



Glomangiomi cutanei multipli familiari: studio clinico e anatomico-patologico di cinque sospetti casi in una famiglia e analisi genetica con identificazione di una nuova mutazione

Alessandra Cerica¹, Riccardo Borroni¹, Vincenzo Grasso¹, Olga Ciocca¹,
Eloisa Arbustini², Maurizia Grasso², Camilla Vassallo¹

¹Clinica Dermatologica e ²Centro per le Malattie Genetiche Cardiovascolari,
Università degli Studi di Pavia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italia

Glomangiomi cutanei multipli familiari: studio clinico e anatomico-patologico di cinque sospetti casi in una famiglia e analisi genetica con identificazione di una nuova mutazione

Il glomangioma è un tumore benigno che origina dalle cellule muscolari lisce modificate di una formazione glomica. I glomangiomi multipli sono trasmessi con una ereditarietà di tipo autosomico dominante e sono considerati dei tumori rari: rappresentano infatti solo il 10% dei casi riportati in letteratura, anche se tale dato è verosimilmente per eccesso, in quanto i glomangiomi singoli raramente vengono riportati. Questo lavoro si è posto lo scopo di studiare un sospetto caso di glomangiomi cutanei multipli a carattere familiare, accertandone la diagnosi per mezzo dell'esame istologico delle lesioni asportate ed esame genetico per la ricerca delle mutazioni a carico del gene per la glomulina.

Familial cutaneous glomangiomas: clinical and pathological study of five suspected cases in a family with genetic analysis and identification of a new mutation

Glomangiomas are benign tumors arising from modified smooth muscle cells of a glomus body. Multiple glomangiomas have an autosomal dominant pattern of inheritance and they are considered quite rare tumors: they represent only 10% of the cases in literature, although this data is probably overestimated because solitary glomus tumors are rarely reported. The purpose of this work was to study a suspected case of familial cutaneous glomangiomas through histologic exam of removed lesions and the research of mutations in the glomulin gene.

Introduzione

Il glomangioma è un tumore benigno che origina dalle cellule muscolari lisce modificate di una formazione glomica, un recettore neuromioarterioso localizzato nel derma reticolare degli animali a sangue caldo e situato a livello delle anastomosi artero-venose, preposto alla registrazione delle variazioni di temperatura in risposta alle quali regola il flusso ematico arteriolare. Tale struttura è presente a li-

vello dell'intera superficie corporea, ma maggiormente concentrati in sede acrale. La prima descrizione di tumore glomico si deve a Wood che, nel 1812, lo descrisse come un tubercolo sottocutaneo doloroso [1], mentre per la prima descrizione istologica si dovette aspettare il 1924 con Masson. I glomangiomi sono costituiti da cellule monomorfe di forma ovoidale o cuboidale, con ampio citoplasma chiaro e vacuolizzato, nuclei grandi e nucleoli prominenti. Ciò che le rende simili alle cellule muscolari lisce è la presenza nel citoplasma di miofibrille a bassa densità che vanno ad aggregarsi formando corpi densi, probabilmente degli analoghi delle linee Z delle cellule muscolari striate. Studi di immunohistochemicali hanno evidenziato la positività delle cellule glomiche per vimentina, α SMA (α Smooth Muscle Actin) e actina muscolo-specifica; mentre risultano negative per desmina, antigene FVIII-reatto, antigene della membrana epiteliale, citocheratine, proteina S-100 e cromogranina. Clinicamente i glomangiomi possono essere distinti in sporadici (o singoli) e in familiari (multipli o singoli); le forme multiple sono a loro volta distinte in regionali o disseminate a seconda che le lesioni siano raggruppate in un unico distretto corporeo o interessino l'intera superficie cutanea.

Da un punto di vista istologico si possono invece differenziare tre forme in base alla diversa proporzione di cellule glomiche, vasi sanguigni e tessuto muscolare liscio presenti all'interno della lesione[2]: tumore glomico solido, glomangioma e glomangiomioma.

Questi tumori sono considerati piuttosto rari, anche se la loro esatta incidenza non è nota. È stato comunque stimato che essi rappresentino meno del 2% di tutti i tumori primari dei tessuti molli, e l'1-4.5% di tutti i tumori della mano.

La maggioranza (circa il 75%) di questi tumori si manifesta a livello della mano, e il 75-90% di questi interessa in particolar modo il letto ungueale [3].La variante più frequente è quella sporadica. Essa si manifesta con egual incidenza nei due sessi, anche se è stata registrata una maggior frequenza delle forme digitali nelle donne e di quelle extradigitali negli uomini (fra queste le sedi più frequenti sono i piedi e gli arti). Insorgono più comunemente tra i 30 e i 50 anni; tutte le età possono comunque essere interessate.

L'aspetto clinico caratteristico è quello di un nodulo dal diametro usualmente inferiore al centimetro, di colore rosso-bluastro e di consistenza soffice. La triade sintomatologica classica prevede la presenza di dolore, sensibilità al freddo e una dolorabilità localizzata.

Caso clinico

Si descrive il caso di una donna di 34 anni, presentatasi alla Clinica Dermatologica della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia per lesioni multiple nodulari, all'incirca quindici, localizzate all'arto inferiore destro. La paziente era in buone condizioni di salute generale e non lamentava disturbi al di fuori delle lesioni cutanee, talvolta dolenti e dolorabili. Le lesioni erano presenti fin dalla nascita della paziente, ma il loro numero numerico e le loro dimensioni erano progressivamente aumentati nel corso degli anni. Alcune lesioni erano state asportate all'età di 18 anni, senza esame istologico. All'esame obiettivo le lesioni si presentavano come noduli sottocutanei di dimensioni variabili da pochi millimetri al centimetro, maggiormente concentrate a livello della faccia mediale della gamba, di colore bluastro e consistenza soffice o duro elastica; non scomparivano alla digitopressione.

Nel sospetto clinico di neoformazioni vascolari, nel cui spettro si consideravano i glomangiomi e la *Blue Rubber Bleb Nevus Syndrome*, con il consenso della paziente è stata eseguito prelievo biotico escissionale di due distinte lesioni nei mesi di Marzo e Maggio 2010, rispettivamente la prima dalla gamba e la seconda dalla coscia destra.

Alla colorazione con ematossilina ed eosina, la prima lesione si presentava con un aspetto solido ed era probabilmente di recente insorgenza, ipotesi suggerita dalla presenza di fenomeni di neoangiogenesi, evidenziabili dalla presenza di numerosi piccoli vasi contenenti anche un singolo globulo rosso; erano inoltre visibili diversi spazi vascolari ectasici, ripieni di materiale ematico, delimitati da cellule endoteliali perlopiù poste in un singolo strato. Tutt'intorno a queste strutture erano presenti numerose cellule dalla forma ovoidale o cuboidale, monomorfe, poste in filiere e cordoni strettamente ammassati tra loro. Tali cellule presentavano un citoplasma relativamente ampio ed eosinofilo, in alcune erano apprezzabili dei vacuoli; i nuclei erano grandi. Non erano presenti figure mitotiche. Tali reperti morfologici sono caratteristici delle cellule glomiche. La seconda lesione presentava invece un aspetto più angiomatico (Figura 1), essendo probabilmente di insorgenza precedente alla prima: erano infatti presenti numerosi spazi vascolari delimitati da un singolo strato di cellule endoteliali e circondati da cellule glomiche, in quantità inferiore rispetto alla prima lesione. Anche nella seconda lesione erano presenti cellule di forma rotondeggiante caratterizzate da ampio citoplasma eosinofilo, variamente vacuolizzato, e grandi nuclei ipercromici, in assenza di figure mitotiche. Le cellule erano stipate e disposte a formare filiere e cordoni (Figura 2). Sulla base di tali reperti è stata posta diagnosi istologica di glomangioma per entrambe le lesioni asportate.

Per la presenza di glomangiomi multipli, nel sospetto di glomangiomatosi la paziente, espresso il suo consenso in proposito, è stata sottoposta a prelievo di sangue periferico per eseguire test genetico per la ricerca delle mutazioni del gene per la glomulina. Il prelievo di sangue periferico per l'analisi molecolare del gene della glomulina (GLMN) è stato eseguito in sede di consulenza genetica presso il Centro per le Malattie Genetiche Cardiovascolari del Policlinico San Matteo di Pavia. Il DNA genomico totale è stato estratto dal campione ematico utilizzando un kit commerciale (Maxwell Blood DNA Purification Ki, Promega), ed utilizzato per l'analisi molecolare del gene GLMN. I *primers* oligonucleotidici specifici per l'amplificazione dei 18 esoni (dal 2 al 19, l'esone 1 non è codificante) sono stati disegnati utilizzando le seguenti sequenze di riferimento: Ensembl ENSG00000174842 (gene), Ensembl ENST00000370360 (DNA messaggero), Ensembl ENSP00000359385 (proteina). L'analisi molecolare del gene GLMN è stata effettuata mediante amplificazione con PCR (reazione a catena della polimerasi) in un termociclatore automatico GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). I frammenti amplificati sono stati separati mediante elettroforesi su un gel 2% nusieve, 1% agarosio, colorati con etidio bromuro ed osservati su transilluminatore UV. In seguito, i frammenti amplificati sono stati purificati mediante biglie magnetiche (Agencourt AMPure, Beckman Coulter) e sottoposti a sequenziamento automatico diretto su sequenziatore capillare ABI 3130 xl. I prodotti di marcatura sono stati ulteriormente purificati, per eliminare i fluorocromi in eccesso, mediante piastre Centri-sep columns (Princeton Separation). I campioni sono stati quindi diluiti in formamide deionizzata HiDi (Applied Biosystems), denaturati (98°C per 3') e sottoposti ad elettroforesi capillare su sequenziatore capillare automatico ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer. L'analisi molecolare mediante sequenziamento automatico diretto del gene GLMN ha permesso di identificare la seguente mutazione germinale sul DNA estratto dal sangue periferico: GLMN ex12: Leu374LeufsX4 (delTT con codone 377 di STOP).

La probanda è stata inoltre sottoposta ad una terza biopsia per la ricerca della mutazione somatica a livello del tessuto periferico interessato. L'analisi genetica ha però dato esito negativo.

Discussione

La formazione glomica è una struttura neuromioarteriosa con funzione di termoregolazione, composta da un'arteriola afferente ed una venula efferente tra loro in comunicazione attraverso anastomosi artero-venose (Canali di Sucquet-Hoyer), e circondata da cellule specializzate simili alle cellule muscolari lisce (cellule glomiche). I tumori benigni derivanti da questa struttura prendono il nome di tumori glomici o glomangiomi. I tumori glomici multipli, o familiari (MIM # 138000), rappresentano la forma più rara: sono infatti state descritte solo 100 famiglie affette in tutto il mondo, costituendo solo il 10% dei casi riportati in letteratura [4-5]. Rispetto alla forma sporadica presentano un'età di insorgenza più precoce, con le prime manifestazioni già durante l'infanzia e, soprattutto, durante la pubertà; presentano inoltre una predilezione per il sesso maschile. Clinicamente le lesioni hanno lo stesso aspetto di quelle sporadiche, presentandosi cioè come dei noduli a localizzazione sottocutanea, di colore rosso-bluastro, diametro in genere inferiore al centimetro e consistenza più o meno soffice; la sintomatologia dolorosa è incostante potendo essere sia presente che assente, evenienza quest'ultima più frequente. Sebbene per definizione la glomangiomasosi familiare si differenzi dalla forma sporadica per la presenza di glomangiomi multipli, solitamente presenti in un numero compreso fra i 10 e i 20, una distinzione netta tra le due forme non è sempre possibile. La glomangiomasosi familiare può infatti presentarsi in modo atipico, ovvero con un numero di lesioni assai limitato. Fra i casi studiati in questo lavoro, infatti, solo due hanno più di dieci lesioni; fra i tre pazienti rimanenti, invece, uno presenta due sole lesioni, mentre gli altri due una singola lesione nodulare.

L'organo maggiormente interessato è la cute, tuttavia, anche se eccezionali, sono state riportate localizzazioni a livello di altri siti anatomici, e in particolare: trachea, bronchi, polmone, mediastino, pene, testicoli, vagina, cervice, ovaio, pelvi renale, vescica, esofago, stomaco, intestino, fegato, pancreas, cavità nasali, lingua, vene. La localizzazione extracutanea di maggiore interesse e maggiormente approfondita in letteratura è quella gastrointestinale, ed in particolar modo la localizzazione gastrica. Il primo caso fu riportato da Kay et al nel 1951 e ad oggi in letteratura sono noti 200 casi [11]. La loro frequenza è stimata essere intorno all'1%, tendenzialmente è più interessato il sesso femminile e la fascia di età compresa tra la quinta e la sesta decade. Sono in genere solitari e la porzione di stomaco più spesso coinvolta è la grande curvatura. Il quadro clinico è dominato da epigastralgia e sanguinamenti comportanti ematemesi o melena; occasionalmente possono essere presenti anche nausea e vomito. La maggior problematica ad essi legata appare quindi essere il sanguinamento che, se di grandi proporzioni, può portare a un pericolo per la vita, mentre se di entità minore può condurre all'insorgenza di un'anemia cronica per un continuo stitilicidio. Di fronte a un caso di glomangiomasosi familiare, data l'elevata probabilità di sviluppare lesioni multiple, risulta quindi prudente valutare l'eventualità di intraprendere un follow-up per monitorare la possibile presenza o insorgenza di glomangiomi gastrointestinali. Le metodiche diagnostiche maggiormente utilizzate sono l'endoscopia, la tomografia computerizzata e in ultima istanza l'esplorazione laparoscopica o laparotomia: tali metodiche sono costose e chiaramente invasive per cui non si ritengono giustificate in assenza di sintomi d'allarme. Appare dunque più ragionevole un approccio conservativo basato sulla misurazione dell'emocromo e sulla ricerca di sangue occulto nelle feci, seguiti da esami più specifici solo qualora risultassero positivi.

I glomangiomi multipli sono trasmessi con una ereditarietà di tipo autosomico dominante, presentano una espressività variabile e una penetranza incompleta, che sale dal 70% all'età di 5 anni fino a quasi il 100% all'età di 30 anni. Il gene responsabile della glomangiomasosi familiare è stato identificato da P. Brouillard ed è localizzato sul braccio corto del cromosoma 1 in posizione 1p21-22; tale regione è denominata locus VGLOM. Misura circa 55kbp e contiene 19 esoni che codificano per la glomulina, proteina di 1785 bp la cui esatta funzione non è ancora nota, ma è stato ipotizzato un suo coinvolgi-

mento nella genesi e nel corretto sviluppo dei vasi sanguigni. La perdita di funzione o l'alterata funzione di tale proteina sembra essere l'unica causa delle lesioni vascolari, e il meccanismo patogenetico sembra essere un'alterazione nel reclutamento e nella differenziazione delle cellule muscolari lisce vascolari. Ad oggi sono note 17 mutazioni a carico della glomulina: fra queste ve ne sono quattro che si presentano con maggior frequenza, rendendosi responsabili dei due terzi dei casi. La più comune è 157delAAGAA presente in ben il 48.8%, seguono 108C→A (11.8%), 554delA+556delCCT (4.7%) e 1179delCCA (4.7%). Secondo uno studio condotto da Brouillard, Ghassibè, Penington *et al* nel 2005 queste quattro mutazioni rendono conto del 70% dei casi di glomangiomasosi familiare, mentre l'altro 30% è da ascrivere a mutazioni uniche di ogni singola famiglia[6-7]. Per spiegare l'assenza di correlazione fenotipo-genotipo, il carattere unifocale delle lesioni che si presentano quasi esclusivamente a livello cutaneo, e la diversa espressività di una stessa mutazione germinale, diversi autori hanno abbracciato la teoria del *second hit*. Secondo tale teoria affinché una lesione si possa sviluppare è necessario che intervenga un "second hit", ovvero una mutazione somatica a livello dell'allele normale (l'allele non interessato dalla mutazione germinale): in questo modo si ha una perdita totale della funzione della glomulina. Se tale mutazione somatica interviene precocemente si avranno lesioni ampie (forma congenita in placca), al contrario se la seconda mutazione avviene più tardivamente le lesioni saranno di dimensioni minori. È infine importante differenziare le mutazioni responsabili della glomangiomasosi familiare da quelle che intervengono in altre patologie fenotipicamente simili. Fra queste si ricordano le mutazioni del gene TIE-2 sul cromosoma 9p21 responsabile della forma familiare delle malformazioni venose[8-9], e la mutazione del *locus* 11q23 associata ai paragangliomi derivanti dalle cellule del sistema APUD [10]. Gli studi genetici condotti sulla paziente studiata hanno permesso di identificare una nuova mutazione germinale (delezione) a carico del gene per la glomulina (MIM # 601749). Tale mutazione è Leu374LeufsX4 (delTT con codone 377 di STOP) ed è nell'esone 12 del gene. La delezione delle 2T comporta l'introduzione del codone di stop in posizione 377, il quale impartisce il segnale di interruzione della sintesi della proteina codificata, la quale risulterà troncata e verrà quindi rimossa. Facendo riferimento a uno studio condotto da Brouillard *et al* [6] la mutazione riscontrata nella nostra paziente è quindi da inquadrare all'interno di quel 30% dei casi in cui la glomangiomasosi familiare è da ascrivere ad una mutazione caratteristica di una famiglia. All'interno della famiglia della paziente studiata sono presenti altri quattro membri, appartenenti a tre generazioni consecutive, presentanti manifestazioni cliniche vascolari, singole o multiple, assimilabili a glomangiomi e verosimilmente causate dalla mutazione germinale riscontrata nella paziente studiata. Tale studio verrà quindi ampliato e i pazienti sottoposti a prelievo di sangue periferico per ricerca delle mutazioni a carico del gene per la glomulina, e a biopsie cutanee per esame istologico ed analisi genetica per ricerca della mutazione somatica.

Conclusioni

Alla luce di quanto esposto si può affermare che una tempestiva diagnosi di glomangioma è importante per diversi aspetti:

- evita la persistenza di una sintomatologia dolorosa, a volte anche di entità importante, con ripercussioni sulla vita quotidiana, abuso di farmaci antidolorifici e possibilità di comparsa di sindromi da disuso della parte interessata.
- Permette l'esclusione di patologie a simile presentazione cutanea ma associate a prognosi *quoad vitam* non favorevole (es: Blue Rubber Bleb Nevus Syndrome, S. di Maffucci, S. di Osler-Rendu-Weber, S. di Klippel-Trenaunay-Weber, Melanoma Maligno).

- Nell'eventualità di sintomi gastroenterici associati si potrà procedere ad una valutazione a più ampio spettro del paziente, valutando l'eventualità di localizzazioni extracutanee di glomangiomi, ipotesi diagnostica che non verrebbe altrimenti presa in considerazione.

È inoltre importante sottolineare che la glomangiomasosi familiare può non presentarsi sempre con il quadro cutaneo caratteristico, dominato dalla presenza di noduli multipli: i pazienti possono infatti essere portatori di una singola lesione. Al fine di un corretto inquadramento clinico e diagnostico è dunque necessario indagare sempre l'anamnesi familiare del paziente, evitando quindi di utilizzare il numero delle lesioni come unico criterio diagnostico.

Tabelle e figure



Figura 1. Lesioni glomangiomatose multiple sull'arto inferiore destro della paziente.

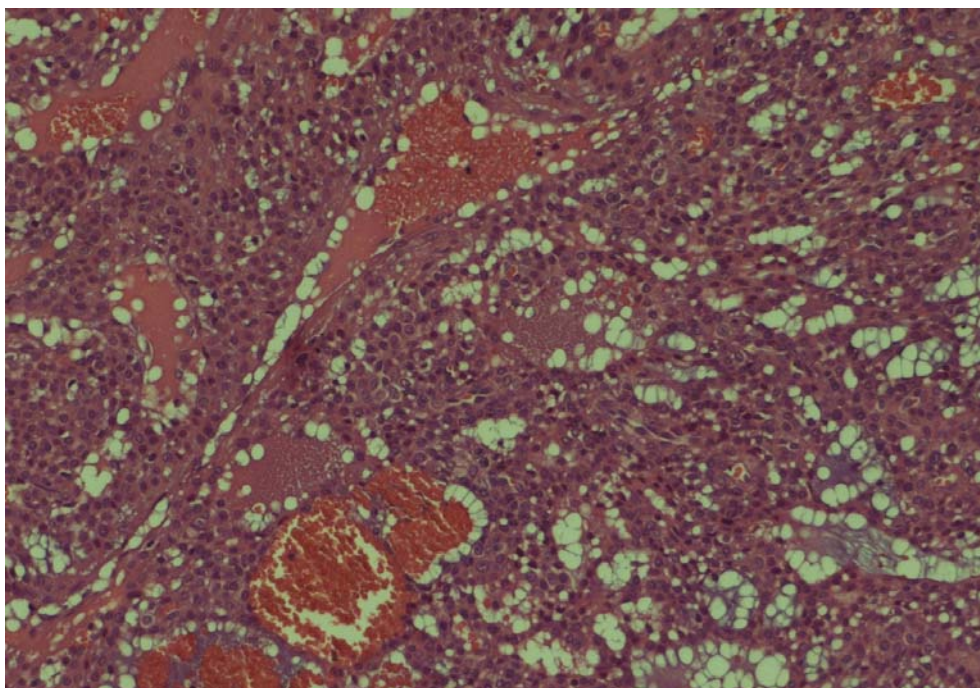


Figura 2. Glomangioma (prima lesione asportata). Vasi ectasici, aree solide, aree solide vacuolizzate. (Ematossilina-Eosina, ingrandimento 60×).

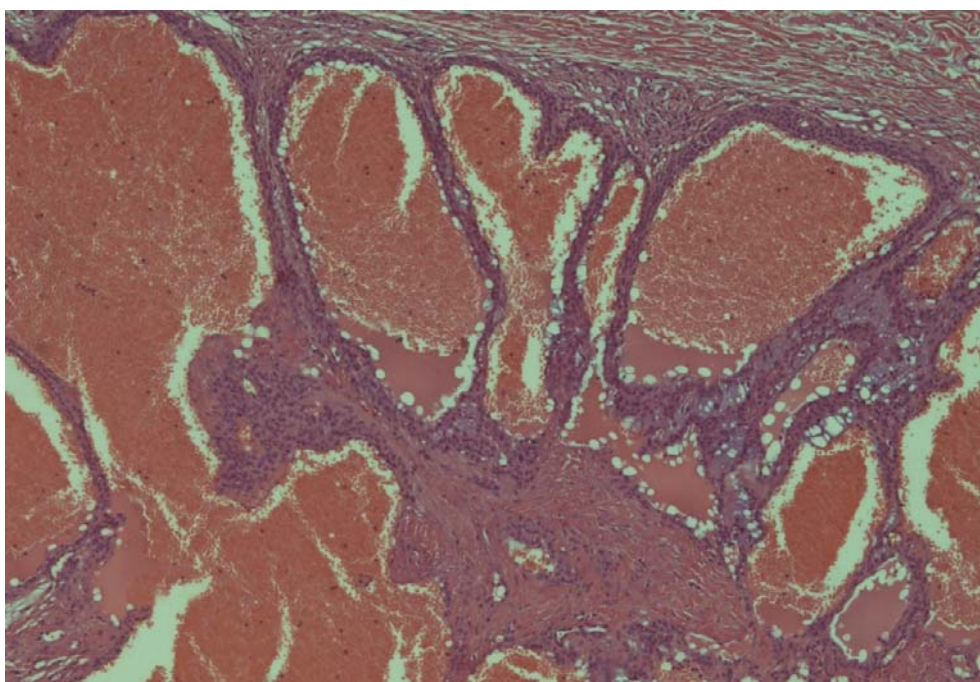


Figura 3. Glomangioma (seconda asportazione). Visibili spazi vascolari più grandi e numerosi circondati da un minor numero di cellule glomiche rispetto alla prima lesione. (Ematossilina-Eosina, ingrandimento 5×).

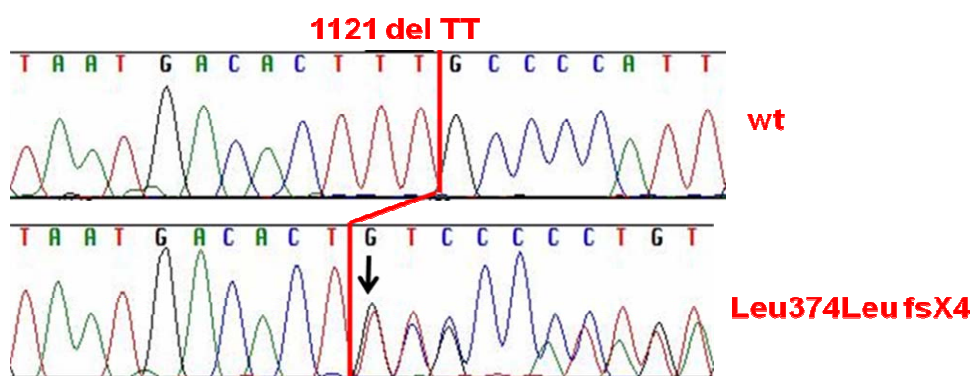


Figura 4. Delezione (1121 del TT) nell'esone 12 del gene GLMN. La sequenza del paziente studiato (paziente n 1) è confrontata con la sequenza di controllo (cromatogramma wt). La freccia indica la posizione della delezione (dal nucleotide 1121 del cDNA) che introduce uno "STOP codon" tre aminoacidi dopo l'aminoacido 374.

Bibliografia

1. Wood W. On painful subcutaneous tubercle. *Edinb Med J* 1812;8:283-291.
2. Peretz E, Grunwald MH, Avinoach I et al. Solitary glomus tumor. *Australasian Journal of Dermatology* 1999;40:226-227.
3. Rao KS, Bentz V. Glomus tumor of the index finger. *Journal of Craniofacial Surgery* 2006;17(4):801-804.
4. Okechukwu A. Clinical features of multiple glomus tumors. *Dermatologic Surgery* 2008;34:7.
5. Goodman A. Multiple glomus tumors. *Arch Derm* 1971;103:1.
6. Brouillard E, Ghassibé R, Penington L et al. Four common glomulin mutations cause two thirds of glomvenous malformations ("familial glomangiomas"): evidence for a founder effect. *J Med Genet* 2005;42:e13.
7. Brouillard. Mutations in a novel factor, glomulin, are responsible for glomvenous malformations ("glomangiomas"). *AM J Hum Genet* 2002;70:866-874.
8. Boon E. A gene for inherited cutaneous venous anomalies ("glomangiomas") localizes to chromosome 1p21-22. *Am J Hum Genet* 1999;65:125-133.
9. Boon E. Glomvenous malformation (glomangioma) and venous malformation. *Arch Dermatol* 2004;140:971-976.
10. Blume-Peytavi R. Multiple familial cutaneous glomangioma: a pedigree of 4 generations and critical analysis of histologic and genetic differences of glomus tumors. *J Am Acad Dermatol* 2010;42:633-639.
11. Huang CC, Yu FJ, Jan CM et al. Gastric glomus tumor: a case report and review of the literature. *Kaohsiung J Med Sci* 2010;26:6.