campen e col., que descrevem dois indivíduos com adipose dolorosa pertencentes a uma família com lipomatose (duas gerações com nove afetados), indicando uma segregação de tipo autossômica dominante com expressividade variável e representando talvez a manifestação mais extrema dentro da LMF⁽⁴³⁾.

Em relação ao diagnóstico histopatológico das lesões, foram evidenciados dois tipos: o lipoma propriamente dito e o angioliipoma (também conhecido como lipoma vascular ou hemangioliipoma). Este último, além de estar formado por adipócitos maduros, apresenta uma proliferação de finos vasos sanguíneos, alguns dos quais contêm trombos de fibrina em seu interior. Manifesta-se principalmente em homens adultos jovens que exibem dor ao exame das lesões. Este tipo de tumor pode estar relacionado com história prévia de traumatismo local ou ao uso de terapia esteroide. Embora haja um grande número de autores descrevendo ambos os diagnósticos como entidades patológicas diferentes, algumas publicações não fazem essa distinção⁽⁶⁷⁻⁷⁰⁾. Nosso estudo confirma que é provável ter angioliipomas com recorrência familiar e que esse diagnóstico poderia fazer parte do amplo espectro da LMF, devido a diferenças muito sutis entre eles. Outras variantes como o lipoma de células fusiformes também tem sido relatado em diferentes afetados da mesma genealogia⁽⁷¹⁾.

No que concerne aos resultados moleculares, não há na literatura estudos constitucionais que avaliem o gene *HMGA2* em pacientes com LMF. Os únicos estudos disponíveis estão focados na análise de expressão e investigação citogenética direta sobre os tumores lipomatosos. Existe só um relato de caso de um menino de oito anos com um rearranjo constitucional afetando a banda 12q14.3 (inversão pericêntrica de novo) envolvendo portanto o gene *HMGA2*. O quadro clínico descreve um fenótipo caracterizado por hipercrecimento somático, avanço da idade óssea e dentária, tumor cerebelar e lipomas múltiplos⁽⁷²⁾, achados não presentes em nenhum caso da nossa casuística.

Além disso, na família B, as alterações identificadas no indivíduo B1 não estavam presentes no indivíduo B2, indicando, portanto que não segregam com fenótipo da LMF, sendo descartado nessa família tal associação como causadora do distúrbio investigado.

Não foi possível padronizar o sequenciamento do éxon 1 do gene *HMGA2* em tempo hábil deste estudo, devendo ser realizado futuramente para que se possa finalizar a investigação do referido gene nesta doença.

Quanto às variantes presentes no indivíduo A, considerando esses resultados contraditórios, será necessário estudos funcionais dessas variantes para verificar seu real significado biológico e de serem confirmadas essas duas alterações nosso trabalho seria o primeiro a corroborar mediante investigação do DNA constitucional uma base genética para ao menos parte dos casos dessa doença.

CONCLUSÕES

A LMF é uma condição rara que possui uma apresentação clínica heterogênea e um significativo componente genético sugerindo um mecanismo de herança autossômico dominante que, na presente amostra, se sobrepôs com outras síndromes dermatológicas (Doença de Dercum) em ao menos um indivíduo.

A história natural da LMF na presente casuística revela que o desenvolvimento das lesões é progressivo e atinge a idade média adulta, afetando ambos os sexos em proporções semelhantes e apresentando uma distribuição topográfica com predomínio em extremidades e tronco.

Características como sobrepeso, obesidade e doença gastrointestinal (inclusive maligna) estiveram presentes em todas as mulheres avaliadas.

A variante alterada no éxon 5 do gene *HMGA2* tem significado incerto na gênese da LFM, devendo ser confirmada por outros tipos de estudos e em um número maior de indivíduos afetados para estabelecer uma atribuição real de causalidade.

Os resultados negativos da análise molecular nos genes *AKT1*, *APC*, *MEN-1*, *PIK3CA* e *PTEN* excluíram que estes sejam responsáveis pelo fenótipo, ao menos na presente amostra.

REFERÊNCIAS

1. Tadisina KK, Mlynek KS, Hwang LK, Riazi H, Papay FA, Zins JE. Syndromic Lipomatosis of the Head and Neck: A Review of the Literature. *Aesthetic Plast Surg*. 2015;39(3):440-8.
2. Keskin D, Ezirmik N, Çelik H. Familial Multiple Lipomatosis. *Isr Med Assoc J*. 2002;4(12):1121-3.
3. Bartuma H, Panagopoulos I, Collin A, Trombetta D, Domanski HA, Mandahl N, et al. Expression levels of HMGA2 in adipocytic tumors correlate with morphologic and cytogenetic subgroups. *Mol Cancer*. 2009;8:1-11.
4. Dequeker J, Muls E, Leenders K. Xanthelasma and Lipoma in Leonardo da Vinci's Mona Lisa. *Isr Med Assoc J*. 2004;6(August):505-6.
5. Jarvis D. Mona Lisa [Internet]. Flickr, Yahoo company. [cited 2017 Sep 9]. Available from: <https://www.flickr.com/photos/archer10/16236519171/in/photolist-qJLptH>
6. Lee C-H, Spence RAJ, Upadhyaya M, Morrison PJ. Familial multiple lipomatosis with clear autosomal dominant inheritance and onset in early adolescence. *BMJ Case Rep*. 2011;2011:2010-2.
7. Huczak L, Driban NE. Lipoma y lipomatosis. *Rev Argentina Dermatologia*. 2007;88(1):56-66.
8. Leffell DJ, Braverman IM. Familial multiple lipomatosis. Report of a case and a review of the literature. *J Am Acad Dermatol*. 1986;15(2 Pt 1):275-9.
9. Shanks JA, Paranchych W, Tuba J. Short communications: Familial Multiple Lipomatosis. *Can Med Assoc J*. 1957;77:881-4.
10. Kurzweg FT, Spencer R. Familial Multiple Lipomatosis. *Am J Surg* [Internet]. 1951;762-5. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMicm1316241>.

11. Blaschko H. Eine seltene erbliche Lipombildung. Virchows Arch f path Anat., 1891;124:175.
12. Das Gupta T. Tumors and tumor-like conditions of the adipose tissue. Curr Probl Surg. 1970;7(3):1-60.
13. Gologorsky D, Gologorsky Y, Yarygina AS, Surti U, Zirwas MJ. Familial multiple lipomatosis: Report of a new family. Cutis. 2007;79(3):227-32.
14. Sandberg AA. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: Lipoma. Cancer Genet Cytogenet. 2004;150(2):93-115.
15. Bancroft LW, Kransdorf MJ, Peterson JJ, O'Connor MI. Benign fatty tumors: Classification, clinical course, imaging appearance, and treatment. Skeletal Radiol. 2006;35(10):719-33.
16. Medina CR, Schneider S, Mitra A, Spears J. Giant submental lipoma: Case report and review of the literature. Can J Plast Surg. 2007;15(4):219-22.
17. D'Ettorre M, Gniuli D, Guidone C, Bracaglia R, Tambasco D, Mingrone G. Insulin sensitivity in familial multiple lipomatosis. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2013;17(16):2254-6.
18. Ware R, Mane A, Saini S, Saini N. Familial multiple lipomatosis - a rare syndrome diagnosed on FNAC. Int J Med Sci Public Heal. 2016;5(2):367-9.
19. Rosmaninho A, Pinto-Almeida T, Fernandes IC, Machado S, Selores M. Do you know this syndrome? Werner syndrome. An Bras Dermatol. 2012;87(2):324-5.
20. Imerci A, Kaya A, Ilyas G, Surer L. Familial Multiple Lipomatosis: Report of Two Cases. 2012;vol.17,p.17-20.
21. Ashok AJ, Jeyaraman V, Mathews TRR, Livingston ZD, A MFA. A rare case of lipoma anterior neck mimicking a Goitre - Case Report. J Evid Based Med Healthc. 2017;4(59):3595-7.

22. Chirilă D, Gligor D. Familial Multiple Lipomatosis. Vol. 6, Human & Veterinary Medicine. International Journal of the Bioflux Society. 2014;p.66-9.
23. Arabadzhieva E, Yonkov A, Bonev S, Bulanov D, Taneva I, Ivanova V, et al. A rare combination between familial multiple lipomatosis and extragastrointestinal stromal tumor. Int J Surg Case Rep. 2015;14:117-20.
24. Yee JK, Phillips SA, Allamehzadeh K, Herbst KL. Subcutaneous adipose tissue fatty acid desaturation in adults with and without rare adipose disorders. Lipids Health Dis. 2012;11(19):11.
25. Herbst KL. Rare adipose disorders (RADs) masquerading as obesity. Acta Pharmacol Sin. 2012;33(2):155-72.
26. Ashar HR, Chouinard RA, Dokur M, Chada K. *In vivo* modulation of HMGA2 expression. Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech [Internet]. 2010; 1799(1-2):55-61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2009.11.013>.
27. Fletcher CDM, Unni KK. World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone. Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F, editors. International Academy for Research on Cancer (IARC). Lyon, France: IARC Press International Agency for Research on Cancer (IARC) 69008 Lyon, France; 2002;1-371p.
28. Tana C, Tchernev G. Familial Multiple Lipomatosis [Internet]. Vol. 371, New England Journal of Medicine. 2014;p.1237-1237. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMicm1316241>.
29. Al-Basti HA, El-Khatib HA. The use of suction-assisted surgical extraction of moderate and large lipomas: Long-term follow-up. Aesthetic Plast Surg. 2002;26(2):114-7.
30. Hansson E, Svensson H, Brorson H. Review of Dercum's disease and proposal of diagnostic criteria, diagnostic methods, classification and management. Orphanet J Rare Dis. 2012;7(23):1-15.

31. Vaughan CJ, Weremowicz S, Goldstein MM, Casey M, Hart M, Hahn RT, et al. A t(2;19)(p13;p13.2) in a giant invasive cardiac lipoma from a patient with multiple lipomatosis. *Genes Chromosom Cancer*. 2000;28(2):133-7.
32. Djuric-Stefanovic A, Ebrahimi K, Sisevic J, Saranovic D. Gastroduodenal Lipomatosis in Familial Multiple Lipomatosis. *Med Princ Pract*. 2016;26(2):1-3.
33. Nunes JC, Martins RF, Bastos A, Claudino LS, Guarnieri R, Lima DDC, et al. Brain lipoma, corpus callosum hypoplasia and polymicrogyria in Familial Multiple Lipomatosis. *Clin Neurol Neurosurg*. 2013;115(7):1157-9.
34. Stamelou M, Wood N, Bhatia KP. The Entity of Parkinsonism and associated Lipomatosis. *Clin Notes*. 2014;83:1673-4.
35. Bracaglia R, D'Ettorre M, Gentileschi S, Mingrone G, Tambasco D. Multiple lipomatosis after stem cell trasplant and chemotherapy: A case report. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014;18(3):413-5.
36. Cronin PA, Myers E, Redmond HP, O'Reilly S, Kirwan WO. Lipomatosis: An unusual side-effect of cytotoxic chemotherapy? Vol. 90, *Acta Dermato-Venereologica*. 2010;p.303-4.
37. Alatawi FO. Mitral valve annular caseous calcification causing severe mitral valve stenosis and familial multiple lipomatosis: Case report and literature review. Vol. 12, *Journal of Taibah University Medical Sciences*. Elsevier Ltd; 2017; p.169-73.
38. Bois MC, Bois JP, Anavekar NS, Oliveira AM, Maleszewski JJ. Benign lipomatous masses of the heart: A comprehensive series of 47 cases with cytogenetic evaluation. *Hum Pathol*. 2014;45(9):1859-65.
39. Rudolph R, Barnett T. Deep Vein Thrombosis Risk - First External Physical Marker - Multiple Lipomas Associated with Thrombophilia. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2016;76.
40. Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al. GeneReviews® [Internet]. [Internet]. NCBI. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1116/?term=lipomatosis>.

41. Bechara FG, Sand M, Sand D, Rotterdam S, Stucker M, Altmeyer P, et al. Lipolysis of lipomas in patients with familial multiple lipomatosis: an ultrasonography-controlled trial. *J Cutan Med Surg*. 2006;10(4):155-9.
42. Ardeleanu V, Chicos S, Georgescu C, Tutunaru D. Multiple benign symmetric lipomatosis -- a differential diagnosis of obesity. *Chir*. 2013;108(4):580-3.
43. Campen R, Mankin H, Louis DN, Hirano M, MacCollin M. Familial occurrence of adiposis dolorosa. *J Am Acad Dermatol*. 2001;44(1):132-6.
44. Cleynen I, Van de Ven WJM. The HMGA proteins: A myriad of functions (Review). *Int J Oncol*. 2008;32(2):289-305.
45. Fusco A, Fedele M. Roles of HMGA proteins in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(12):899-910.
46. Kubo T, Matsui Y, Naka N, Araki N, Myoui A, Endo K, et al. Specificity of fusion genes in adipocytic tumors. *Anticancer Res*. 2010;30(2):661-4.
47. Di Cello F, Hillion J, Hristov A, Wood LJ, Mukherjee M, Schuldenfrei A, et al. HMGA2 Participates in Transformation in Human Lung Cancer. *Mol Cancer Res*. 2008;6(5):743-50.
48. Ozturk N, Singh I, Mehta A, Braun T, Barreto G. HMGA proteins as modulators of chromatin structure during transcriptional activation. *Front Cell Dev Biol*. 2014;2:1-9.
49. EMBL-EBI. Chromosome 12: 65,824,131-65,966,295 [Internet]. The Ensembl Project. 2017 [cited 2017 Sep 7]. Available from: http://aug2017.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000149948;r=12:65824131-65966295;t=ENST00000403681.
50. Zhou X, Chada K. HMGI Family Proteins: Architectural Transcription Factors in Mammalian Development and Cancer. *Keio J Med*. 1998;47(2):73-7.
51. Noro B, Licheri B, Sgarra R, Rustighi A, Tessari MA, Chau KY, et al. Molecular dissection of the architectural transcription factor HMGA2. *Biochemistry*. 2003;42(15):4569-77.

52. NCBI. HMGA2 high mobility group AT-hook 2 [Homo sapiens (human)] [Internet]. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. 2017 [cited 2017 Sep 10]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8091>.
53. Battista S, Fidanza V, Fedele M, Klein-Szanto AJP, Outwater E, Brunner H, et al. The expression of a truncated HMGI-C gene induces gigantism associated with lipomatosis. *Cancer Res.* 1999;59(19):4793-7.
54. Zhou X, Benson KF, Ashar HR, Chada K. Mutation responsible for the mouse pygmy phenotype in the developmentally regulated factor HMGI-C. *Nature.* 1995;376:771-4.
55. Fedele M, Battista S, Manfioletti G, Croce CM, Giancotti V, Fusco A. Role of the high mobility group A proteins in human lipomas. *Carcinogenesis.* 2001;22(10):1583-91.
56. Battista S, Fidanza V, Fedele M, Klein-Szanto AJP, Outwater E, Brunner H, et al. The expression of a truncated HMGI-C gene induces gigantism associated with lipomatosis. *Cancer Res.* 1999;59:4793-7.
57. Finelli P, Giardino D, Rizzi N, Buiatitot S, Virduci T, Franzin A, et al. Non-random trisomies of chromosomes 5, 8 and 12 in the prolactinoma sub-type of pituitary adenomas: conventional cytogenetics and interphase FISH study. *Int J Cancer.* 2000;86(3):344-50.
58. Finelli P, Pierantoni GM, Giardino D, Losa M, Rodeschini O, Fedele M, et al. The High Mobility Group A2 gene is amplified and overexpressed in human prolactinomas. *Cancer Res.* 2002;62(8):2398-405.
59. Fedele M, Berlingieri MT, Scala S, Chiariotti L, Viglietto G, Rippel V, et al. Truncated and chimeric HMGI-C genes induce neoplastic transformation of NIH3T3 murine fibroblasts. *Oncogene.* 1998;17(4):413-8.
60. Park SM, Shell S, Radjabi AR, Schickel R, Feig C, Boyerinas B, et al. Let-7 prevents early cancer progression by suppressing expression of the embryonic gene HMGA2. *Cell Cycle.* 2007;6(21):2585-90.

61. Goodwin G. Molecules in focus The high mobility group protein, HMGI-C. *Int J Biochem Cell Biol.* 1998;30:761-6.
62. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor laboratory press. New York. 1989;p.931-57.
63. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press;1989.
64. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(15):1-12.
65. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 2012;13:1-11.
66. Rubinstein A, Goor Y, Gazit E, Cabili S. Non-symmetric subcutaneous lipomatosis associated with familial combined hyperlipidaemia. *Br J Dermatol.* 1989;120(5):689-94.
67. Kumar R, Pereira BJG, Sakhuja V, Chugh KS. Autosomal dominant inheritance in familial angiolipomatosis. *Clin Genet.* 1989;35(3):202-4.
68. Kanter WR, Wolfort FG. Multiple familial angiolipomatosis: treatment of liposuction. *Annals of plastic surgery, vol.20,1988;p.277-9.*
69. Sesthapongvanich K, Puangpet P. Familial multiple angiolipomatosis A case report and review of the literature. 2011;27(3):193-7.
70. Abbasi NR, Brownell I, Fangman W. Familial multiple angiolipomatosis. *Dermatol Online J.* 2007;13(1):12-3.
71. Fanburg-Smith J, Devaney K, Miettinen M, Weiss S. Multiple Spindle Cell Lipomas: A Report of 7 Familial and 11 Nonfamilial Cases. *Am J Surg Pathol.* 1998;22(1):40-8.
72. Ligon AH, Moore SDP, Parisi MA, Mealiffe ME, Harris DJ, Ferguson HL, et al. Constitutional rearrangement of the architectural factor HMGA2: a novel human phenotype including overgrowth and lipomas. *Am J Hum Genet [Internet].* 2005;76(2):340-8. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002929707625853>.

APÊNDICE

8.1- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

PESQUISA: CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E MOLECULAR NA LIPOMATOSE MÚLTIPLA FAMILIAL

As informações contidas neste documento legal, fornecidas pelos médicos DIANA MARCELA MEJÍA GRANADOS e CARLOS EDUARDO STEINER têm por objetivo firmar acordo escrito com o(a) voluntária(o) para participação da pesquisa acima referida, autorizando sua participação com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos a que será submetida(o).

- 1) **Natureza da pesquisa:** esta pesquisa tem como finalidade a caracterização molecular na Lipomatose múltipla familiar, isto quer dizer, a identificação do gene HMGA2 e sua possível associação no desenvolvimento da doença conhecida como Lipomatose múltipla familiar, que se caracteriza pela aparição gradual de nódulos subcutâneos de crescimento progressivo localizados em distintas partes do corpo e que apresentam-se em integrantes de uma mesma família. Com sua participação você poderá contribuir com os avanços na área da saúde, especificamente na área de genética humana, já que poucos estudos deste tipo têm sido feitos até agora. Nos casos negativos para mutações nesse gene, a investigação irá prosseguir com o estudo de outros genes associados às lipomatoses, como LPP, PTEN, AKT1, PIK3CA, MEN-1 e APC.
- 2) **Participantes da pesquisa:** o número de participantes vai depender daqueles que cumpram com os critérios de inclusão e que estejam dispostos a participar da investigação. A população alvo serão os indivíduos com quadro clínico altamente sugestivo de Lipomatose múltipla familiar (LMF) em seguimento pelo serviço de genética médica do Hospital das Clínicas da cidade de Campinas.

- 3) **Envolvimento na pesquisa:** Ao participar deste estudo você tem liberdade de se recusar a participar e, mesmo que tenha consentido inicialmente, poderá retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo para você. Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa através do telefone do coordenador do projeto indicado ao final deste documento.
- 4) **Sobre as coletas:** Caso você participe, será necessário coletar um pequeno volume de sangue (aprox. 10mL) obtido por meio de punção de veia periférica, a partir do qual se fará a extração do DNA, imprescindível para a investigação dos genes relacionados com a doença (Lipomatose múltipla familiar - LMF).
- 5) **Riscos e desconforto:** A participação nesta pesquisa não traz complicações com risco à sua vida. Você poderá ter algum desconforto quando receber uma picada para colher o sangue do seu braço. A curto prazo pode apresentar dor, edema (inchaço) ou eritema (vermelhidão) local. Esses efeitos são temporários e costumam desaparecer em poucos dias. Os procedimentos utilizados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética na Pesquisa com Seres Humanos conforme resolução N° 340/04, 441/11 e 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.
- 6) **Confidencialidade:** Todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Apenas os membros da pesquisa terão conhecimento dos dados, assegurando assim sua privacidade. Serão protegidos os dados, resultados do teste, bem como o prontuário. Será mantido o sigilo médico e se evitará qualquer tipo de discriminação e/ou estigmatização, individual ou coletivas segundo os achados obtidos. Não será permitido o acesso da informação a terceiros. Em caso de divulgação dos resultados em trabalhos ou artigos médicos, seu nome não será citado.

- 7) **Benefícios:** Ao participar desta pesquisa você poderá se beneficiar com a confirmação do diagnóstico e com o aconselhamento genético seu e de seus familiares próximos. Além disso, esperamos que este estudo contribua com informações importantes que deve acrescentar elementos importantes à literatura, onde o pesquisador se compromete a divulgar os resultados obtidos.
- 8) **Pagamento:** Você não terá nenhum tipo de despesa ao autorizar sua participação nesta pesquisa, bem como nada será pago pela participação. Também não haverá despesas com transporte e alimentação, uma vez que os procedimentos serão realizados nos dias de consulta médica regular no Hospital de Clínicas.
- 9) **Liberdade de recusar ou retirar o consentimento:** Você tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem penalizações.
- 10) **Armazenamento do material:** O DNA obtido será usado exclusivamente para estudo dos genes ***HGMA2, PTEN, AKT1, PIK3CA, MEN-1*** e(ou) ***APC***. Você pode autorizar que o material restante seja guardado para uso em outras pesquisas futuras, desde que autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa. Por favor, marque uma das opções abaixo:
- () concordo em participar do presente estudo, porém **NÃO AUTORIZO** o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.
- () concordo em participar do presente estudo e **AUTORIZO** o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

() concordo em participar do presente estudo e **AUTORIZO** o armazenamento do meu material biológico, não sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, desde que aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

Em caso de falecimento ou condição incapacitante, os direitos sobre o material armazenado deverão ser dados a (indicar o nome e forma de contato de uma pessoa a ser avisada):_____

Contato:

Em caso de dúvidas sobre o estudo, você poderá entrar em contato com os pesquisadores Diana Marcela Mejía Granados e Dr. Carlos Eduardo Steiner no ambulatório de Genética - Genodermatoses do HC/Unicamp, no 3º andar, quadrante da dermatologia, telefone (19) 3521-7776 às quintas-feiras à tarde.

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você pode entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Unicamp das 08:30 às 17:00hs na Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas - SP; telefone (19) 3521-8936; fax (19) 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br

Consentimento livre e esclarecido:

Após ter recebido esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar:

Nome do(a) participante: _____

Data: ____/____/____.

(Assinatura do participante)

Responsabilidade do Pesquisador:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

Nome do(a) pesquisador: _____

Data: ____/____/____.

(Assinatura do pesquisador)

ANEXO

9.1- Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR NA LIPOMATOSE MÚLTIPLA FAMILIAL

Pesquisador: DIANA MARCELA MEJÍA GRANADOS

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 49982515.5.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da UNICAMP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.313.164

Apresentação do Projeto:

"A Lipomatose múltipla familiar (LPM) é uma doença benigna, de evolução progressiva e prognóstico favorável, pouco prevalente na população geral. Afeta principalmente a indivíduos do sexo masculino na quarta década e na maioria dos casos apresenta um padrão de herança autossômica dominante. Dentro dos fatores etiológicos se propõem mutações no gene HMGA2 que codifica para proteínas não histonas associadas à cromatina, cuja função está ligada a alterações estruturais e da regulação da transcrição, tendo influência sobre a proliferação e crescimento celular. O diagnóstico é clínico e se caracteriza pela presença de nódulos de tecido adiposo encapsulado, não dolorosos, de tamanhos e distribuição anatômica variáveis. A terapêutica é direcionada em reduzir o volume e melhorar o aspecto estético dos lipomas mediante técnicas farmacológicas e cirúrgicas. Estudos prévios sugerem o padrão de herança autossômica dominante e fazem a descrição clínica da doença e os possíveis diagnósticos diferenciais, no entanto, nenhum deles a tem caracterizada em nível molecular".

Objetivo da Pesquisa:

Caracterizar as bases moleculares de indivíduos com LMF atendidos no serviço de genética médica do Hospital das clínicas da Unicamp.

Objetivo Secundário: Serão pesquisadas mutações do gene HMGA2, as quais serão correlacionadas

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.313.164

ao fenótipo dos pacientes afetados. Também serão investigados outros genes associados às lipomatoses, como PTEN, AKT1, PIK3CA, MEN-1 e APC.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os riscos e/ou desconfortos são aqueles associados aos procedimentos da coleta de sangue como dor e/ou equimoses.

Benefícios: Possibilidade de confirmação diagnóstica e o aconselhamento genético.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa apresentada como trabalho de mestrado da pós-graduanda Diana Marcela Mejía Granados (pesquisadora responsável), com orientação do Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner. Nesta pesquisa, pretende-se caracterizar as bases moleculares de indivíduos com LMF atendidos no serviço de genética médica do Hospital das clínicas da Unicamp. Para isso, serão convidados a participar da pesquisa todos os pacientes (n=5) adultos com LMF que estejam em acompanhamento regular nos ambulatórios do Serviço de Genética Clínica do HC/Unicamp. Serão pesquisadas mutações do gene HMGA2, as quais serão correlacionadas ao fenótipo dos pacientes afetados. Também serão investigados outros genes associados às lipomatoses, como PTEN, AKT1, PIK3CA, MEN-1 e APC. Haverá retenção de amostras, bem como, uso de fontes secundárias de dados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados:

1. Folha de rosto assinada pela pesquisadora responsável, Diana Marcela M Granados e por Antônio Gonçalves de Oliveira Filho, Coordenador de Assistência do Hospital de Clínicas da Unicamp, instituição indicada como proponente;
2. Termo de consentimento Livre Esclarecido;
3. Formulário da Plataforma Brasil com as informações básicas sobre o projeto.
4. Projeto completo.
5. Regulamento do biorrepositório.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

1. Não há pendências ou inadequações.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.313.164

Considerações Finais a critério do CEP:

- O sujeito de pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, “cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento”.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

**COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS**



Continuação do Parecer: 1.313.164

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_604036.pdf	08/10/2015 19:46:42		Aceite
Folha de Rosto	plataformabrasil.pdf	08/10/2015 18:56:39	DIANA MARCELA MEJÍA GRANADOS	Aceite
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorrepositorio_LMF.pdf	06/10/2015 11:26:44	DIANA MARCELA MEJÍA GRANADOS	Aceite
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_LMF.pdf	06/10/2015 11:26:31	DIANA MARCELA MEJÍA GRANADOS	Aceite
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_LMF.pdf	06/10/2015 11:26:17	DIANA MARCELA MEJÍA GRANADOS	Aceite

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 09 de Novembro de 2015

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br