



Dipartimento di Patologia Umana dell'adulto e dell'età evolutiva "Gaetano Barresi"

Dottorato di Ricerca

"Biotecnologie mediche e chirurgiche"

XXIX Ciclo

Settore Scientifico disciplinare: MED 20

**BALANITE XEROTICA OBLITERANS IN ETA' PEDIATRICA:
MECCANISMI DI DANNO BIOMOLECOLARE E RICERCA DI
STRATEGIE FARMACOLOGICHE INNOVATIVE**

Coordinatore: Chi.mo Prof. Giovanni Raimondo

Tutor: Chi.mo Prof. Carmelo Romeo

Tesi di Dottorato:

Dott.ssa Tiziana Russo

TRIENNIO 2014-2016

INDICE

PARTE GENERALE

1. INTRODUZIONE
2. CENNI STORICI
3. EPIDEMIOLOGIA
4. EZIOPATOGENESI
5. PRESENTAZIONE CLINICA
6. DIAGNOSI
7. TRATTAMENTO
8. COMPLICANZE
9. TRATTAMENTO DELLE COMPLICANZE
10. FOLLOW –UP

PARTE SPECIALE

1. SCOPO DEL LAVORO
2. MOLECOLE ANALIZZATE NELLO STUDIO
3. MATERIALI E METODI
 - *Reclutamento dei pazienti e prelievo dei campioni*
 - *Analisi dei trascritti genici mediante Real-Time PCR*
 - *Estrazione dell'RNA totale*
 - *Real Time-PCR*
 - *EMSA (Electrophoretic Shift Mobility Assay)*
4. RISULTATI
5. DISCUSSIONE
6. CONCLUSIONI

BIBLIOGRAFIA

1. INTRODUZIONE

Il Lichen Scleroatrofico (LS) è una malattia infiammatoria cronica della cute e della mucosa mediata dai linfociti che di solito colpisce la regione anogenitale.

In età pediatrica, la più comune manifestazione clinica della malattia è rappresentata dalla Fimosi, configurando sul piano clinico un quadro definito di balanite xerotica obliterante (BXO).

La malattia può anche coinvolgere il meato e progredire nei casi più gravi in stenosi e sclerosi dell'uretra con ostruzione urinaria fino all'insufficienza renale¹. Di recente Celis e al. hanno dimostrato come complicanze della malattia siano presenti in una percentuale che va dal 4 al 47% per quanto riguarda la stenosi del meato e, addirittura, dal 20 al 60% per la stenosi uretrale².

In letteratura i dati sulla reale incidenza della BXO appaiono contraddittori e vanno da un range del 5% al 52 %³. La differenza è legata ad una variabilità di fattori che includono le differenti indicazioni per la circoncisione, la diversa valutazione fatta da vari specialisti come pediatri, dermatologi, urologi e chirurghi pediatri⁴.

Inoltre è riportato un allarmante aumento di diagnosi misconosciute di LS, che viene posta solo in presenza delle complicanze. Bochove afferma che il 50% dei pazienti affetti da LS non sarebbe stato diagnosticato se non fosse stato effettuato l'esame istologico; vi è infatti discrepanza tra il basso numero di diagnosi ottenute al solo esame clinico e quelle ottenute dopo esame istologico³.

Secondo le recenti linee guida proposte dalla British Association of Dermatologists (BAD), pubblicate nel 2010, l'esame istologico rappresenta

il gold standard per la diagnosi, considerato che la patologia non può essere esclusa solo sulla base della negatività dell'esame clinico⁵.

Il LS è suscettibile sia di terapia medica che chirurgica, malgrado la terapia medica venga considerata come palliativo.

Gli obiettivi del trattamento sono: prevenire stenosi meatali o uretrali e la trasformazione maligna, alleviare la sintomatologia soggettiva e la sensazione di disagio estetico.

La circoncisione svolge un ruolo chiave nel trattamento precoce della malattia. De Pasquale et al trovarono che il 96% dei pazienti con lichen limitato al glande e al prepuzio possono essere trattati con successo con la sola circoncisione, a tali conclusioni giungono anche altri autori^{6,7,8}.

L' eziologia di LS è poco conosciuta e verosimilmente multifattoriale.

Sono stati chiamati in causa diversi fattori quali predisposizione genetica, influenze ormonali, traumatismi (fenomeno di Koebner) e processi autoimmuni, sebbene nessuno sia considerato fattore determinante².

Sono state descritte alterazioni a carico della immunità umorale e cellulo-mediata. In maschi adulti con LS è stata individuata una più alta incidenza di anticorpi organo-specifici rispetto alla popolazione normale, ed è stata anche notata una più alta correlazione con altre patologie autoimmuni, quali diabete, vitiligine, alopecia⁹. Anticorpi diretti contro l'ECM1 (Extracellular Matrix 1 Protein) sono stati trovati in lesioni genitali^{10,11}.

Uno studio sull' espressione genica in prepuzio di uomini adulti e di bambini con LS ha dimostrato che i geni maggiormente espressi codificano per proteine coinvolte nelle risposte immuni di difesa cellulare¹⁰. E' stata inoltre dimostrata una riduzione nell' espressione delle proteine essenziali per il rimodellamento tissutale¹² rispetto a quanto osservato nei tessuti sani. Il LS è inoltre considerato una potenziale lesione

precancerosa e un fattore di rischio per il carcinoma a cellule squamose del pene¹³.

Sebbene clinicamente ed istologicamente il LS esibisca caratteristiche di uno stato infiammatorio con assottigliamento epiteliale, cicatrizzazione e modifiche del derma, i patterns molecolari alla base della malattia sono ancora sconosciuti. Alcuni studi si sono concentrati sulle alterazioni delle vie molecolari prevalentemente sulla vulva e su prepuzio di pazienti adulti, mentre i meccanismi molecolari alla base della patogenesi della patologia nei bambini sono stati scarsamente esplorati fino ad ora.

Ne deriva quindi la necessità di effettuare ulteriori studi per meglio caratterizzare i meccanismi che sottendono la patologia per poter stabilire possibili bersagli per il trattamento pre-operatorio, post-operatorio e delle complicanze. In considerazione che le complicanze da LS possono essere gravi e invalidanti appare quindi indicata l' identificazione e il trattamento di esse al fine di evitarle e dover ricorrere a trattamenti maggiormente invasivi e mutilanti.

2. CENNI STORICI

La malattia venne descritta per la prima volta dal dermatologo francese Hallopeau nel 1887 che le diede il nome di "Liche Plan Atrophique", dalla parola greca λεικην, per l'aspetto istopatologico che la rendeva simile ai *Licheni* che crescono sulle rocce o sulla corteccia degli alberi .

Avendo constatato che l'atrofia non risultava sempre istologicamente dimostrabile, nel 1976 Friedrich propose di eliminare l'aggettivo "atrophicus" lasciando solo la definizione di Lichen Sclerosus (LS).

Nel 1928 Stuhmer coniò il termine di Balanite Xerotica Obliterante, ed essa rappresenta la prima definizione ufficiale della forma maschile del LS¹⁴.

Il termine era legato alle 3 componenti principali della malattia: *Balanite* - per l'infiammazione cronica del glande; *Xerotica* per l'apparente secchezza delle lesioni; *Obliterante* per l'associazione occasionale con fenomeni endoarteritici¹⁴.

Nei bambini la prima diagnosi di lichen scleroatrofico venne posta nel 1962 da Catteral e Oates¹⁵.

I termini Lichen Sclero-atrofico e Balanite Xerotica Obliterante vennero usati come sinonimi interscambiabili nella letteratura urologica del passato. La differente definizione di uno stesso processo patologico e, quindi, la possibilità di generare confusione, ha spinto, nel 1976 the International Society for the Study of Vulvovaginal Disease e, successivamente nel 1995, the American Academy of Dermatology, ad adottare la definizione di Lichen Sclerosus o Lichen Scleroatrofico invece di Balanite Xerotica Obliterante, al fine di definire questa patologia in maniera univoca in entrambi i sessi e in tutte le sue forme e localizzazioni¹⁶.

3. EPIDEMIOLOGIA

Il Lichen Scleroatrofico (LS) è stato identificato in pazienti di tutte le età, a partire dal primo anno di vita.

La prevalenza va da 1: 60 a 1:1.000 sia in popolazione adulta che in popolazione pediatrica¹⁷

È tuttavia difficile stimare l'esatta prevalenza del LS, sia perché chi ne soffre ricorre spesso a differenti specialisti (pediatra, dermatologo, urologo, chirurgo pediatra) sia perché i pazienti non riferiscono i sintomi per paura o imbarazzo o perché asintomatici, sia perché l'interscambiabilità dei termini LS e BXO del passato ha contribuito a rendere ancora più varia la prevalenza e l'incidenza della malattia¹⁷.

In aggiunta numerose sono ad oggi le diagnosi poste tardivamente e solo in presenza delle complicanze¹⁸

I dati epidemiologici risultano vari e differenti in funzione della specialità interessata.

È comunemente ritenuto che il LS colpisca maggiormente il sesso femminile in postmenopausa, tra la quinta e la sesta decade, con un rapporto di 6:1 o 10:1 a seconda delle casistiche.

Negli studi effettuati su popolazione pediatrica i range sono ancora più vasti (Meuli et al 10% , Liatsilos et al 10.6% ,Charmens et al 14%,Clemmensen et al 14.2 % ,Mattioli et al 30%,Shankar and Richkwood 84%).¹⁹⁻²⁴

Il picco di incidenza è tra i 9 e gli 11 anni ,con un' età media di 7 anni, anche se recentemente Jayakumar ha dimostrato la presenza di LS anche in bambini al di sotto dei 5 anni.²⁵

Solo il 7-15% viene diagnosticato in età prepubere e in questi pazienti, il tasso di diffusione tra maschi e femmine ha un rapporto di 1:1⁹.

4. EZIOPATOGENESI

L'eziopatogenesi del LS è ancora sconosciuta, probabilmente multifattoriale. Sono state proposte diverse teorie.

Recenti studi ritengono che la patogenesi di LS sia di possibile natura autoimmunitaria con sottostante predisposizione genetica.

La patologia rientrerebbe nelle immuno disregolazioni.

Sono infatti state descritte associazioni con malattie autoimmuni quali diabete, vitiligine, alopecia e tiroidite²⁶. E' stata inoltre messa in evidenza un'associazione significativa tra LS e il polimorfismo dell'antagonista del recettore dell'IL-1 (IL-1RA) già associato ad altre condizioni autoimmunitarie e malattie infiammatorie quali MICI, LES, psoriasi, sebbene la mutazione specifica per il LS non sia ancora stata individuata²⁷.

Il 17% della popolazione pediatrica affetta da LS presenta una storia familiare di malattia o di altre malattie autoimmuni.

La tiroidite presenta nei pazienti affetti da LS una prevalenza da 5 a 30 volte superiore rispetto alla popolazione generale^{28,29}

In uomini affetti da LS è stata inoltre, individuata una più alta incidenza di anticorpi organo-specifici rispetto alla popolazione normale e anticorpi diretti contro l'ECM1 (Extracellular Matrix 1 Protein) sono stati trovati nelle lesioni genitali^{30,31}

Lo studio di *Edmonds et al.* ha mostrato che la maggior parte dei geni overespressi nei prepuzi dei pazienti erano coinvolti nelle risposte di difesa cellulare¹⁰.

Lo studio di *Pilatz et al.* ha rilevato una up-regulation di 11 geni prevalentemente pro-infiammatori e una riduzione nell'espressione di proteine essenziali per il rimodellamento tissutale³¹.

E' stata anche descritta un'associazione tra antigeni HLA e LS, in particolare, HLA DQ7, DQ8 e DQ9 che potrebbero essere implicati nella differente espressione della malattia e dei siti cutanei interessati.

Per quanto riguarda invece la correlazione con l'HLA non si sono riscontrate significatività con gli alleli HLA di classi IA e IB, mentre si è vista un'aumentata incidenza in classe II, in particolare del DQ7.^{26,32,33}

E' stata descritta inoltre una associazione tra LS ed atopia (AD).

Nello studio di Lipscombe il 34% dei pazienti affetti da LS presentava manifestazioni atopiche e nello studio di Becker circa l' 80% dei pazienti affetti da LS aveva uno score di atopia compreso tra 8 e 9^{34,9}. Tuttavia non è stato ancora chiarito se LS e AD rappresentino aspetti di un comune difetto immunologico o se LS rappresenti una forma più grave di malattia atopica. L' ipotesi patogenetica più accreditata è che il disturbo atopico comporti un'alterazione della barriera cutanea rendendola più suscettibile alle infezioni e alle allergie e rappresenti un possibile agente trigger per LS⁹. LS è considerato inoltre una potenziale lesione precancerosa. *Gamblichler et al.* hanno mostrato un aumento significativo di MCM3 (Minichromosome maintenance protein 3) e Ki67 indicatori di replicazione cellulare, nei tessuti genitali di pazienti affetti da LS rispetto ai controlli sani e ai tessuti extragenitali . Inoltre, nelle lesioni di lunga data vi è overespressione di p53³⁵.

Il rischio di carcinoma della vulva è del 4-7 % nelle donne affette da LS rispetto alla popolazione non affetta (0.3%)³⁶.

L' associazione tra LS e carcinoma del pene è ancora controversa.

L' European Association of Urology classifica LS come lesione precancerosa ma la considera sporadicamente associata a LS.³⁷

Il tasso di malignità dei pazienti con LS è considerato del 2.3-8.4% , ma la conferma istologica di LS in pazienti con carcinoma del pene è del 28-44%¹³

L'ipotesi patogenetica è che LS rappresenti una displasia epiteliale che precede di molti anni la trasformazione maligna e quindi debba essere considerato un fattore di rischio long term¹³.

Svariati agenti infettivi sono stati associati al LS. Vista la presenza di aspetti clinici e istologici simili con l'Acrodermatite cronica atrofizzante causata dalla *Borrelia Burgorferi*, si è cercata una correlazione tra quest'agente eziologico e il LS senza però alcun risultato conclusivo³⁸. Sono stati investigati anche numerosi agenti virali. E' stata individuata un'alta frequenza di infezione da HPV.³⁹

Tuttavia, il LS non possiede le caratteristiche di una malattia sessualmente trasmessa. Anche VZV ed HCV sono stati investigati ma, non è ancora ben chiaro quale possa essere il ruolo di questi agenti virali. Si ritiene che vista la correlazione tra fenomeni autoimmunitari ed epatite HCV-correlata, il virus potrebbe indurre una reazione autoimmunitaria che potrebbe essere responsabile dello sviluppo di LS in questi pazienti.⁴⁰

È stata postulata un'ipotesi ormonale per spiegare le lesioni da LS della donna. Gli studi effettuati in merito all'espressione dei recettori estrogenici, progestinici e androgenici su tessuto vulvare hanno dimostrato per lo più la presenza di recettori degli androgeni il che potrebbe spiegare la mancanza di efficacia dei trattamenti estrogenici.⁴¹

Non ci sono in letteratura studi in merito all'espressione ormonale nelle lesioni maschili.

Alcuni studiosi hanno chiamato in causa anche il Fenomeno di Koebner, ovvero il ripetersi di traumi locali, per spiegare l'eziologia del LS.⁴²

Vi è infatti una maggiore incidenza di LS in pazienti con piercing genitale, ipospadia rispetto ai pazienti sottoposti a circoncisione alla nascita.

4. PRESENTAZIONE CLINICA

Il Lichen Scleroatrofico può avere una storia naturale insidiosa, infatti molti pazienti possono restare asintomatici anche per lunghi periodi, o aggressiva.

La malattia è limitata al prepuzio e al glande nel 57% dei casi, il meato è coinvolto nel 4% , mentre un 20% presenta un coinvolgimento uretrale.

In circa il 20% dei casi, la malattia non si rende evidente all'esame obiettivo genitale⁴³. Mentre nelle donne interessa prevalentemente la regione anogenitale con un interessamento extragenitale nel 15-20 % dei casi nel maschio viene risparmiata la regione perianale.

Il paziente riferisce prurito, indolenzimento, bruciore, difficoltà a retrarre il prepuzio, disuria e scarso flusso urinario.

I bambini più comunemente presentano disuria e spesso arrivano alla circoncisione per l'associazione con la fimosi.

In fase precoce possono essere individuate area discromatiche bianco-grigiastre, cicatrici sclerotiche simili a porcellana sulla porzione distale del prepuzio e sul glande. Segni patognomonici sono la presenza di un'area biancastra ed eritematosa intorno al meato descritta tipicamente come "*white ring*"⁴⁴

Al taglio chirurgico, il prepuzio si presenta generalmente ispessito e di consistenza aumentata.

Dopo l'incisione dorsale del prepuzio spesso si rivela un coinvolgimento del glande maggiore rispetto al solo esame esterno. Quasi sempre si reperta coinvolgimento del solco coronale e anche un interessamento perifrenulare con lesioni di colore madreperlaceo. Queste in particolare sono responsabili

della brevità del frenulo (per la sclerosi), con un maggiore o minore interessamento del meato.

Questo implica che la malattia insorga a livello del frenulo e solo dopo si espanda in direzione del meato uretrale⁴⁵. Spesso, le labbra del meato mostrano già delle mutazioni sclerotiche, ma la stenosi vera e propria è rara nelle fasi iniziali.

Nei casi più gravi la superficie interna del prepuzio è coinvolta fino al solco balanoprepuziale e il glande appare completamente coperto da uno strato corneo biancastro, di colorito madreperlaceo e consistenza pergamenacea.

Le lesioni possono diventare anelastiche e facilmente si fessurano durante i rapporti sessuali. Questa infiammazione cronica può portare allo sviluppo di un carcinoma squamo cellulare⁴³.

LS spesso interessa l'uretra maschile. Il coinvolgimento uretrale inizia in genere dal meato e, con il progredire della malattia, la fibrosi e l'interessamento si diffondono prossimalmente fino all'uretra posteriore, comportando lo sviluppo di sintomi urinari ostruttivi con danno retrogrado a carico della vescica e del rene

In corso di cistoscopia la mucosa uretrale coinvolta appare spesso pallida con fissurazioni focali o vere e proprie ulcerazioni. Fino ad oggi, non sono state mai riscontrate lesioni della mucosa vescicale e l'estensione prossimale della malattia è generalmente ben demarcata ma ci possono essere delle lesioni minime anche dopo il limite posteriore.

Il LS può entrare in diagnosi differenziale con l'Eritroplasia di Queyrat, il lichen planus, la leuplachie e la sclerodermia. Inoltre LS è associato nel 15-20% dei casi all'ipospadia²³.

L'estensione delle lesioni ad aree extragenitali è abbastanza comune sia negli uomini che nelle donne. In genere sono interessate l'interno coscia,

area sottomammaria, il collo, le spalle e i polsi. È stato riportato anche il coinvolgimento delle unghia.

L'interessamento della mucosa orale è stato raramente descritto.

Proprio in virtù della rarità delle lesioni orali, la mucosa della bocca è spesso raccomandata come tessuto di innesto privilegiato per la ricostruzione dell'uretra.

Stadiazione Clinica

1. STADIO 1. Coinvolgimento del prepuzio: prurito, bruciore e piccole soluzioni di continuo fastidiose. Anello biancastro del prepuzio che tende a non retrarsi più (fimosi), ostacolando l'attività sessuale.
2. STADIO 2. Coinvolgimento del glande: aree biancastre e rossastre sul glande e indurimento della mucosa. Il prepuzio si attacca al glande e non scorre più: scompare il solco del glande.
3. STADIO 3. Coinvolgimento del meato: il meato uretrale bianco che si restringe ostacolando la fuoriuscita dell'urina.
4. STADIO 4. Coinvolgimento dell'uretra: le pareti dell'uretra si induriscono e il canale si restringe per alcuni cm (stenosi uretrale), ostacolando la fuoriuscita dell'urina.
5. STADIO 5. Displasie del glande e tumore del pene: i pazienti con LS nell'8% dei casi sviluppano un tumore del pene.



Quadri clinici di Fimosi complicata da BXO : presenza di withe ring, placche fibrotiche, interessamento del frenulo e del meato uretrale esterno,fessurazioni della cute prepuziale

6. DIAGNOSI

La diagnosi di LS è fondamentalmente clinica con conferma bioptica, in accordo con le linee guida proposte dalla *British Association of Dermatologists* (BAD), pubblicate nel 2010.

Laddove sono presenti già le caratteristiche cliniche tipiche, non si rende essenziale eseguire l' esame istologico, mentre lo diventa in presenza di caratteristiche atipiche e dubbio diagnostico in merito alla trasformazione maligna.

Un'ulteriore analisi bioptica può rendersi, invece, necessaria in corso di follow-up nel momento in cui:

1. Vi è un sospetto di trasformazione neoplastica, ossia la presenza di aree di ipercheratosi, erosione o eritema, o la comparsa di nuove lesioni verrucose o papulose;
2. la malattia non risponde a un adeguato trattamento;
3. c'è un interessamento del LS anche a livello extragenitale, con caratteristiche che lasciano pensare a una sclerodermia;
4. ci sono aree pigmentate e quindi diventa essenziale escludere una proliferazione melanocitica anomala;

Le linee guida della BAD consigliano altresì di indagare circa il quadro immunitario del paziente, considerata la probabile eziologia della malattia e la frequente associazione con altri disordini autoimmuni, in particolare i disturbi tiroidei nel sesso femminile⁵.

Le caratteristiche istologiche patognomoniche del LS sono rappresentate da:

- Ipercheratosi dell'epitelio
- Degenerazione idropica delle cellule basali

- Sclerosi (ialinizzazione) del collagene subepiteliale
- Infiltrazione linfocitaria del derma
- Atrofia dell'epidermide con perdita della rete pegs
- Omogenizzazione del collagene nel terzo superiore del derma

Queste modificazioni dermo-epidermiche sono alla base dell'aspetto biancastro della cute, che tra l'altro può presentare, in qualsiasi area, infiltrati infiammatori patologici.⁴⁵

Hinchliffe et al. hanno messo in evidenza che l'infiltrato cellulare nel LS è interamente composto da Linfociti T e solo in piccole aree sono stati individuati piccoli aggregati di linfociti B CD20-positivi, posizionati leggermente più in profondità degli infiltrati a banda delle cellule T.

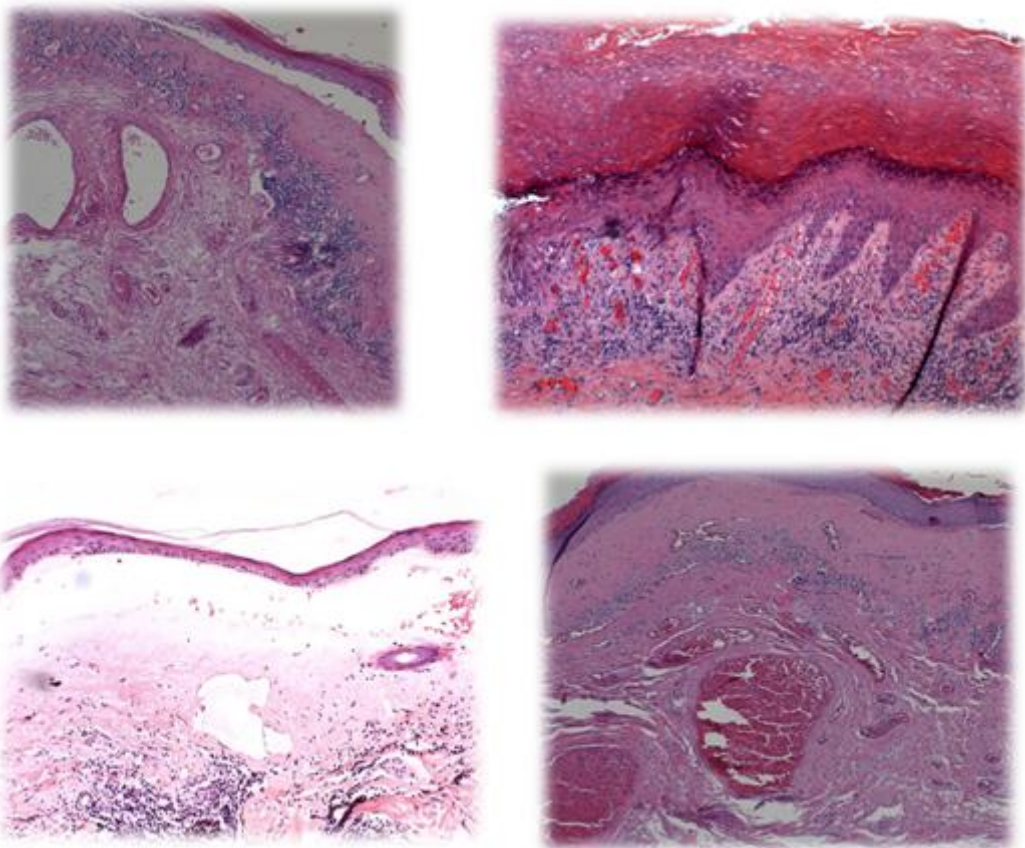
Inoltre, le piccole arterie e arteriole della parte superiore e media del derma possono mostrare segni di endoarterite obliterante⁴⁶.

Il LS viene classificato secondo *Histological criteria of stages of LS*

in acuto, subacuto, cronico e cronico attivato in base alle caratteristiche istologiche, specifiche per ogni stadio.

Stage	Histopathological feature
Acute	Lymphocytic invasion of basal layer of epidermis Suprapidermal edema Disruption between dermis and epidermis More or less pronounced band-like inflammatory infiltrate
Subacute	Lymphocytic invasion of basal layer of epidermis Suprapidermal edema Disruption between dermis and epidermis Initial hyalinization of the superficial dermis

	More or less pronounced band-like inflammatory infiltrate
Chronic	Well-expressed hyalinization of superficial dermis More or less pronounced band-like inflammatory infiltrate
Chronic Active	Lymphocytic invasion of basal layer of epidermis Suprapidermal edema Disruption between dermis and epidermis Well-expressed hyalinization of superficial dermis More or less pronounced band-like inflammatory infiltrate



All' esame istologico visibile degenerazione vacuolare, invasione linfocitica dello strato basale dell'epidermide, ialinizzazione di collagene del derma superiore, riduzione e perdita delle fibre elastiche. E.E. 400x

7. TRATTAMENTO

Gli obiettivi del trattamento del LS sono: alleviare la sintomatologia e il disagio, prevenire stenosi meatali o uretrali e la trasformazione maligna.

Il trattamento raccomandato è rappresentato dalla circoncisione, che viene considerata curativa senza la necessità di altri interventi in diversi studi presenti in letteratura⁶.

La circoncisione classica consiste nella rimozione completa del prepuzio cutaneo e mucoso a circa due mm dal glande, lasciandolo permanentemente scoperto. L'operazione prevede le seguenti fasi: il prepuzio viene completamente retratto sotto il glande e vengono separate attentamente le eventuali aderenze residue. Se l'apice si presenta stretto o cicatriziale può essere necessario realizzare una piccola incisura dorsale nella punta del prepuzio con le forbici. In un paziente con LS le aderenze sul glande possono essere particolarmente tenaci e la loro separazione traumatica. Vengono eseguite due incisioni circolari: una sulla mucosa prossimale del glande e l'altra sulla cute al di sotto del solco coronale, con la cute tirata al di sopra del glande. Con la cute sotto tensione, retratta sopra l'asta, viene eseguita sulla superficie dorsale una incisura circolare di circa 8 mm prossimalmente al glande. L'incisura è completata ventralmente, parallelamente al solco coronale, dove il frenulo e la sua arteria vengono incisi. Una pinza viene posizionata sulla linea mediana del bordo anteriore del prepuzio; una seconda è posizionata invece dalla parte opposta.

La seconda incisione viene eseguita al di sotto della corona del glande, il cui profilo può essere visto e sentito attraverso la cute prepuziale.

Anche questa incisura prosegue ventralmente, seguendo la normale angolatura del solco. Una incisura mediana viene eseguita in mezzo alle

due pinze con le forbici per far unire l'incisione del foglietto interno con quello esterno. Le forbici vengono anche usate per separare gli strati sottocutanei circoferenzialmente e asportare il manicotto prepuziale ottenuto. Con filo di sutura assorbibile si prosegue al ricongiungimento della cute con il prepuzio rimanente.

Il primo punto viene inserito per ricostruire il frenulo. Il secondo viene messo sulla linea mediana dorsale e il pene viene sospeso con questi due punti. Punti staccati sono posizionati a circa 5 mm di distanza l'uno dall'altro lungo ogni lato per completare la sutura .

Depasquale et al affermano che il 96% dei pazienti con LS limitato al glande e al prepuzio possono essere trattati con successo con la sola circoncisione.⁴³ La recidiva si presenta con maggiore facilità laddove l'intervento di circoncisione è stato eseguito in maniera troppo conservativa oppure sia stato impossibile eseguire una totale circoncisione.

Il restante 4%, invece, richiede interventi chirurgici concomitanti, quali la meatotomia o meatoplastica, l'uretroplastica e la cosiddetta "glans resurfacing" (consistente nell'escissione del glande, dell'epitelio subcoronale e del tessuto sottoepiteliale, ricoprendo poi il glande denudato con in innesto di cute extragenitale)⁴³.

Il trattamento medico può essere considerato addizionale alla circoncisione. E' stato descritto l' utilizzo di corticosteroidi sia prima del trattamento chirurgico sia dopo questo.

Gli steroidi infatti sono noti per le loro capacità di inibire i processi infiammatori cronici, il loro utilizzo in pazienti affetti da LS ha mostrato una diminuzione dei sintomi e in alcuni casi, anche la capacità di far regredire alcune trasformazioni istologiche della malattia.

In letteratura si reperta una suscettibilità della malattia agli steroidi pari al 40% rispetto al placebo. La British Association of Dermatologist dal 2010

considera il clobetasolo propionato in crema allo 0,05%, applicato due volte al giorno per due-tre mesi, farmaco di prima linea nel trattamento del LS⁵.

Una metanalisi su studi randomizzati effettuati sul trattamento topico nei pazienti affetti da LS ha confermato che il clobetasolo propionato rappresenta lo steroide più efficace nel trattamento della patologia in termini di riduzione della sintomatologia, dello stato infiammatorio e della remissione clinica⁴⁷.

In età pediatrica uno studio effettuato su 36 bambine affette da LS e trattate con clobetasolo propionato ha infatti mostrato che il 75% delle pazienti presentava completa remissione dopo trattamento e solo il 25% parziale risposta al trattamento, mentre uno studio effettuato su 40 bambini affetti da LS mostrava miglioramento clinico nel 40%^{48,17}.

Sono stati proposti in letteratura trattamenti topici alternativi ai corticosteroidi.

Le creme a base di testosterone propionato al 2% e di diidrotosterone al 2% hanno presentato una minore efficacia sia nell'immediato trattamento sia nella terapia di mantenimento rispetto al clobetasolo propionato. Anche l'utilizzo di creme al Progesterone al 2% non si è rivelata efficace nel trattamento del LS¹⁷.

Goldstein et al. ha testato l'efficacia del pimecrolimus 1% crema, un inibitore della calcineurina che inibisce la proliferazione di cellule T dopo stimolazione sia di antigeni specifici sia aspecifici, su lichen vulvare, ma anche questo confrontato con il clobetasolo propionato si è mostrato meno efficace⁴⁹.

Sono stati proposti anche trattamenti sistemici con retinoidi che hanno comportato eccessivi effetti collaterali.⁵⁰

Il clobetasolo propionato rimane quindi, ad oggi, il trattamento più appropriato per LS, sebbene, tra gli effetti collaterali della terapia steroidea topica, possano verificarsi: atrofia cutanea, insufficienza surrenalica secondaria, ipopigmentazione e lesioni da contatto.

8. COMPLICANZE

La fimosi cicatriziale è la principale manifestazione clinica del Lichen Scleroatrofico nel bambino, anche la disuria è abbastanza comune.

Sintomi ostruttivi delle basse vie urinarie, deviazioni del flusso urinario, edema del prepuzio sono frequenti.

Le più temute complicanze della malattia sono rappresentate dalla stenosi del meato e dalla stenosi dell' uretra con un incidenza del 4-47% per la stenosi del meato e del 20 al 60% per la stenosi uretrale².

Diversi studi hanno riportato che il 7-19% dei pazienti affetti da LS e sottoposti a circoncisione sono stati sottoposti a successive procedure sul meato (dilatazioni, introduzione di steroidi intrameatali, meato plastiche)^{2,9,3,51,52}.

Il 20% dei pazienti ha richiesto interventi chirurgici sul meato 12 settimane dopo la circoncisione e il 74% dopo 6 mesi⁵³.

E' stato inoltre descritto su popolazione adulta il coinvolgimento dell' uretra nel 90.4% dei pazienti affetti da LS con maggiore incidenza nei pazienti più giovani. L' interessamento può coinvolgere l' uretra peniena, bulbare o essere pan uretrale⁵⁴.

Il coinvolgimento del meato e dell'uretra può rendersi responsabile di gravi quadri clinici: sono stati descritti casi di idronefrosi renale e calcolosi secondaria a stenosi uretrale da LS⁵⁵ e Christmas ha documentato un caso di insufficienza renale dovuta alle complicanze ostruttive del LS in un bambino di 11 anni⁵⁶.

9. TRATTAMENTO DELLE COMPLICANZE

Meatoplastica

Le stenosi meatali possono essere trattate con una meatotomia ventrale o con una meatoplastica dorsale a V.

La meatotomia per il lichen può essere, però, seguita da nuove stenosi quindi a volte si può ricorrere a meatoplastica estesa (Extended meatoplasty) con la creazione di un meato ipospadico .

Il meato viene identificato e una piccola sonda in metallo o un catetere vescicale viene inserito nell'uretra. L'orifizio viene dilatato sufficientemente fino a consentire di inserire la lama della pinza emostatica e dirigerla prossimalmente. Il sottile tessuto ventrale dietro il meato viene inciso sulla linea mediana, solitamente vengono tagliati circa 5 mm di tessuto. Il nuovo meato così ottenuto viene fissato tramite punti di sutura riassorbibili.

Nel post-operatorio può essere mantenuto il catetere vescicale per alcuni giorni o si possono somministrare corticosteroidi intrameatali due volte al giorno per una settimana in modo da ridurre l'infiammazione e mantenere aperto il meato.

Ricostruzione uretrale

Nei casi di interessamento dell'uretra anteriore, è indicata l'Uretroplastica con completa asportazione della porzione di uretra interessata dalla malattia.

Per la ricostruzione dell'uretra dovrebbe essere usato tessuto non genitale, vista la presenza di predisposizione di malattia in questi tessuti⁵⁷.

Talvolta si hanno delle nuove stenosi nei primi 2-3 anni, sebbene sono descritti casi di assenza di malattia anche per periodi superiori ai 10 anni.

In genere, viene usata la mucosa buccale visto che non è stata mai descritta la malattia in questa regione. Altre mucose sono state usate per l'uretroplastica, come per esempio la mucosa vescicale, rettale e la tunica vaginale.

I benefici dell'innesto di mucosa buccale sono però considerati maggiori, in quanto l' utilizzo di mucosa buccale comporta meno contratture e una più sicura rivascularizzazione per la presenza di una sottile lamina propria riccamente vascolarizzata. Diversi studi hanno mostrato un maggiore tasso di successo dell' uretroplastica con mucosa buccale in due tempi⁵⁸. La tecnica implica l'escissione della porzione uretrale interessata dopo la completa apertura del glande e l'innesto della mucosa buccale alla tunica albuginea, la tubulizzazione uretrale viene effettuata a distanza di sei – dodici mesi. La procedura ha un tasso di successo del 91%-93.1%⁵⁷ Kulkarni ha descritto una tecnica in unico tempo per i pazienti che presentano diagnosi istologica moderata o lieve di malattia previa biopsia dell'uretra, tale tecnica prevede il salvataggio del piatto uretrale con un successo dell' 88%⁵⁷.

Nei casi più gravi ed in popolazione adulta dopo il fallimento di più interventi sull'uretra, in presenza di comorbilità o di malattia di grado severo con presenza di totale alterazione da parte di LS di tutto il piatto uretrale è stata descritta la possibilità di eseguire una uretrostomia perineale definitiva⁵⁹.

10. FOLLOW-UP

Le linee guida suggeriscono un follow-up iniziale di 3 mesi per valutare la conformità e la risposta al trattamento, e poi una rivalutazione a 6 mesi per verificare l'eventuale presenza di complicanze a lungo termine⁵.

Il trattamento ritenuto il gold standard è l'applicazione di clobetasolo propionato allo 0,05% una volta al giorno per 4 settimane, poi a giorni alterni per 4 settimane e poi due volte alla settimana per 4 settimane con valutazioni mensili. Alla fine del protocollo in assenza di complicanze il paziente può essere lasciato libero da terapia topica e rivalutato a sei mesi. Una valutazione collegiale con il dermatologo è necessaria invece se persistono manifestazioni cutanee, ispessimento localizzato della pelle, stenosi meatali o in presenza di manifestazioni sistemiche o se vi sono effetti collaterali al trattamento.

E' raccomandato consegnare al paziente una dettagliata relazione sulla patologia, sulle complicanze e sugli eventuali rischi a lungo termine.

Rajet al. in un audit multi centrico, inoltre, consiglia di seguire al follow-up il paziente mediante documentazione fotografica; le fotografie infatti, risultano di gran lunga superiori ai diagrammi per il monitoraggio dei progressi clinici, permettono l'identificazione di nuove lesioni, e possono essere condivise nelle riunioni di team multidisciplinari per decidere il trattamento in presenza di complicanze⁶⁰.

PARTE SPECIALE

1. SCOPO DELLO STUDIO

Poiché la fimosi secondaria in età pediatrica è frequentemente associata alla presenza di BXO, e considerata la possibilità di condurre a complicanze gravi e invalidanti, lo scopo dello studio, svolto durante il ciclo di dottorato, è stato quello di cercare di identificare eventuali meccanismi patogenetici biomolecolari alla base della patologia e di trovare nuovi target terapeutici per il trattamento.

E' stato condotto uno studio osservazionale, su campioni di siero e di cute prepuziale di pazienti pediatrici di età compresa tra 5 e 15 anni, ricoverati presso l'UOC di Chirurgia Pediatrica, con diagnosi di ammissione di fimosi secondaria.

- **Durante il primo anno di dottorato** è stato effettuato il reclutamento dei pazienti attraverso l' esame clinico, la raccolta dell'anamnesi personale e familiare, l'intervento chirurgico di circoncisione, la raccolta dei campioni di siero e di cute prepuziale necessari alla preparazione dello studio molecolare.

- **Nel corso del secondo anno di dottorato**, in considerazione del fatto che la BXO presenta clinicamente ed istologicamente le caratteristiche di uno stato infiammatorio con assottigliamento epiteliale, cicatrizzazione e modifiche del derma, è stato valutato, attraverso l'analisi di HMGB1 e di alcune citochine di fase acuta e cronica, lo stato infiammatorio di questi pazienti e allo stesso tempo si è proceduto a valutare, attraverso lo studio delle Transglutaminasi, se queste molecole siano responsabili o siano coinvolte nella perdita dell'integrità strutturale del prepuzio affetto da BXO.

- **Durante il terzo anno di dottorato** è stato valutato invece, se un eventuale trattamento farmacologico preoperatorio innovativo, non

cortisonico, quale l'uso di ozonide per via topica, possa modificare l'espressione delle citochine e delle transglutaminasi, e quindi intervenire sull'evoluzione della patologia.

L' Ozonide topico (vedi più avanti) ha un'azione antinfiammatoria, battericida, virustatica, fungicida, riepitalizzante, lenitiva, idratante e lubrificante ed è stato già utilizzato con successo nelle Balaniti, Balanopostiti, Fimosi e Post Balanopostite .

Sono quindi stati reclutati pazienti che avessero effettuato terapia preoperatoria con Ozonide confrontandoli con pazienti affetti da BXO ma che non avevano effettuato nessun trattamento topico.

Lo studio è stato sottoposto ad approvazione del comitato etico del nostro ospedale.

2. MOLECOLE ANALIZZATE NELLO STUDIO

HIGH MOBILITY GROUP BOX 1 (HMGB1)

La proteina High Mobility Group Box 1 (HMGB1), precedentemente nota come amfoterina o HMG1, è un fattore architetturale non istonico del DNA; il suo nome deriva dalla rapida mobilità che la caratterizza in SDS-PAGE. Da un punto di vista biochimico la HMGB1 è una proteina di 216 residui (30 kD) con il 100% di omologia di sequenza aminoacidica tra topo e ratto e più del 98% tra topo e uomo^{61, 62}. Da un punto di vista strutturale, è costituita da tre domini: due domini omologhi che legano il DNA, chiamati “Box A” e “Box B” ed un dominio C terminale carico negativamente.

E' una proteina ubiquotaria distribuita in tutti i tessuti dei mammiferi⁶³. Esistono proteine HMGB1-simili anche in lieviti, batteri e piante.^{63,64,65}

La proteina High Mobility Group Box 1 (HMGB1) possiede una duplice funzione: in condizioni basali si trova nel nucleo e favorisce l'interazione di alcuni fattori di trascrizione con il DNA, in condizioni infiammatorie viene secreta nello spazio extracellulare ed esercita le funzioni di una citochina pro-infiammatoria. Oltre alla localizzazione nucleare, alcune cellule esprimono HMGB1 anche sulla membrana plasmatica, dove sembra sia coinvolta in processi quali la chemiotassi cellulare^{66,67}.

Viene rilasciata nel mezzo extracellulare secondo differenti modalità: si osserva una secrezione passiva nel mezzo extracellulare di cellule necrotiche e una secrezione attiva da cellule del sistema immunitario^{68,69}, al contrario l'evento apoptotico non induce rilascio di HMGB1.

La secrezione di HMGB1 nello spazio extracellulare risulta controllata da un meccanismo calcio dipendente⁷⁰ e riveste un ruolo importante poiché è

stato dimostrato che monociti e macrofagi secernono HMGB1 in seguito a stimoli infiammatori indotti con lipopolisaccaride (LPS), fattore di necrosi tumorale α (TNF- α) e/o interleuchina-1 (IL-1)⁷¹.

In seguito al suo rilascio, HMGB1 interagisce con una serie di recettori posti sulla membrana cellulare in particolare con i recettori RAGE (Receptor of Advanced Glycation Endproduct).

L'interazione di HMGB1 con questo tipo di recettori induce l'attivazione della trascrizione di NF- κ B, che ha come effettore il Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α). La secrezione di HMGB1 da parte dei macrofagi possiede un ruolo centrale nella progressione dello stadio infiammatorio^{69,68}

L'importanza di HMGB1 come citochina pro-infiammatoria è stata dimostrata in molte malattie infiammatorie e autoimmuni .

Data questa particolare rilevanza, HMGB1 ha dimostrato di essere un potenziale target terapeutico in modelli sperimentali per infezioni e disordini infiammatori.

Interleuchina 1 beta (IL-1 β)

L'interleuchina 1 beta (IL-1 β) è il più potente induttore pirogeno endogeno, è uno dei maggiori fattori della cosiddetta “risposta di fase acuta” ed è inoltre capace di agire come co-attivatore nella proliferazione dei linfociti. L'attività biologica che però meglio la caratterizza è la sua attività proinfiammatoria.

L'analisi strutturale della forma matura di IL-1 β rivela che la molecola è composta esclusivamente da β pieghe⁷² e ha due siti di legame al recettore IL-1 β di tipo I (IL-1 β RI).

Gli stimolatori della produzione di IL-1 β non sono comuni, mentre inibitori naturali includono IFN α e IFN γ . Per esempio, IFN γ inibisce l'IL-1 β -indotta da PGE2 in monociti di sangue umano⁷³, o indotta da IL-1 β stessa mentre IFN α inibisce l' IL-10 indotta da IL-1 β ⁷⁴. La maggior parte degli studi sulle proprietà antinfiammatorie di IL-1 β si sono concentrati sulla soppressione delle citochine prodotte dai macrofagi, inoltre è stato dimostrato che IL-1 β induce IL-6 .

IL6

Interleuchina 6 (IL-6) è una citochina pleiotropica, prodotta da monociti/macrofagi e cellule endoteliali che svolge un ruolo importante in una vasta gamma di risposte quali reazioni immunitarie, reazioni di fase acuta, ematopoiesi^{75, 76} e nell'oncogenesi .

L'IL-6 presenta un insolito meccanismo di attivazione cellulare dato che il suo recettore presenta solo un piccolo dominio intracitoplasmatico, che manca di qualsiasi capacità traduttrice di segnale e sembra avere la stessa funzione di una proteina solubile. Il complesso tra IL-6 ed il suo recettore si lega a due glicoproteine, gp 130, che permettono l'attivazione della cascata delle chinasi, che a sua volta contribuiscono all'attivazione di un gran numero di proteine di fase acuta, incluse altre citochine con proprietà infiammatorie.

IL-6 viene considerata una citochina capace di effetti non solo proinfiammatori, ma anche antiinfiammatori.

Molti studi mostrano che IL-6 rappresenta una componente importante della risposta contro agenti infettivi, quali batteri Gram negativi e parassiti intracellulari, ed è necessaria per un adeguato controllo dell'infezione,

nonché per altre importanti funzioni quali la regolazione della temperatura corporea e l'attività metabolica⁷⁷.

IL-6 svolge un ruolo nelle malattie autoimmuni, anche se da sola non è sufficiente per generarle⁷⁸. Il reclutamento di IL-6 nella patogenesi delle malattie autoimmuni è stato dimostrato in modelli di artrite murina e nell'encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE), in topi IL-6-deficienti invece la cartilagine articolare è ben conservata.

IL-6 è sintetizzata e rilasciata dalla normale epidermide umana. I cheratinociti esprimono sia IL-6 sia il suo recettore⁷⁹.

IL-6 ha dimostrato di stimolare la proliferazione dei cheratinociti *in vitro*.

Una sovrapproduzione di IL-6 è osservata nel surnatante di colture cellulari di cheratinociti affetti da psoriasi con localizzazione citoplasmatica⁸⁰.

Tumor necrosis factor alpha (TNF- α)

Il fattore di necrosi tumorale (TNF α) è una citochina ad attività tossica (citotossina), in grado di uccidere altre cellule.

Esiste sia in forma solubile (lungo 157 aminoacidi) sia in una forma transmembrana (lunga 233 aminoacidi) ed è prodotta principalmente da macrofagi ma anche da linfociti, cellule natural killer e altre cellule non ematopoietiche (fibroblasti, epatociti, cellule epiteliali) basofili, mastociti, le cellule NK, cellule di Kupffer, cellule della muscolatura liscia, cellule epidermiche, le cellule del tumore mammario, cellule di neoplasia ovarica, glioblastoma, melanoma, leucemia, tumori della prostata e tumori del pancreas in risposta a vari stimoli infiammatori⁸¹.

Notevoli quantità di TNF sono poi immagazzinate nei granuli dei mastociti. TNF induce la produzione di citochine, in particolare IL-1, IL-6, chemochine, IFN.

Come IL-1, promuove la comparsa di febbre e favorisce la produzione delle proteine di fase acuta ad opera degli epatociti, aumenta inoltre la sintesi di IL-1 e IL-6 da parte dei macrofagi, originando una cascata citochimica. Promuove la coagulazione, i processi di riparazione vascolare e la proliferazione dei fibroblasti per la riparazione tissutale.

TNF α è una citochina dotata di pleiotropismo che produce diverse risposte immunologiche e infiammatorie nell'organismo.

L'attivazione indotta dal TNF α in cellule endoteliali porta alla riorganizzazione strutturale dell'endotelio quando questo presenta una elevata permeabilità, dovuta alla sua capacità di *up* regolare VEGF, noto anche come fattore di permeabilità vascolare⁸².

TNF α aumenta l'espressione di ICAM-1 endoteliale e della molecola di adesione leucocitaria di tipo 1 (ELAM-1) induce inoltre la sintesi di altri chemochine, come MCP-1, che promuove l'accumulo di monociti nel sito di infiammazione.

In diverse malattie infiammatorie come l'artrite reumatoide e le malattie autoimmuni correlate, il TNF α è prodotto in siti di infiammazione, suggerendo il suo ruolo nella degradazione tissutale, nell'amplificare la risposta infiammatoria e nel rimodellamento del tessuto connettivo⁸³.

TNF α induce il rilascio di collagenasi e di altri enzimi, metalloproteasi di matrice, in fibroblasti e cellule sinoviali. Esso inibisce la sintesi del collagene nelle ossa, riduce il contenuto di fosfatasi alcalina nella cartilagine espianata e induce il riassorbimento di proteoglicani.

Interferone γ (IFN γ)

L'interferone γ (IFN γ) è prodotto principalmente da linfociti attivati e ha recettori su praticamente tutti i tipi di cellule dell'organismo. Esso, pertanto, esercita una moltitudine di effetti biologici cellulari.

Tra le citochine, l'IFN γ è il principale attivatore dei macrofagi e ha un ruolo nell'attivazione delle cellule endoteliali.

Queste due attività in associazione fanno attribuire all'IFN γ un ruolo di citochina pro infiammatoria.

IFN γ è una tipica linfocina, essendo prodotto quasi esclusivamente da sottopopolazioni di linfociti T helper 1 (Th1) e da cellule NK.

In vivo, l'IFN γ è prodotto in tessuti infiltrati da linfociti attivati, in particolare nei focolai di infiammazione acuta dovuta a risposte immunitarie antigene-specifiche e in organi linfoidi periferici durante l'infiammazione locale o generale .

Gli stimoli esogeni che possono suscitare la produzione di IFN γ sono i più disparati, quali traumi, infezioni, tumori, allergie o autoimmunità .

Qualsiasi sostanza riconosciuta da linfociti T come *non-self* può attivare queste cellule e, di conseguenza, indurre la produzione di IFN γ , insieme ad un certo numero di altre citochine.

Due fattori puramente endogeni quali IL-12 e IL-18 sono stati finora descritti come “induttori di IFN γ ”, il che implica che essi possono attivare la produzione di IFN γ indipendentemente dalla presenza di stimoli esogeni, anche se forse necessitano di altri fattori endogeni.

IL-12 svolge un ruolo importante nel promuovere lo sviluppo e la differenziazione della produzione di IFN γ da parte di linfociti Th1^{84,85} ;

IL-18 induce la produzione di IFN γ o la aumenta in presenza di altre citochine, quali IL-2 e IL-12. Il ruolo di IL-12 sembra consistere nell'indurre l'espressione del complesso recettoriale per IL-18 sui linfociti

T. Al contrario, un potente inibitore della produzione di IFN γ è costituito dall'IL-10.

La produzione di IFN γ in linfociti T è anche sotto il controllo delle prostaglandine. Le PGE2 inibiscono la produzione di IFN γ e IL-2 in linfociti Th1 ma non la produzione di IL-4 in linfociti Th2.

L'IFN γ stimola la produzione di NO, che a sua volta può reagire con H₂O₂ per generare ossigeno reattivo. IFN γ ha un ruolo importante nella produzione di ossido nitrico (NO).

Varie cellule sintetizzano e rilasciano NO endogeno quale messaggero a breve distanza e di breve durata⁸⁶.

La sintesi NO inducibile (iNOS) si verifica, *in vitro*, in fagociti mononucleati, granulociti, fibroblasti, cellule di Kupffer, epatociti, cellule endoteliali, cellule della muscolatura liscia vascolare e, probabilmente, in molti altri tipi di cellule.

La sintesi di NO IFN γ -indotta determina un'aumentata difesa contro l'infezione da batteri, muffe o protozoi⁸⁷. Tuttavia, l'effetto citotossico indotto da NO può anche causare danni alla cellula e ai tessuti e bisogna quindi tener conto di alcuni effetti deleteri dell'IFN γ endogeno *in vivo*.

In considerazione degli effetti di NO sul sistema vascolare, si può proporre che NO prodotto da macrofagi IFN γ -attivati è in parte responsabile della vasodilatazione locale e della risposta iperdinamica circolatoria associata ad infiammazione.

IFN γ è tra le citochine capaci di accrescere l'espressione della molecola di adesione ICAM-1 su vari tipi di cellule, comprese cellule endoteliali e cheratinociti in coltura, con un conseguente aumento dell'adesività leucocitaria data da maggior espressione di integrina LFA-1⁸⁸.

IFN γ , migliora anche il rilascio di TGF da parte di fagociti mononucleati che è generalmente conosciuto come una citochina anti-infiammatoria⁸⁹.

Un altro meccanismo di immunosoppressione esercitato dall'IFN γ è dato dall'inibizione dell'espressione del ligando CD40⁹⁰.

Altri meccanismi di immunosoppressione esercitati dall'IFN γ includono gli effetti inibitori sull'espressione di molecole associate a membrana e sulla produzione di chemochine. Le malattie infiammatorie intestinali (IBD), sono ad oggi considerate come disturbi nel delicato equilibrio tra anergia e reattività immunitaria verso antigeni e tossine microbiche presenti nel lume intestinale. I risultati ottenuti fanno pensare che l'IFN γ endogeno rivesta un ruolo nel promuovere la malattia.

Ossido nitrico sintasi (NOS)

L'ossido nitrico (NO) è una molecola radicalica gassosa prodotta da diversi tipi cellulari. Esso gioca un ruolo critico in svariate funzioni corporee incluse la vasodilatazione della muscolatura liscia, la neurotrasmissione, nella cicatrizzazione delle ferite e nella regolazione delle difese immunitarie⁹¹. A causa della sua emivita molto breve l'NO è in grado di agire solo in prossimità delle cellule che lo producono e per questo motivo si ritiene che questo gas debba essere considerato un fattore autocrino e paracrino.

A causa delle sue piccole dimensioni e poiché non è portatore di carica, l'NO diffonde liberamente attraverso le membrane, escludendo il bisogno di un sistema di trasporto.

L'NO è relativamente poco reattivo per una specie radicalica, così può diffondere da una cellula in cui è prodotto verso le cellule vicine senza essere distrutto prima che raggiunga i suoi bersagli. Poiché in condizioni fisiologiche l'NO è ossidato a NO-2 e NO-3, non è richiesto nessun meccanismo separato per la sua distruzione⁹², tuttavia, a basse

concentrazioni di NO e in assenza di proteine e metalli che contribuiscano alla sua distruzione, la sua decomposizione sarà lenta⁹³.

Il meccanismo di sintesi dell'ossido nitrico richiede la presenza di un enzima denominato sintasi dell'ossido nitrico (NOS). Esistono tre isoforme sintetizzate da altrettanti geni: l'isoforma eNOS (endothelial nitric oxide synthase), nNOS (neuronal nitric oxide synthase) e iNOS (inducible nitric oxide synthase). L'esistenza di una quarta isoforma localizzata nel mitocondrio è tuttora dibattuta.

La dipendenza dal calcio della sintesi di NO distingue le tre isoforme di NO: nNOS ed eNOS hanno una richiesta di calcio molto più grande di quella di iNOS

Hypoxia inducible factor (HIF1)

Hypoxia-inducible factor è un fattore di trascrizione eterodimerico costituito dalle subunità α e β . che media le risposte cellulari all'ipossia.

La subunità HIF-1 β è costitutivamente espressa mentre l'espressione e l'attività della subunità HIF-1 α sono strettamente controllate dalle concentrazioni cellulari di ossigeno. In condizioni fisiologiche, quindi in presenza di O₂, la subunità α di HIF viene idrossilata così da potersi legare alla proteina di Von Hippel-Lindau, (VHL) una E3-ubiquitina ligasi che ne determina l'avvio alla degradazione da parte del proteasoma. In condizioni di ipossia, la mancata idrossilazione di HIF-1 α ne impedisce il riconoscimento da parte della proteina VHL, in questo modo la subunità HIF-1 α , che non viene degradata, trasloca nel nucleo e con la subunità β (HIF- β), costitutivamente espressa, formerà l'eterodimero HIF-1 che attiverà la trascrizione di differenti geni ed inizia ad accumularsi nel citoplasma della cellula.

HIF-1 è il principale fattore responsabile dell'espressione e secrezione di VEGF da parte delle cellule in condizioni ipossiche e gioca un ruolo chiave in diverse patologie caratterizzate da anomalo sviluppo dei vasi sanguigni. HIF-1 induce inoltre l'espressione di differenti geni target come il TGF- α , che causa una disregolata proliferazione cellulare e i repressori trascrizionali della E-Caderina che impediscono l'adesione cellula-cellula. HIF-1, attivando la trascrizione di altri geni, induce anche la motilità e l'invasione delle cellule tumorali e favorisce il metabolismo del glucosio e decrementa l'espressione di fattori anti-angiogenici come la trombospondina⁹⁴.

VEGF

I membri della famiglia del VEGF sono secreti come glicoproteine dimeriche di circa 40 kDa. Questa famiglia è composta da cinque membri, VEGF-A,-B,-C,-D e dal PlGF^{95,96} e svolgono un ruolo fondamentale e specifico nella neoangiogenesi: regolando la proliferazione, migrazione, permeabilità e sopravvivenza delle cellule endoteliali derivate da vene, arterie e vasi linfatici^{97,98}.

Sebbene l'endotelio sia il principale bersaglio, sono stati riportati molti studi sugli effetti mitogeni che riguardano altri tipi cellulari come monociti e macrofagi, neuroni, cellule tumorali, cellule epiteliali del rene.

Tutti i membri condividono una regione altamente conservata (VHD), che contiene i siti di legame al VEGFR; composta da otto residui di cisteina tipicamente distanziati⁹⁸.

Il VEGF è rilasciato da molti tipi di cellule e la sua espressione è regolata da citochine pro-infiammatorie come IL-1, IL-6 e fattori di crescita come EGF, TGF-PDGF, FGF. I livelli di espressione sono regolati anche dalla tensione di ossigeno presente nei tessuti; in condizioni d'ipossia vi è un

aumento del rilascio, attraverso una regolazione a livello trascrizionale. Questa regolazione avviene mediante la stimolazione del fattore trascrizionale HIF-1 α ⁹⁹.

Al contrario, la normoxia induce una down-regolazione della produzione di VEGF e una regressione della formazione dei vasi¹⁰⁰. L'effetto specifico è dovuto all'interazione selettiva con i loro recettori

Il VEGF-A, definito anche in generale VEGF, è stato tra i vari membri della famiglia il più studiato per la sua importanza nell'angiogenesi sia fisiologica sia tumorale.

Transglutaminasi

Le Transglutaminasi (TGS) sono una famiglia di enzimi Ca²⁺-dipendente strutturalmente e funzionalmente correlate responsabili delle modificazioni post-traslazionali delle proteine. Un ruolo rilevante nelle modificazioni biochimiche associate all'infiammazione è stato attribuito soprattutto alla TG2, che agisce sia modificando proteine-substrato sia come molecola-segnale per l'attivazione di specifici processi.

La TG2 viene costitutivamente prodotta nelle cellule endoteliali, mesangiali, nella muscolatura liscia di arterie, vene e capillari, nei fibroblasti¹⁰¹, mentre in altri tipi cellulari la sua espressione ed attività sono regolate in modo tessuto-dipendente da alcuni attivatori trascrizionali quali: citochine, retinoidi, vitamina D, AMP ciclico, ormoni steroidei, IL-6, TGF- β (transforming growth factor- β), TNF- α e da alcuni fattori trascrizionali come SP1^{102,103}. Oltre che a livello trascrizionale, l'espressione può essere regolata anche a livello post-trascrizionale e persino in base alla velocità di turnover della proteina¹⁰².

Altri organi che esprimono quantità variabili di TG2 includono il cuore, i reni, i polmoni, i globuli rossi e la milza¹⁰¹.

Inoltre, la TG2 è coinvolta nei processi biologici che portano alla formazione della barriera cutanea e della matrice extracellulare, contribuendo alla stabilizzazione delle interazioni cellula-cellula dell'epidermide.

La TG2 inoltre, è fondamentale per diversi processi biologici come l'adesione cellulare¹⁰⁴, la crescita, la migrazione, la differenziazione, la morte cellulare programmata, il mantenimento della struttura della matrice extra cellulare^{105,106} e la guarigione delle ferite¹⁰⁷, ma può anche contribuire alla fisiopatologia di svariate condizioni infiammatorie, autoimmuni e degenerative^{108,109}.

L'attività TGasica risulta essere fortemente influenzata dall'ossido nitrico. La nitrosilazione e la denitrosilazione di alcuni residui di cisteina, dipendente dal Ca²⁺, infatti ne determinano rispettivamente l'inibizione e l'attivazione. Sul promotore di TG2 sono presenti anche elementi di risposta ad importanti fattori di trascrizione indotti dallo stress quali NF- κ B^{110,111} e il fattore indotto dall'ipossia (HIF)¹¹².

Il TNF- α , che è altamente espresso in condizioni di stress infiammatorio, è un altro fattore che induce TG2; altre citochine infiammatorie, come IL-1 β e l'IL-6, possono anche indurre TG2^{101, 113,114}.

Numerosi studi hanno dimostrato come in condizioni fisiologiche l'attività catalitica della TG2 sia presente a bassi livelli, a differenza invece di quanto avvenga nel corso di alcuni processi patogenetici, ed in particolare nelle malattie infiammatorie che comprendono la fibrosi epatica, renale e polmonare, l'artrite, l'ipertrofia del miocardio e condizioni autoimmuni come diabete e morbo celiaco, nelle malattie croniche degenerative tra cui aterosclerosi e disordini neurodegenerativi, e nei tumori, in cui si è

riscontrato un aumento dei livelli di attività e di espressione dell'enzima¹¹⁵
Il ruolo cruciale di TG2 nell'infiammazione deriva dalla sua capacità di attivare NF-κB.

Citochine e fattori di crescita secreti durante le prime fasi di danno cellulare regolano l'espressione di TG2. Per esempio, TGF-β1 (transforming growth factor) induce l'espressione di TG2 nei cheratinociti e nei fibroblasti del derma attraverso l'elemento di risposta di TGF-β1 che è localizzato nel promotore del gene TGM2¹¹⁶.

L'espressione di TG2 è aumentata nel tessuto cartilagineo dall'IL-1 e nelle cellule epatiche dall'IL-6¹¹⁴. In risposta ad insulti cutanei l'espressione e l'attività di TG2 aumenta nei siti di neovascolarizzazione e nelle cellule endoteliali, nelle cellule del muscolo scheletrico e nei macrofagi che infiltrano le ferite al confine tra il tessuto sano e quello danneggiato¹¹⁷.

Due altri membri della famiglia TGasi, TG1 e TG3, sono prevalentemente espressi in epiteli cheratinizzanti, sia nello strato corneo che negli strati spinosi e granulari con un ruolo essenziale nella formazione del cross-linking delle proteine precursori e rappresentano una componente importante della barriera epiteliale¹¹⁸

La TG 1 è un enzima associato alla superficie interna della membrana dei cheratinociti. È una proteina di 814 aminoacidi, con un peso molecolare teorico di 90 kDa¹¹⁹. Viene espressa in tutta l'epidermide, soprattutto negli alti strati spinoso e granuloso, ma anche nello strato basale e nei follicoli piliferi, ed ha un ruolo fondamentale nella formazione dell'involucro corneo dei cheratinociti¹²⁰.

La TG1 è un enzima molto complesso, potendo esistere nei cheratinociti in forme multiple, sia solubili che ancorate alla membrana, processate da enzimi proteolitici in siti conservati. Svolge un ruolo essenziale nella

formazione del cross-linking delle proteine precursori, come loricrina e involucrina. Questo legame è importante perché crea un collegamento fra la struttura lipidica e quella proteica dell'involucro corneo^{121,122}.

La TG3 è un pro-enzima solubile che viene attivato mediante taglio proteolitico coinvolto nella cheratinizzazione dello strato epidermico e nella formazione dello strato corneo¹²³. È espresso nella differenziazione dei cheratinociti e corneociti¹²⁴, ma si trova espresso anche nel vano extracellulare¹²⁵.

La TG3 è coinvolta negli eventi terminali del differenziamento dell'epidermide; la sua attività enzimatica è stata infatti identificata unicamente nella porzione più esterna dello strato granuloso e nello strato corneo. La forma attivata della TG3 è responsabile per più del 75% dell'attività TGasica totale dell'epidermide e del follicolo pilifero, anche se esperimenti di frazionamento cromatografico hanno dimostrato che la quantità di TG3 nell'epidermide è inferiore a quella della TG1 e della TG2¹²⁰.

Sebbene non sia ben definito il significato biologico, l'mRNA della TG3 è espresso, al di fuori dell'epidermide, in numerosi tessuti come il cervello, il testicolo, l'intestino, la milza e il rene¹²⁰. Recentemente è stato notato che la TG3 viene normalmente espressa negli epitelii normali dell'esofago, ma la sua espressione è diminuita nei corrispondenti carcinomi¹⁰¹.

Come la TG2, anche la TG3 attiva è inibita in maniera allosterica dal GTP e dal suo analogo non idrolizzabile, il GTP γ S¹²⁰.

Al contrario della TG2, però, questa inibizione non è annullata dal Ca²⁺ ;

Diversi studi indicano che sia TG2 che TG1 sono presenti in diversi strati delle cellule epiteliali e non epiteliali a seconda dei tessuti e delle loro proprietà¹²³.

Oli vegetali ozonizzati

Gli oli vegetali sono formati dal 97-98% di trigliceridi. A seconda della loro origine e natura hanno una composizione variabile di acidi grassi saturi e insaturi legati agli ossidrili del glicerolo¹²⁶.

I trigliceridi insaturi danno all'olio molte proprietà favorevoli.

L'ossidazione dei doppi legami è usata per scindere la catena alchilica o per introdurre funzionalità aggiuntive lungo la catena¹²⁷.

La reazione dell'ozono con acidi grassi insaturi da oli vegetali genera ozonidi, perossidi e aldeidi¹²⁸.

Il meccanismo di ozonolisi è stato descritto da Criegee nel 1975¹²⁹: il primo step è una cicloaddizione 1,3 dipolare dell'ozono alla olefina che porta alla formazione del malozonide (intermedio di Criegee), che è molto instabile e si decompone per dare uno zwitterione ed un composto carbonilico.

In presenza di solvente reattivo, ad esempio acqua o alcool, lo zwitterione interagisce con il solvente per dare idroperossidi con resa elevata, poiché la concentrazione del solvente supera di gran lunga quella di altre sostanze con cui lo zwitterione può reagire. Quando il solvente è inerte, lo zwitterione deve reagire o con se stesso o con un composto carbonilico.

Gli ozonidi, i dimeri o i perossidi polimerici possono essere i sottoprodotti. Lo zwitterione generalmente dimerizza dando un intermedio o polimerizza quando reagisce con un chetone, meno suscettibile all'attacco nucleofilo.

La reazione con un composto carbonilico forma un ozonide monometrico come maggior prodotto e ozonide polimerico come minor prodotto generalmente predominante se è un'aldeide.

I migliori penetration enhancers per l'assorbimento attraverso la pelle sono gli oli con un'alta percentuale di acidi grassi insaturi come l'acido oleico (omega 9), l'acido linoleico (omega 6) e acido linolenico (omega 3). Infatti l'assorbimento e la penetrazione dei prodotti nella pelle sono influenzati dalla condizione della stessa e dalla composizione del prodotto da applicare.

Gli oli vegetali possono alterare la permeazione della pelle attraverso diversi meccanismi e cioè: aumento del grado di occlusione con conseguente incremento dello stato di idratazione dello strato corneo e aumento della permeabilità a molecole polari o non polari ¹³⁰.

Inoltre, è stato dimostrato che gli oli vegetali in generale non causano problemi di irritazione cutanea o sensibilizzazione ¹³¹.

Si è notato che l'olio d'oliva durante il processo di ozonizzazione intrappola l'O₃ in una struttura più stabile, l'ozonide, e quando questo viene applicato a tutte le forme di infezioni cutanee sia acute che croniche, rilascia lentamente O₃ che, confrontato con le creme convenzionali, evidenzia un'effettiva attività disinfettante e riepitelizzante che porta ad una più rapida guarigione ¹³².

Infatti a contatto con cute e mucose gli Ozonidi stabilizzati negli oli, grazie al basso peso molecolare, alla breve lunghezza della catena degli acidi grassi saturati da Ozono e ad una parziale idrofilia acquisita, attraversano con facilità la membrana plasmatica e una volta giunti nel citosol, evolvono, ma solo in parte, in Bioperossidi ed Ossigeno molecolare ¹³³.

Gli Ozonidi, quindi, in ambienti caratterizzati da un incremento protonico, come quelli ischemici, ipossici o in fase degenerativa, liberano Ossigeno molecolare evolvendo in Bioperossidi.

L'Ossigeno molecolare ha una azione diretta sull'attivazione della catena respiratoria mitocondriale con conseguente incremento della produzione di ATP e regolazione dello stato di ipossia.

Inoltre riversatisi nel citosol, grazie alla loro azione sui coenzimi scatenano un ciclo di reazioni legate alla trasformazione dei perossidi in alcoli. Questa reazione combinata con la rottura dell'equilibrio GSH-GSSG produce una notevole accelerazione dello shunt dei pentosi e quindi della glicolisi incrementando ulteriormente la produzione di ATP ¹³⁴

Diversi studi hanno inoltre dimostrato che gli Ozonidi intervengono nella regolazione dei mediatori dell'infiammazione infatti, inibendo le COX-2 portano all'inibizione della sintesi delle prostaglandine, attivano MAO e DAO e favoriscono la demolizione dell'istamina e il rilascio di serotonina, il che si traduce clinicamente in un'azione di questi su dolore, rossore e prurito ^{135,136}.

La dissoluzione parziale in ambiente acquoso degli Ozonidi comporta rilascio di Bioperossidi che sono in grado a loro volta di attivare i sistemi antiossidanti endogeni, enzimatici e non, coinvolti nella difesa aspecifica sia a livello intra che extra-cellulare.

E' noto che bassi livelli di stress ossidativo indotto sono in grado di agire da secondo messaggero in varie vie di signaling cellulare promuovendo una risposta biologica in grado di fronteggiare lo stress ossidativo per mantenere l'omeostasi ¹³⁷.

La formazione di Bioperossidi in ambiente acquoso facilita anche l'attivazione diretta del metabolismo degli eritrociti da parte degli Ozonidi.

Il primo passo della reazione consiste nell'interazione dell'Ozonide con i doppi legami degli acidi grassi insaturi dello strato di fosfolipidi nella membrana eritrocitaria.

I Bioperossidi presentano inoltre una elevata attività battericida e fungicida dovuta ad una azione ossidativa diretta con un meccanismo molto simile a quello utilizzato dai leucociti durante la fagocitosi batterica.

L'azione germicida causata dai Bioperossidi liberati dagli ozonidi è dovuta all'attacco diretto di questi ultimi verso numerosi costituenti cellulari quali proteine, enzimi respiratori nella membrana cellulare, peptidoglicani nella parete cellulare, enzimi e acidi nucleici nel citoplasma, proteine e peptidoglicani negli involucri delle spore^{138, 139, 140}.

L'azione virustatica è dovuta invece alla disattivazione dei recettori presenti sulla superficie virale, più precisamente a carico dell'N-acetilglucosamina, impedendo il riconoscimento virus-cellula bersaglio. Ne consegue che tutto il ciclo replicativo viene arrestato

L'azione riepitelizzante e rigenerante degli oli ozonizzati sui tessuti danneggiati è ampiamente documentata da diversi lavori sia in vitro che in vivo. Studi istopatologici condotti sul dorso di ratti, a cui sono state praticate ferite, trattate con oli vegetali sottoposti a processo di ozonizzazione^{141, 142} dimostrano che il numero medio di fibroblasti e neovasi è significativamente più elevato (ANOVA, Student-Newman-Keuls test, $p < 0.0002$) nelle ferite degli animali trattati (70 e 35mg/giorno) rispetto ai gruppi di controllo che erano trattati con il solo olio vegetale.

E' stato dimostrato, inoltre, che l'impiego di olio ozonizzato migliora in modo significativo la guarigione cutanea acuta delle ferite¹⁴³

Cavie di ratto sul cui dorso sono state create lesioni cutanee trattate con 0,1ml di olio ozonizzato hanno evidenziato un significativo ridimensionamento delle lesioni rispetto al gruppo in cui era stato utilizzato

il solo olio. Nelle lesioni trattate con olio ozonizzato vi era sintesi di collagene e proliferazione dei fibroblasti .

3. MATERIALI E METODI

Reclutamento dei pazienti e prelievo dei campioni

Sono stati arruolati in questo studio 80 pazienti ricoverati presso l' UOC di Chirurgia Pediatrica con diagnosi di fimosi secondaria .

L' età media alla diagnosi era di $9,8 \pm 2,8$ anni, con un range tra i 5 ai 15 anni.

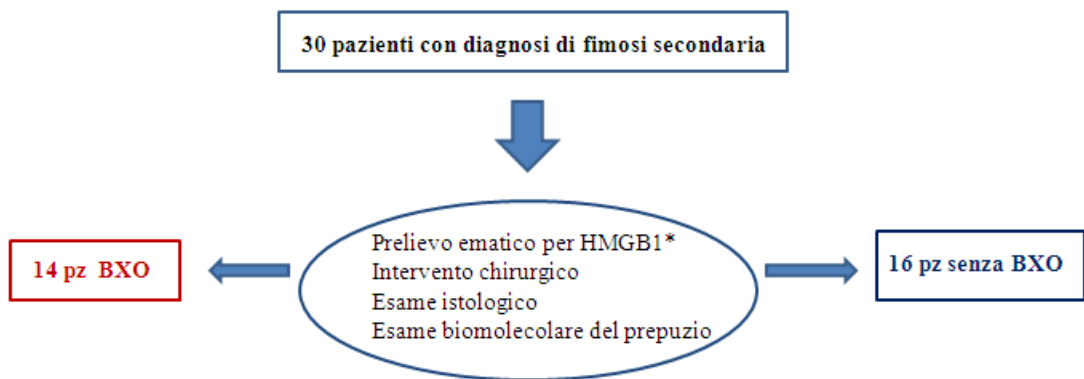
Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad esame clinico, raccolta dell'anamnesi personale e familiare, ed intervento chirurgico di circoncisione. Il consenso informato e l'autorizzazione all' utilizzo dei dati sensibili è stato ottenuto dai genitori di tutti i soggetti al momento del ricovero.

Il prepuzio asportato durante l'intervento chirurgico, per ogni paziente è stato suddiviso in due metà simmetriche ed inviato sia presso i Laboratori di Anatomia Patologica per l'esame istologico che presso i Laboratori di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica del Policlinico "G. Martino" per le analisi biochimiche e molecolari.

Dopo il prelievo, i campioni destinati alle indagini molecolari sono stati immersi in una soluzione di RNA "later" e conservati fino al momento dell'analisi a $- 80$ °C.

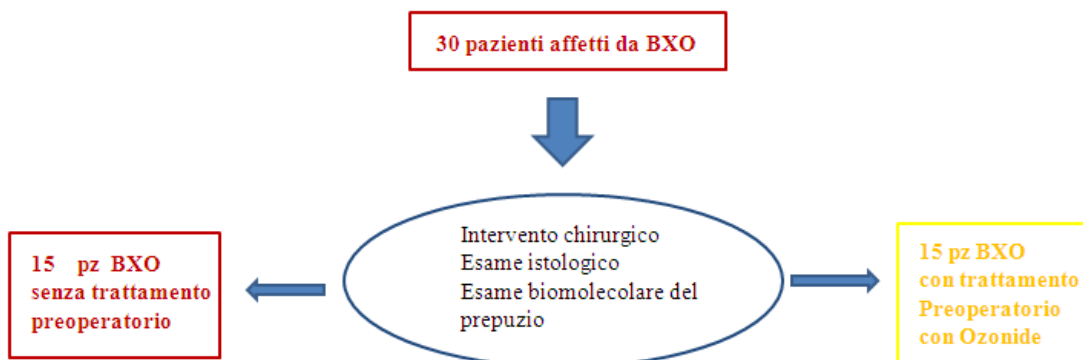
Trenta pazienti sono stati utilizzati nella prima parte dello studio secondo lo schema n° 1

Schema n°1



* I valori di HMGB1 sono stati confrontati anche con il siero di 30 pazienti sani

Trenta pazienti sono stati utilizzati nella seconda parte dello studio secondo lo schema n° 2.



Venti pazienti sono stati esclusi dallo studio perché l'esame istologico presentava risultati dubbi per BXO o perché il campione era insufficiente per tutti gli esami da eseguire.

Trenta bambini di pari età, non affetti da patologia genitale né con processi flogistici in atto sono stati utilizzati come controlli sani per la valutazione del livello sierico di HMGB1 nel primo step dello studio.

La diagnosi di BXO era posta dagli anatomo-patologi, se la cute prepuziale presentava una lesione epiteliale-stromale caratterizzata da atrofia

squamosa o iperplasia, bande di infiltrazione linfocitaria, ialinizzazione del derma papillare, ipercheratosi, incontinenza dei pigmenti e / o edema cutaneo.

Sulla cute prepuziale dei pazienti è stata effettuata l'analisi dei trascritti di IL1- β , TNF- α , IL-6, IFN- γ , NOS2, HIF-1 α , VEGF, e-caderina e β -actina, TG1, TG2, TG3

Dosaggio HMGB1

L'HMGB1 (High Mobility Group Box1 Protein) è stato dosato mediante il Kit ELISA HMGB1 (IBL International GmbH Flughafenstr. 52A, 22335 Hamburg, Germany).

HMGB1 ELISA è un dosaggio immunoenzimatico basato sul principio del sandwich per la determinazione quantitativa di HMGB1 nel siero e nel plasma.

I pozzetti delle strip di microprovette sono rivestiti con anticorpi purificati anti-HMGB1. L'HMGB1 nel campione si lega specificamente con l'anticorpo immobilizzato ed è riconosciuto da un secondo anticorpo marcato con un enzima.

Dopo la reazione del substrato, la concentrazione di HMGB1 sono state ricavate dalle assorbanze dal segnale colorimetrico mediante lettura densitometrica, su lettore per piastre ELISA della BIORAD e convertite attraverso algoritmi utilizzando il software del programma Microplate Manager V.5.1 Biorad.

I livelli di HMGB1 nei nostri campioni sono stati determinati su doppia misurazione in 10 μ L ml di siero per ciascun paziente e per i controlli sani

Analisi dei trascritti genici mediante Real-Time PCR

La tecnica è stata utilizzata per lo studio dei trascritti di TG1, TG2, TG3, IL1- β , TNF- α , IFN- γ , NOS2, HIF-1 α , VEGF, e-caderina e della β -actina, utilizzata come controllo endogeno, nei campioni di cute prelevati dai pazienti non trattati e trattati con ozonidi.

L'analisi è stata eseguita nel modo seguente:

- Estrazione dell'RNA totale dalla cute;
- Quantificazione dell'RNA estratto;
- Sintesi del cDNA;
- Amplificazione mediante qReal-Time PCR dei geni in questione;
- Analisi dei risultati con metodo 2- $\Delta\Delta$ Ct.

Estrazione dell'RNA totale

L'isolamento dell'RNA totale è stato effettuato mediante l'utilizzo del reagente TRIzol, una soluzione monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato.

Durante l'omogenizzazione dei campioni questo reagente mantiene l'integrità dell'RNA, mentre distrugge le cellule e dissolve i componenti cellulari.

L'aggiunta del cloroformio seguita dalla centrifugazione, separa la soluzione in una fase acquosa in cui rimane l'RNA ed una fase organica. Dopo il trasferimento della fase acquosa in una eppendorf RNasi free, l'RNA viene recuperato mediante precipitazione con alcool isopropilico ed ulteriormente purificato con etanolo al 75%.

Dopo centrifugazione, allontanato il surnatante, il pellet viene lasciato asciugare all'aria per 5-10 minuti, risospeso in una soluzione acquosa allo 0,01% di DEPC (dietyl-pirocarbonato), sostanza che protegge l'RNA dalla degradazione perché inibisce specificatamente le ribonucleasi, e successivamente incubato per 10 minuti a 60°C.

La quantificazione dell'RNA estratto è stata eseguita leggendo l'assorbanza del campione opportunamente diluito a 260 nm.

Bisogna precisare che durante la lettura è stato importante anche valutare il grado di purezza dell'RNA estratto facendo riferimento alla ratio 260/280, data dal rapporto tra l'assorbanza del campione a 260 nm e quella a 280 nm (lunghezza d'onda alla quale assorbono le proteine). Un valore di tale parametro inferiore a 1,8 è indice della presenza di proteine nel campione, in tal caso l'estrazione dell'RNA è stata ripetuta.

Sapendo che 40 µg di RNA hanno un'assorbanza a 260 nm (A260) pari a 1, la concentrazione dell'RNA del campione è stata calcolata, utilizzando la formula:

$$[\text{RNA}] = A_{260} * 40 * \text{fattore di diluizione}$$

Sintesi del cDNA

La sintesi del cDNA è stata effettuata utilizzando l'High-Capacity cDNA Archive Kit, che consente di retrotrascrivere quantità minime di RNA ad una resa superiore rispetto agli altri kit. Infatti, un'aliquota di ciascun campione, contenente 2 µg di RNA totale, è stata dispensata all'interno di corrispondenti eppendorf, contenenti la miscela di reazione costituita dall'RT buffer (2x), dalla soluzione di dNTP (2x), dai Random Primer (2x), dall'RNasi OUT (1 U/ml), dalla trascrittasi inversa MultiScribe (5 U/µl) e dalla soluzione acquosa di DEPC (0,01%) aggiunta fino ad ottenere un volume finale di 20µl.

La retro-trascrizione è avvenuta mediante un'incubazione per 10 minuti a 25°C e poi per 2 ore a 35°C nel termociclatore HYBAID PCR sprint.

Real Time-PCR

La Real Time PCR è una tecnica che consente di quantificare in tempo reale in modo accurato, sensibile e riproducibile la presenza di specifiche sequenze geniche.

Essa monitora la fluorescenza emessa durante la reazione come indicatore della produzione degli ampliconi ad ogni ciclo

Il segnale aumenta in modo proporzionale alla quantità dei prodotti di PCR. Monitorando la quantità di emissione fluorescente ad ogni ciclo, è possibile valutare la PCR durante la fase esponenziale dove il primo incremento significativo correla con la quantità iniziale del target. Quanto più alto è il numero di copie iniziale del target, tanto più precocemente si ha un aumento significativo della fluorescenza osservata.

Per questo studio, l'analisi quantitativa è stata realizzata utilizzando un agente DNA-intercalante, il SYBR Green (SYBR Green Master Mix).

L'amplificazione con Sybr Green è stata utilizzata per l'analisi dei trascritti di TGasi 1, TGasi2, TGasi3, IL1- β , TNF- α , IFN- γ , NOS2, HIF-1 α , VEGF, e β -acina. Per questa metodica, il cDNA sintetizzato (40 ng, in doppio per ogni campione) è stato amplificato in una miscela contenente 5 μ l Sybr Green Master mix, 0.2 μ M di primer senso e anti-senso specifici per ciascun target genico e H₂O fino ad un volume totale di 10 μ l. Le sequenze dei primers utilizzati sono riportate in tabella 1.

L'amplificazione è stata eseguita all'interno dell'apparecchio Applied BioSystem 7900 HT nelle seguenti condizioni: 1 ciclo a 50°C per 2 minuti, un altro ciclo successivo di 10 minuti a 95 °C seguiti da 50 cicli costituiti da una fase di 15 secondi a 95 °C e un'altra di 1 minuto a 60°C.

Nella Real-Time PCR con Sybr Green, per verificare che i prodotti ottenuti non fossero dovuti ad amplificazione aspecifica o a dimeri di primer, che potrebbero compromettere la quantificazione del prodotto amplificato, al termine dell'amplificazione è stata eseguita la curva di dissociazione

(Melting Curve), che permette di individuare la temperatura di fusione (T_m) specifica per ogni amplificato esaminato. Come ulteriore controllo, i campioni sono analizzati su gel d'agarosio al 2% dopo corsa elettroforetica. Alla fine della reazione i risultati sono stati raccolti usando il programma SDS 2.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) ed analizzati mediante il software RQ manager con metodo della quantificazione relativa $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Tabella 1. Sequenze degli oligonucleotidi utilizzati per lo studio dell'espressione genica in Real-Time PCR.

Gene	Primer	Sequenza primer 5' → 3'
ACT-β	senso	TGGTTACAGGAAGTCCCTTGCC
ACT-β	anti- senso	ATGCTATCACCTCCCCTGTGTG
IL1-β	senso	GCTTATTACAGTGGCAATGA
IL1-β	anti- senso	TAGTGGTGGTCGGAGATT
TNF-α	senso	GTGAGGAGGACGAACATC
TNF-α	anti-senso	GAGCCAGAAGAGGTTGAG
IFN-γ	senso	GCAGCCAACCTAAGCAAGAT
IFN-γ	anti-senso	TCACCTGACACATTCAAGTTCTG
TG1	senso	GATTGTCTTCAAGAACCCCTTCCC
TG1	anti-senso	TCATCTGACTCCAGTCCCATTGCTC
TG2	senso	CCTTACGGAGTCCAACCTCA
TG2	anti-senso	CCGTCTTCTGCTCCTCAGTC
TG3	senso	AGCCTGTGAACGTGCAGATGCTCTTC
TG3	anti-senso	TGATTGCAGGGAAGTTGTTGCAGG
IL-6	senso	TGAGAGTAGTGAGGAACAA
IL-6	anti-senso	CGCAGAATGAGATGAGTT
IL1-β	senso	GCTTATTACAGTGGCAATGA
IL1-β	anti- senso	TAGTGGTGGTCGGAGATT
TNF-α	senso	GTGAGGAGGACGAACATC
TNF-α	anti-senso	GAGCCAGAAGAGGTTGAG
HIF-1α	senso	CGTTCCTTCGATCAGTTGTC
HIF-1α	anti-senso	TCAGTGGTGGCAGTGGTAGT
NOS2	senso	TGACCTCCTAACAAGTAGCA
NOS2	anti-senso	CAGCAGCAAGTTCCATCT
VEGF	senso	AGGAGGAGGGCAGAATCATCA
VEGF	anti-senso	CTCGATTGGATGGCAGTAGCT
E-caderina	senso	TGAGTGTCCCCCGGTATCTTC
E-caderina	Anti-senso	CAGTATCAGCCGCTTTCAGATTTT

EMSA (Electrophoretic Shift Mobility Assay)

Una delle più importanti tecniche per lo studio dei meccanismi di regolazione genica e per l'identificazione di eventuali interazioni tra proteine e DNA o tra proteine ed RNA in vitro è l'EMSA.

La tecnica è conosciuta anche con il termine di gel shift, bandshift o gel di ritardo elettroforetico, in quanto è basata sul principio che la migrazione dei complessi DNA-proteina avviene più lentamente rispetto a quella di molecole di DNA non legate quando vengono sottoposte ad elettroforesi su gel non-denaturante di poliacrilammide o di agarosio.

Il saggio del cambiamento di mobilità elettroforetica può essere utilizzato come tecnica qualitativa per identificare specifiche sequenze di DNA a livello di cui può avvenire il legame con particolari tipi di proteine, tra cui soprattutto fattori di trascrizione. Quindi, se si sospetta e si vuole confermare la presenza di molecole capaci di legarsi ad una specifica regione del DNA (che in genere è rappresentata dal sito promotore), uno dei metodi più immediati è proprio questo.

A tale scopo viene utilizzata una sonda, opportunamente marcata, la cui sequenza oligonucleotidica corrisponde alla sequenza consenso di un particolare gene che se verrà riconosciuta da uno specifico fattore trascrizionale si legherà ad esso formando il complesso sonda-fattore trascrizionale.

Tale complesso sottoposto a successiva elettroforesi migrerà più lentamente rispetto alla sonda non legata e la banda relativa si posizionerà nel gel alla stessa altezza di quella corrispondente al complesso DNA-proteina utilizzato come controllo.

Nel presente studio si è voluto valutare il livello di attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B nei tessuti prelevati da pazienti in trattamento e non con ozonidi .

Prima di iniziare il protocollo per l'EMSA è stato opportuno effettuare l'estrazione delle proteine nucleari da ogni campione.

Il protocollo seguito prevedeva:

- omogeneizzazione dei pellet in un tampone di lisi ipotonico contenente 10 mM di HEPES a pH 7.9, 0,1 mM di EGTA, 0,1 mM di EDTA, 0,1 mM di DTT, 50 mM di sodio fluoruro, 1 mM di sodio ortovanadato, 30 mM di b-glicerofosfato, 20 mM di p-nitrofenil fosfato, 0,5 mM di fenil metil sulfonil fluoruro e 10 g/ml di aprotinina, leupeptina e pepstatina;
- incubazione del surnatante, ottenuto dopo centrifugazione a 2000 rpm per 2 minuti a 4°C, effettuata per far precipitare le membrane dopo la lisi, in ghiaccio per 20 minuti;
- aggiunta dell'1% di Nonidet P-40 (NP-40) ed incubazione per 20 minuti in ghiaccio;
- centrifugazione a 10000 rpm per 3 minuti al fine di precipitare i nuclei;
- trasferimento del surnatante (proteine citoplasmatiche) in nuove eppendorf e risospensione del pellet nucleare in un tampone di estrazione nucleare ipertonico contenente 20 mM di HEPES a pH 7.9, 420 mM di NaCl, 1 mM di EDTA, 1 mM di DTT, 50 mM di sodio fluoruro, 1 mM di sodio ortovanadato, 30 mM di b-glicerofosfato, 20 mM di p-nitrofenil fosfato, 0,5 mM di fenil metil sulfonil fluoruro e 10 µg/ml di aprotinina, leupeptina e pepstatina;
- incubazione per 30 minuti in ghiaccio;
- raccolta del surnatante, contenente le proteine nucleari, dopo centrifugazione a 10000 rpm per 10 minuti a 4 °C;
- dosaggio delle proteine nucleari totali secondo il metodo di Bradford.

Successivamente un volume di estratto nucleare contenente 3 μg di proteine è stato addizionato a 7 μl di miscela di reazione contenente 2 μl di tampone di legame (Binding Buffer: 1 μl di glicerolo, 1 μl di MgCl_2 , 1 μl di NP-40, 1 μl di poli (dI-dC), 1 μl di BSA 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ed incubato per 10 minuti a temperatura ambiente.

Dopo questo periodo di incubazione in tutti i campioni è stata aggiunta 1 pmole di sonda a doppio filamento marcata con biotina, lasciando i campioni per altri 30 minuti sempre a temperatura ambiente.

In questo studio come sonda è stato utilizzato un oligonucleotide di 30 bp, la cui sequenza corrisponde a quella compresa tra le posizioni nucleotidiche 1,338 e 1,350 del sito promotore del gene codificante per la TG2 e riconosciuta da NF- κ B nello stato attivato.

Prima di aggiungere la sonda al campione, è stato opportuno provvedere alla sua marcatura con biotina all'estremità 3', utilizzando i reagenti inclusi nel kit, Biotin 3' End DNA Labeling, seguendo la procedura seguente: 300 pmoli di sonda reverse e forward sono state incubate dapprima separatamente con il tampone di reazione 1x per la TdT, la Biotina dCTP 0,5 μM e la TdT (Transferasi desossinucleotidil Terminale) 0,2 U/ μl in un volume finale di 50 μl per 30 minuti a 37°C in bagnomaria; al termine di questo periodo di incubazione la reazione è stata bloccata con EDTA 0,2 M e, per estrarre la sonda ed allontanare la TdT, sono stati aggiunti 50 μl di cloroformio:alcol isoamilico (24:1); dopo centrifugazione ad alta velocità si sono separate due fasi di cui è stata conservata solo quella superiore acquosa contenente la sonda marcata; le due soluzioni sono state poi riunite in un'unica eppendorf e lasciate per 1 ora a 37 °C per favorire l'annealing dei due filamenti marcati e la formazione della sonda biotinilata a doppio filamento.

Per preparare il campione di controllo (EBNA), 1 μ l di estratto EBNA è stato aliquotato in 19 μ l di mix preparata con gli stessi reagenti utilizzati in precedenza, con la differenza che al posto della BSA sono stati aggiunti 2 μ l di EBNA-biotin DNA ed inoltre non è presente la sonda marcata.

La separazione dei complessi di legame ha richiesto la preparazione di un gel al 6% di poliacrilammide in TBE 5x a cui sono stati aggiunti anche AMPS e TEMED che è stato stabilizzato per mezzo di una pre-elettroforesi in TBE 0,5 x per circa 45 minuti a 4 °C ed un voltaggio di 70 Volt.

La polimerizzazione dei monomeri di acrilamide avviene tramite un processo di catalisi radicalica che vede coinvolti un catalizzatore, la tetrametilendiammina (TEMED) che accelera la decomposizione di un composto, l' ammonio persolfato (AMPS), che agisce da innesco in quanto genera un radicale libero SO_4^{2-} che dà avvio di tale processo.

Trascorso il periodo di incubazione, a ciascuno dei campioni ed al controllo sono stati aggiunti 5 μ l di Loading Buffer per bloccare tutte le reazioni e quindi si è effettuato il caricamento nel gel, dopo un accurato ed opportuno lavaggio dei pozzetti.

L'elettroforesi è avvenuta in TBE 0,5x, a 4 °C dapprima ad un voltaggio di 70 V per 15 minuti e poi a 120 V per circa 2 ore. Per il successivo blottaggio si è utilizzata una membrana di Nylon Biodyne Nylon+ su cui sono stati trasferiti i campioni, applicando un voltaggio di 100 V per 1 ora a 4°C in TBE 0,5x freddo. Dopo il trasferimento, è stata eseguita la reazione di cross-link all'interno dell'apposito strumento di ibridizzazione, allo scopo di far legare stabilmente la sonda alla membrana. A questo punto la membrana è stata conservata al buio a temperatura ambiente fino al giorno successivo. I lavaggi e lo sviluppo della membrana sono stati effettuati seguendo la procedura suggerita dal Kit contenente gli appositi reagenti e

prevedeva: una fase di 15 minuti di agitazione lenta con il blocking buffer per bloccare la membrana; un'altra fase ad agitazione lenta della durata di 15 minuti nella soluzione coniugato/blocking buffer, preparata diluendo nel rapporto di 1 a 300 il coniugato stabilizzato perossidasi-streptavidina con il blocking buffer; un lavaggio veloce e quattro per 5 minuti ad agitazione lenta con wash buffer 1x; incubazione ad agitazione lenta per 5 minuti in substrate equilibration buffer e per finire 5 minuti a faccia in giù, per 5 minuti, senza agitazione e al buio nella substrate working solution (contenente il 50% di luminolo ed il 50% di H₂O₂), in quanto preparata con la soluzione di luminolo e la soluzione stabile di perossido d'idrogeno in un rapporto di 1 a 1.

La membrana è stata quindi esposta, all'interno di un'apposita camera, a una lastra fotografica del tipo Kodak X-ray film, per un tempo variabile a seconda del segnale.

Durante tale periodo di esposizione, la perossidasi legata alla streptavidina, che si era precedentemente legata in maniera specifica alla biotina della sonda, reagisce con l'H₂O₂ ed il luminolo libera un fotone per ogni sito di reazione. I fotoni liberati andranno ad impressionare la lastra posta sulla membrana.

Successivamente la lastra così impressionata è stata posta nel liquido di sviluppo, Man-x Developer Fujifilm, fino alla comparsa delle bande, nel liquido di fissaggio, M-fix Fixer Fujifilm, per 1 minuto ed in acqua per il lavaggio finale. Per finire è stata effettuata l'analisi densitometrica per la quantificazione dei complessi attivati di NF-κB.

Western Blotting

La metodica del western blotting consente di separare proteine sulla base del loro peso molecolare mediante la loro migrazione attraverso le maglie

di un gel di poliacrilamide sotto l'azione di un campo elettrico. Ciò è consentito dalla presenza del sodiododecilsolfato (SDS), un detergente anionico capace di complessarsi alle proteine e di conferire loro una carica netta negativa costante per unità di massa.

Dopo il trasferimento dalla matrice del gel di acrilamide su membrana di nitrocellulosa, le proteine possono essere analizzate per mezzo di anticorpi specifici diretti contro epitopi antigenici esposti dalle proteine stesse

Per l'analisi Western Blot, i tessuti sono stati omogeneizzati in ghiaccio, utilizzando il tampone RIPA.

Poi, 30 g di proteine sono state caricate sul gel poliacrilammide al 10% in condizioni denaturanti (SDS-PAGE). A fine elettroforesi le proteine presenti nel gel sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa e successivamente, i siti aspecifici delle membrane sono stati bloccati con 5% di latte non grasso a temperatura ambiente per un'ora e trasferite su membrane di nitrocellulose e poi incubate overnight a 4 °C con gli anticorpi primari: anticorpi monoclonali di topo contro E-caderina e β -actina (rispettivamente, diluito 1: 1000 e 1: 5000 in TBS-T)

Dopo il lavaggio, si è proceduto con l'incubazione con gli anticorpi secondari anti-IgG di topo (diluito 1: 3000 per E-caderina e 1: 15.000 per β actina) coniugati con perossidasi di rafano (HRP) per 2 ore a temperatura ambiente

La reazione di riconoscimento tra l'anticorpo primario e il secondario è stata messa in evidenza mediante chemiluminescenza con pellicola Kodak (GE Healthcare, Milano, Italia).

Le bande sono state analizzate e quantificate mediante analisi densitometrica con il software ImageJ 1.45 (NIH, Bethesda, MD, USA) (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) utilizzando β -actina per la normalizzazione

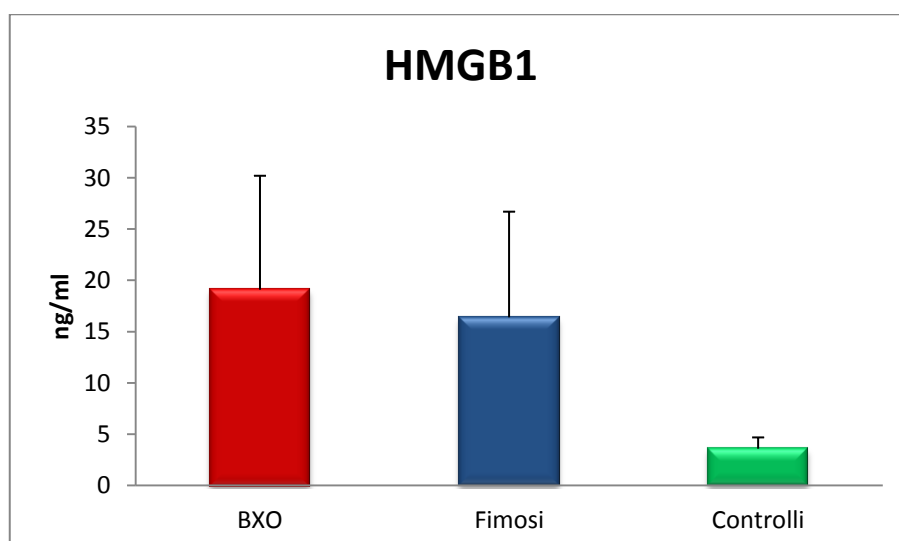
Analisi Statistica

I dati ottenuti dagli esperimenti descritti sono stati espressi come valori medi \pm errore standard della media (SEM) e analizzati attraverso il test t di Student, o l'Anova ad una via ove opportuno, usando il software GraphPad Prism v5. L'analisi di correlazione di Pearson è stata utilizzata per descrivere il rapporto tra i livelli Tg2 e IFN-mRNA.

Le differenze sono state considerate significative per valori di $p < 0,05$.

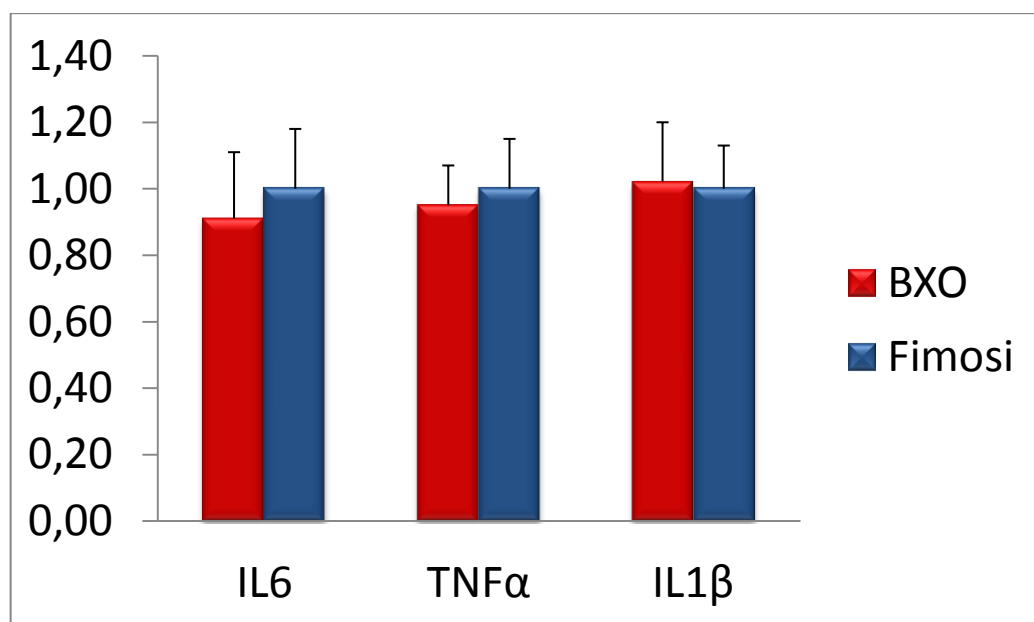
4. RISULTATI

Nel nostro studio abbiamo valutato i valori sierici di HMGB1 nei pazienti affetti da BXO rispetto ai pazienti senza diagnosi istologica di BXO, confrontati con un gruppo controllo di pari età che non presentava alterazioni genitali o stati flogistici in atto al momento del prelievo ematico. I valori di HMGB1 dei pazienti affetti da BXO erano significativamente aumentati rispetto al gruppo controllo (19.1 ± 11.1 vs 3.6 ± 1.1 ng/mL, $p < 0.0001$), così come i valori di HMGB1 dei pazienti affetti da fimosi non complicata dalla patologia, infatti anche questa popolazione presentava valori significativamente aumentati rispetto alla popolazione di controllo (16.4 ± 10.3 vs 3.6 ± 1.1 ng/mL, $p < 0.0001$). Non vi erano però significative differenze tra i valori di HMGB1 nei pazienti affetti da fimosi con BXO rispetto a quelli senza BXO (19.1 ± 11.1 vs 16.4 ± 10.3 ng/mL, $p > 0.05$).

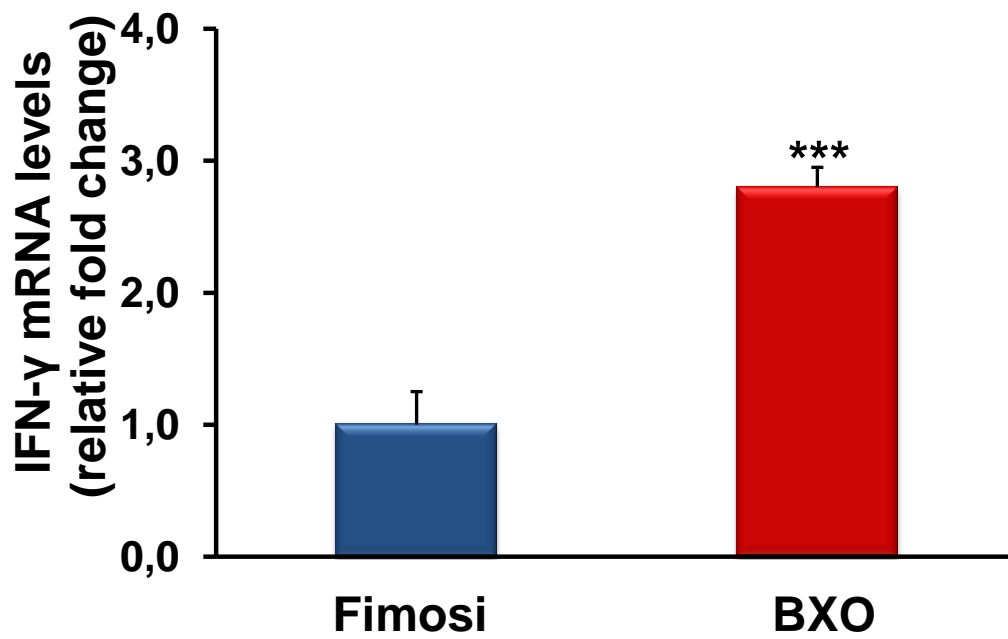


Abbiamo inoltre effettuato, sui campioni di prepuzio di questi pazienti l'analisi dei livelli delle citochine pro infiammatorie (IL-1 beta, IL-6 e TNF-alfa, INF-gamma) .

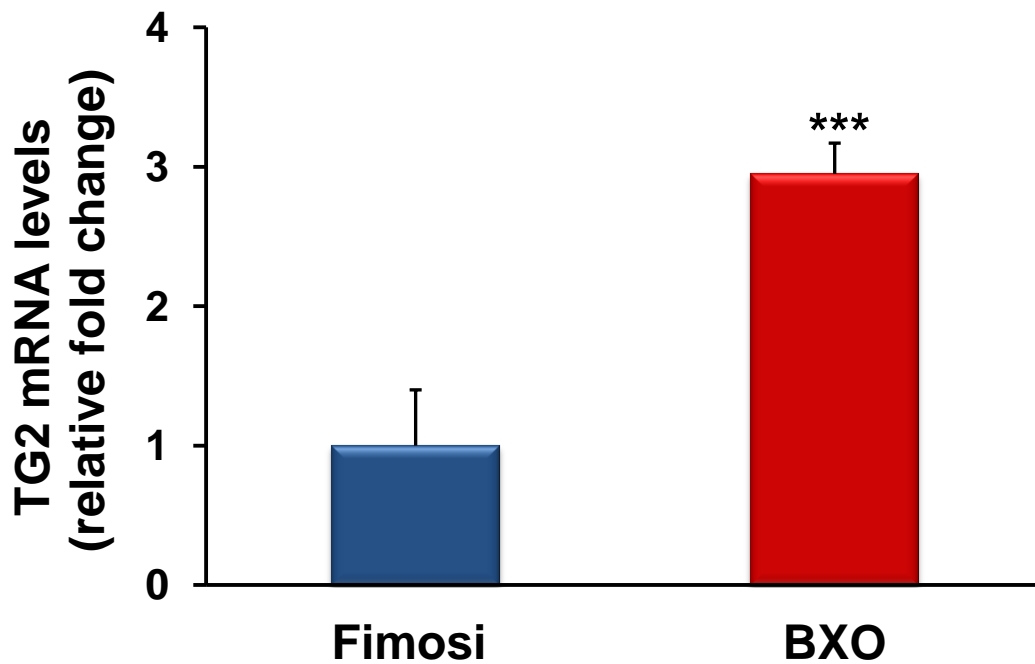
L'analisi mediante Real-Time PCR dei trascritti per le citochine IL-1 beta, IL-6 e TNF-alfa non mostrava significative differenze tra i valori dei pazienti affetti da BXO rispetto ai pazienti affetti da sola fimosi



I campioni di prepuzio dei pazienti con BXO invece presentavano un significativo incremento dei livelli di INF-gamma rispetto a quelli non affetti.

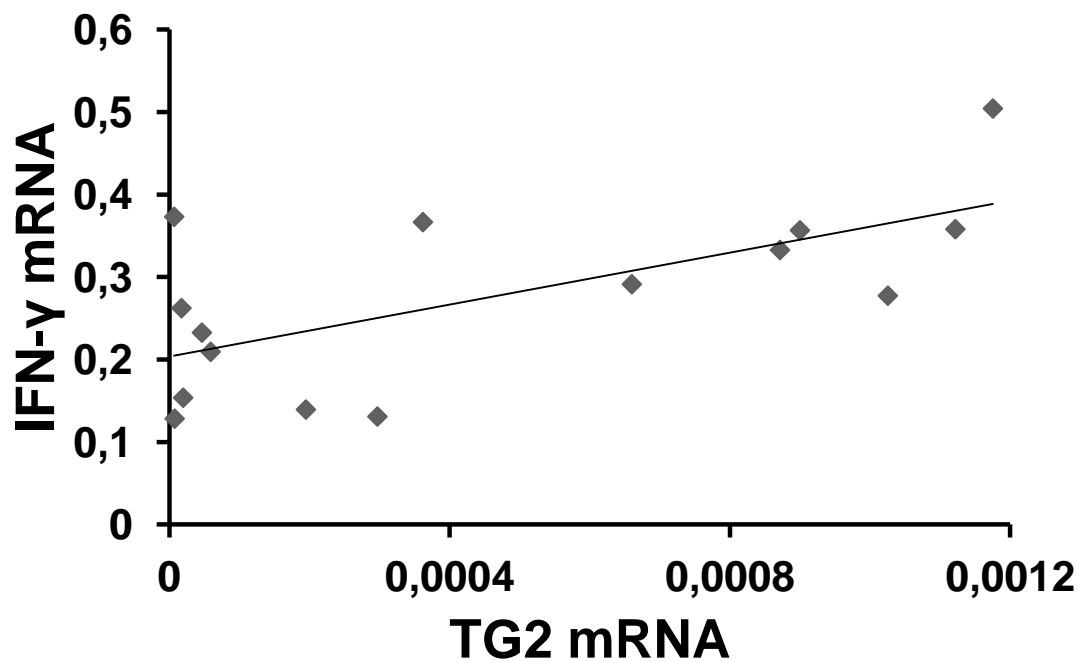


Abbiamo trovato inoltre un significativo aumento dell'espressione dei trascritti di TG2 ($p < 0,001$) nei pazienti affetti da BXO.



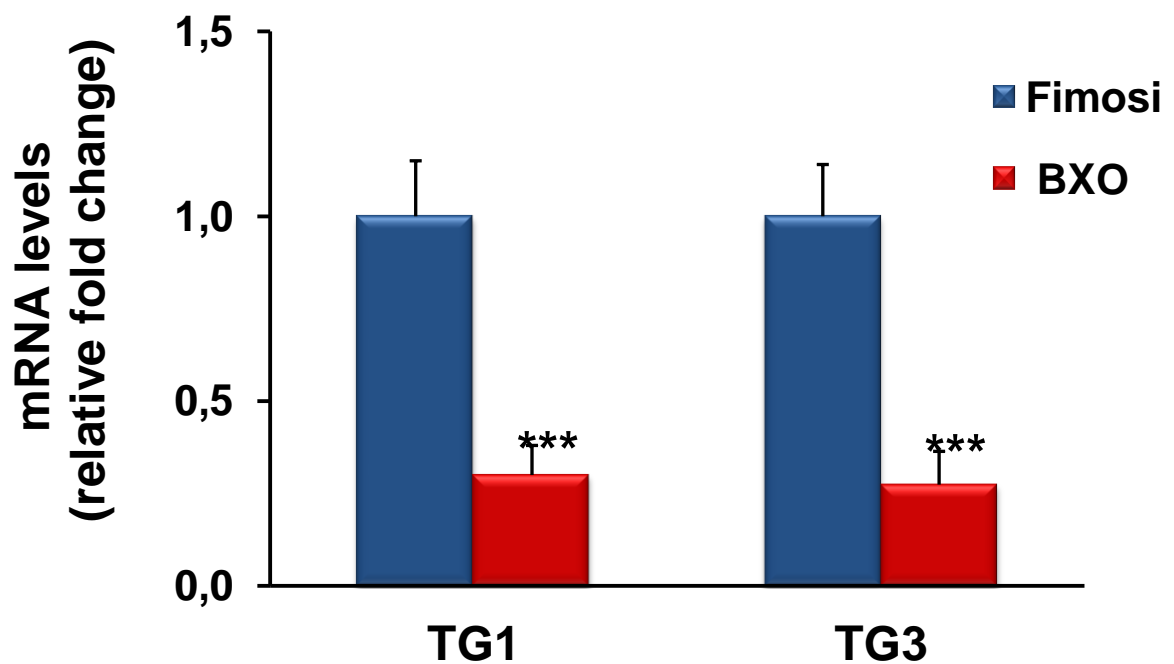
Per sottolineare il coinvolgimento dell' espressione di TG2 nella risposta infiammatoria, abbiamo valutato se vi era una possibile correlazione tra i livelli di mRNA di Tg2 e IFN- γ .

L'analisi di correlazione ha mostrato che i livelli dei trascritti di Tg2 e IFN-gamma nel prepuzio dei pazienti affetti da BXO erano significativamente e positivamente correlati ($r = 0,653$, $p = 0,008$)



E' stata anche analizzata l'espressione dell' mRNA di TG1 e di TG3.

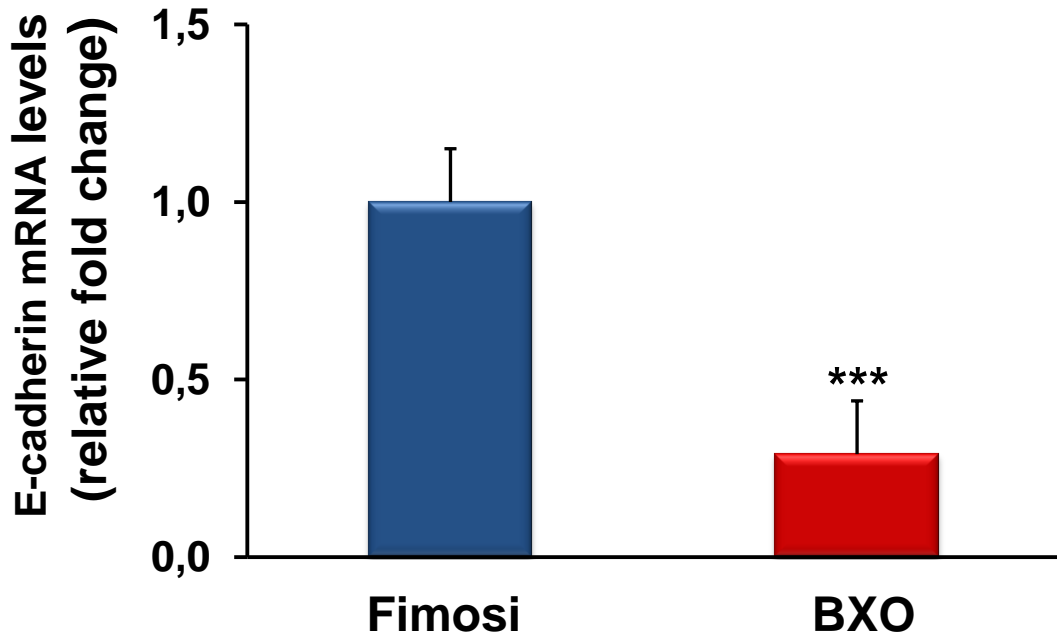
I livelli dei trascritti dell' mRNA di TG1 e TG3 erano meno abbondanti nei tessuti dei pazienti affetti da BXO rispetto a quelli provenienti dai pazienti non affetti. In particolare, i livelli di mRNA di entrambi erano significativamente diminuiti di circa il 70% ($p < 0,001$) nel prepuzio dei pazienti affetti da BXO rispetto ai pazienti senza BXO.

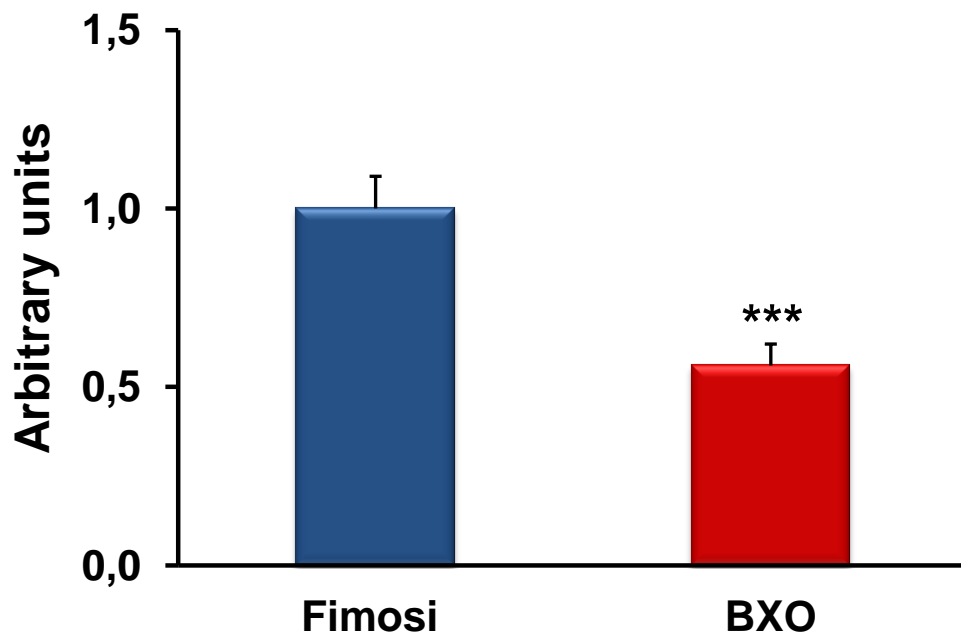
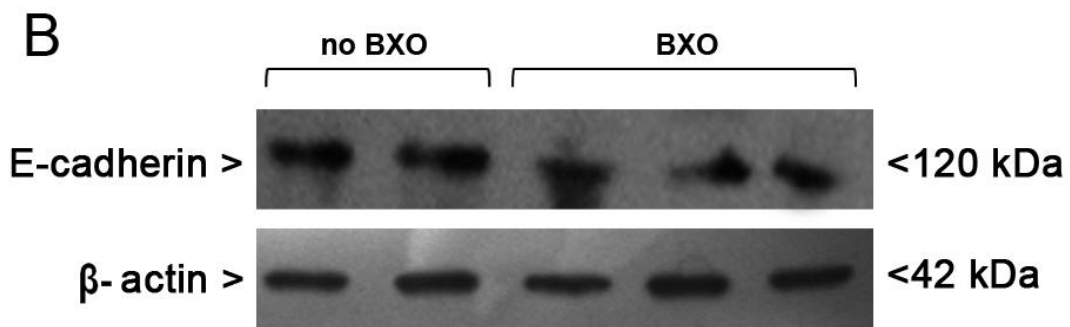


Abbiamo anche esaminato l'espressione dell'm RNA di E-caderina.

L'analisi per Real-Time PCR ha rivelato una diminuzione significativa dei livelli dell'mRNA di e-caderina nei tessuti di pazienti affetti da BXO del 70% rispetto ai pazienti senza BXO ($p < 0,001$).

Questo risultato è stato confermato mediante analisi western blot che ha mostrato una riduzione dell'espressione proteica di E-caderina di circa il 50% nei campioni di prepuzio ottenuti dai pazienti con BXO rispetto ai pazienti senza BXO.

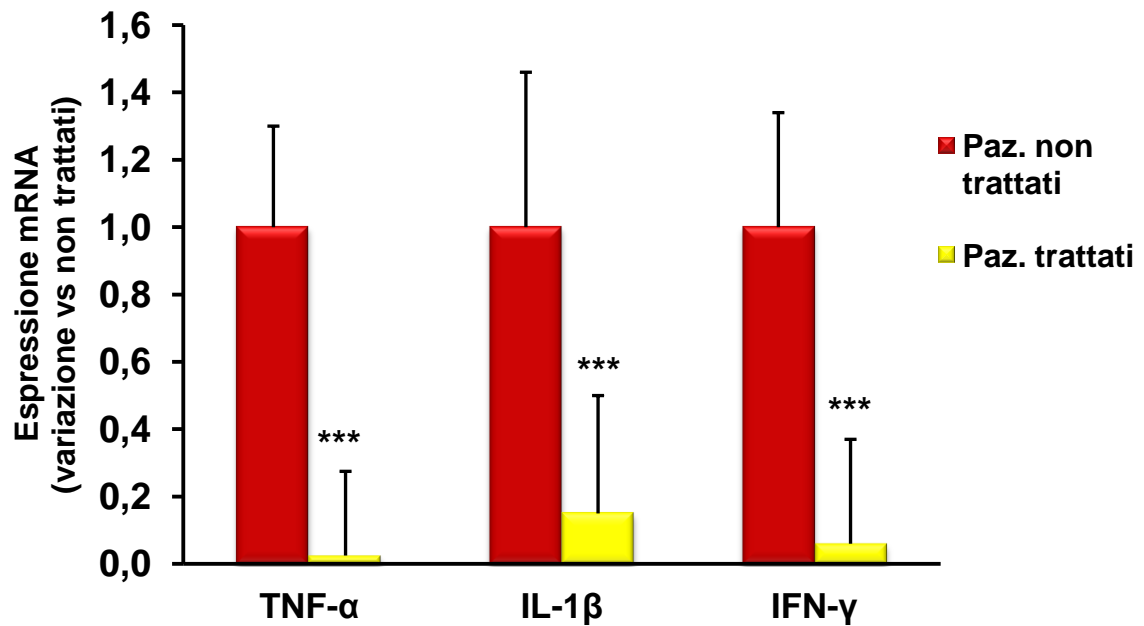




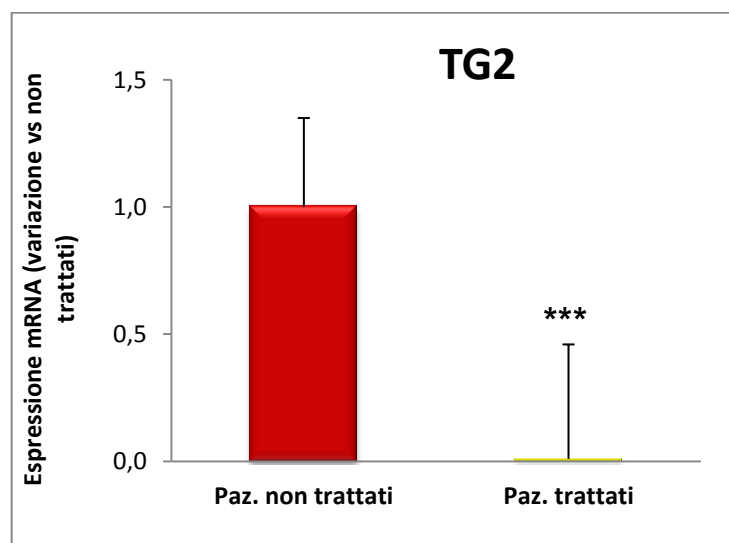
Abbiamo successivamente reclutato 15 pazienti affetti da BXO e sottoposti a trattamento preoperatorio con Ozonidi e 15 pazienti affetti da BXO ma che non erano stati sottoposti a trattamento farmacologico preoperatorio. Sono stati analizzati i livelli degli mRNA tissutali di alcune citochine pro-infiammatorie, di TG2 e dell'enzima NOS2.

L'analisi mediante *Real-Time* PCR ha rilevato una riduzione significativa delle citochine pro-infiammatorie, TNF- α , IL-1 β ed IFN- γ , nei campioni di

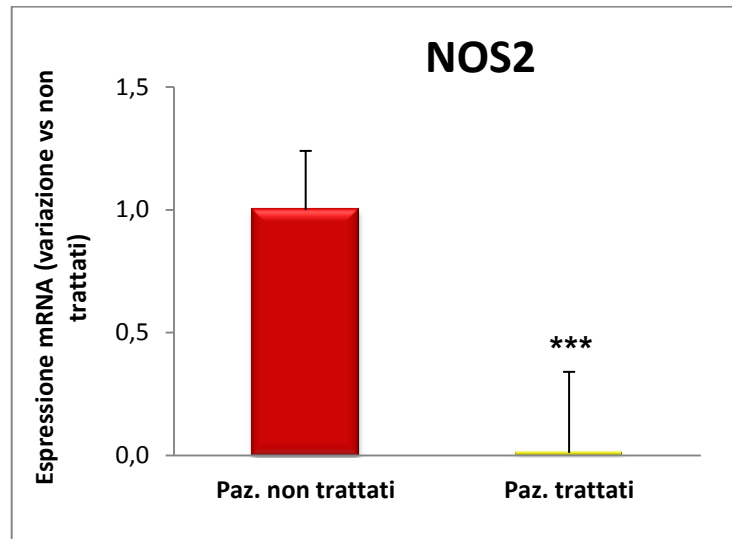
tessuto prepuziale dei pazienti affetti da BXO trattati con ozonidi rispetto ai soggetti non trattati



L'espressione della TG2, analizzata mediante Real-Time PCR, si è ridotta nel tessuto prepuziale dei soggetti trattati con ozonidi rispetto al tessuto non trattato

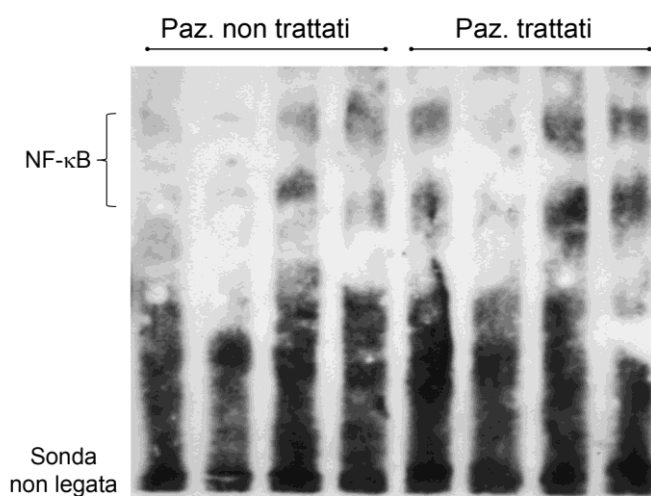


Dai risultati si evince che anche l'espressione della NOS2, analizzata mediante Real-Time PCR, nel tessuto prepuziale dei soggetti trattati si riduce notevolmente rispetto ai soggetti non trattati

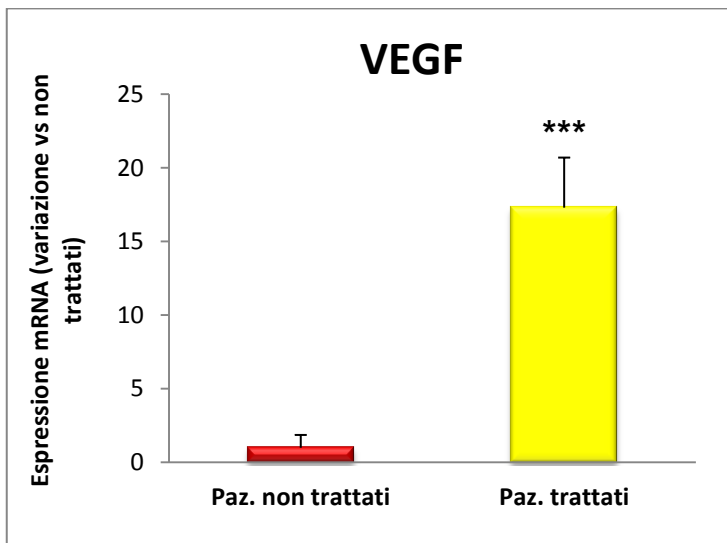


Per caratterizzare il meccanismo molecolare attraverso il quale gli ozonidi esplicano questa azione antiinfiammatoria è stato analizzato lo stato di attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B mediante saggio EMSA.

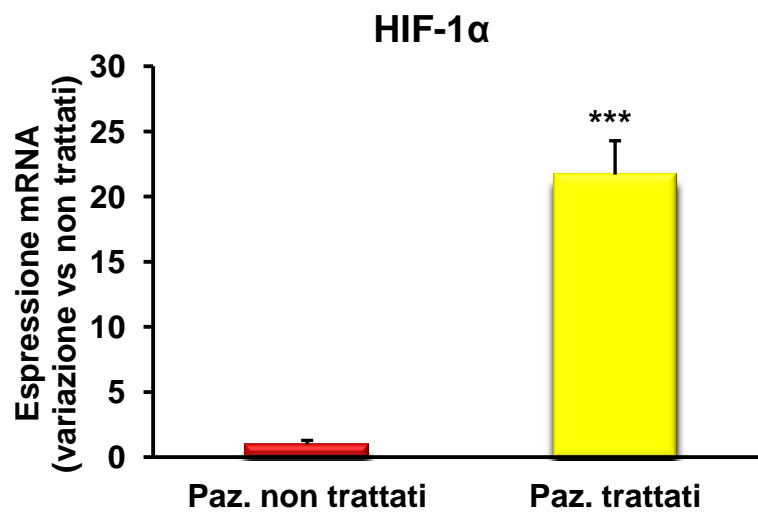
Non sono state evidenziate differenze significative nei livelli di attivazione di NF- κ B tra pazienti trattati e non.



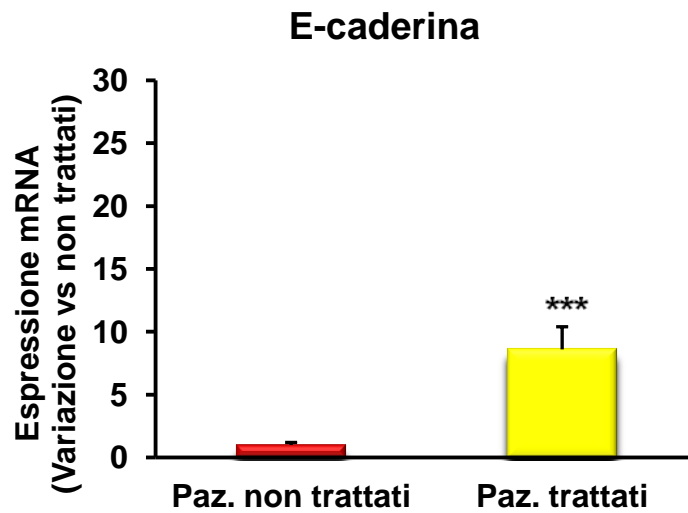
Interessante è il risultato dell'analisi dei livelli di mRNA di VEGF, ottenuto mediante Real-time PCR, che indica un incremento del trascritto genico nei pazienti trattati con ozonidi di 17 volte superiore rispetto ai pazienti non trattati



Anche l'analisi dei trascritti per l' mRNA di HIF1 α ha mostrato un significativo incremento nei pazienti trattati con Ozonide rispetto ai non trattati



Inoltre analizzando i livelli di mRNA della E-caderina tra pazienti affetti da BXO ma sottoposti a trattamento con ozonidi abbiamo ottenuto che questo induce un incremento di 8 volte maggiore dei livelli della proteina rispetto ai pazienti non trattati.



5. DISCUSSIONE

La BXO è una malattia infiammatoria cronica mediata dai linfociti, ed è una delle potenziali cause di fimosi acquisita durante l'infanzia²

La reale incidenza di LS, che sottende la BXO, nei bambini è spesso sottostimata^{7,8} e i meccanismi molecolari alla base della sua patogenesi sono stati scarsamente studiati fino ad ora, specie in popolazione pediatrica, sebbene la patologia sia stata caratterizzata istologicamente.

Diversi studi si sono concentrati sulle alterazioni delle vie molecolari sia sul prepuzio che sulla vulva dei pazienti adulti affetti da LS^{35,144} ma pochi studi sono stati effettuati sui bambini.

Si è inoltre dibattuto se le manifestazioni in età pediatrica e quelle in età adulta rappresentino la stessa entità o siano due entità differenti con diversa etiologia ed evoluzione.

Recentemente, la tecnologia microarray è stata impiegata per confrontare i profili di espressione genica sui prepuzi, sia della popolazione affetta da sola fimosi che di quella affetta da BXO, ottenuti dopo circoncisione sia in maschi adulti che pediatrici¹⁰. Gli Autori hanno dimostrato che vi è concordanza nei profili di espressione genica tra i campioni degli adulti e quelli dei bambini e questo indica che si tratti di uno stesso processo.

Nello stesso studio, la tendenza generale dell'espressione genica ha dimostrato una risposta infiammatoria non specifica, rafforzando l'ipotesi che LS a carico del prepuzio sia una malattia cronica dovuta a una non specifica reazione infiammatoria¹⁰.

HMGB1 è considerata un bersaglio molecolare in diverse malattie, tra cui malattie infettive, fenomeni ischemici, disturbi del sistema immunitario, malattie neurodegenerative, disturbi metabolici, e il cancro. Per tale motivo

una serie di strategie emergenti sono state utilizzate per inibire l'espressione, il rilascio e l'attività in vitro e in vivo di HMGB1^{66,67}.

HMGB1 media la risposta infiammatoria attivando l'espressione e il rilascio di citochine proinfiammatorie, come TNF e IL-6 e agisce inoltre attraverso un feedback positivo che coinvolge le vie di segnale di NF- κ B.

Nel nostro studio i pazienti affetti da BXO hanno mostrato un significativo incremento dei livelli sierici di HMGB1 rispetto alla popolazione controllo, confermando che l'infiammazione svolge un ruolo importante nella patogenesi della BXO.

L'IL1- β è una citochina secreta da vari tipi di cellule del sistema immunitario tra cui macrofagi, monociti e cellule dendritiche, ma anche da fibroblasti e cellule endoteliali. L'IL1- β ha molteplici effetti a livello sia locale che generale nell'organismo tra cui quello di favorire processi infiammatori in risposta ad infezioni batteriche quali vasodilatazione, crampi e febbre. Inoltre stimola la produzione di prostaglandine da parte di vari tipi cellulari (muscolari, epiteliali, ecc), la produzione di altre citochine quali IL-2 e l'attivazione e il reclutamento di altre cellule del sistema immunitario^{72,73}.

Il TNF- α è una citochina coinvolta nell'infiammazione sistemica ed è membro di un gruppo di citochine che stimolano la reazione della fase acuta. Il principale ruolo del TNF- α è nella regolazione delle cellule del sistema immunitario⁸².

L'interferone- γ è una citochina pro-infiammatoria con funzioni pleiotropiche su differenti tipi di cellule come i macrofagi, nei quali causano attivazione di numerosi fattori di trascrizione come STAT1,

NF- κ B e AP-1 che inducono l'espressione di diversi enzimi coinvolti nella fagocitosi, come l'ossidasi fagocitica, l'ossido nitrico sintasi inducibile ed altri enzimi lisosomali.

L'IFN- γ agisce sui Linfociti B promuovendo lo scambio di classe tra le varie sottoclassi di Ig e sulle molecole MHC inducendo l'espressione di proteine che ne migliorano il legame con il peptide e la conseguente presentazione, inoltre l'IFN- γ è coinvolto nell'attivazione delle cellule T citotossiche CD8+ .

E' stato dimostrato che l'espressione di queste citochine pro-infiammatorie, è aumentata in biopsie vulvari ottenute da donne affette da LS rispetto a biopsie ottenute da vulve normali o da cute sana^{145,146}

In precedenza, citochine come IFN- γ e IL-6 sono state studiate in campioni di lichen planus, indicando che queste citochine proinfiammatorie sono prodotte non solo dai linfociti T attivati, ma anche da cheratinociti alterati. Pertanto, è stato ipotizzato che i cheratinociti stimolati possano amplificare il decorso clinico del lichen planus e promuovano l'infiltrazione dei linfociti nell' epidermide¹⁴⁷.

L'analisi dei trascritti per le citochine di fase acuta, non ha mostrato, nel nostro studio, significative differenze tra i valori dei pazienti affetti dalla BXO rispetto ai fimotici, così come i valori di HMGB1 non presentavano significative differenze fra i due gruppi, ma abbiamo osservato un aumento dei livelli di IFN- γ così, come già descritto nei casi di lichen planus¹⁴⁷.

Si può ipotizzare che l'up-regolazione di IFN- γ nei pazienti affetti da BXO possa avere un ruolo importante nell' alterazione linfocita-dipendente dei cheratinociti e che questo contribuisca al mantenimento e alla progressione della malattia.

Diversi studi sottolineano il ruolo della TG2 negli stati infiammatori. Infatti, sebbene la TG2 sia un enzima con distribuzione ubiquitaria che interviene in molti sistemi biologici per la stabilizzazione dei tessuti o per l'immediata difesa dalle ferite, è ormai stato accertato il suo coinvolgimento nell'evolversi di una grande varietà di condizioni patologiche acute e croniche in cui si registra l'aberrante attivazione delle TGasi, imputabile principalmente all'aumento dei livelli di espressione genica. Tali patologie hanno tutte una matrice comune che li contraddistingue e cioè l'iniziale processo infiammatorio che, da normale meccanismo fisiologico di difesa, localizzato in un particolare tessuto danneggiato dell'organismo, evolve spesso in una condizione patologica estendendosi ad un intero organo o sistema fino a comprometterne la funzionalità

Infatti, citochine e fattori di crescita secreti durante le prime fasi del danno cellulare inducono l'aumento dell'espressione di TG2¹⁴⁸.

In un modello di morbo celiaco è stato dimostrato che IFN- γ è in grado di indurre l'espressione e l'attività della TG2¹⁴⁹. Pertanto, l'aumento di IFN- γ , osservato nel prepuzio dei pazienti affetti da BXO, riportato nel nostro studio, può essere correlato all' induzione di TG2.

Inoltre, la correlazione positiva tra l' mRNA di TG2 e di IFN- γ trovata nei pazienti con BXO suggerisce che entrambe le proteine possano svolgere un ruolo nell'indurre e nel mantenere la risposta infiammatoria nel prepuzio che presenta BXO.

Altri studi sostengono l'ipotesi che la up-regolazione di TG2 possa contribuire allo sviluppo di una infiammazione cronica, stimolando l'attività di NF-kB¹⁰⁸.

Il fattore di trascrizione NF- κ B ha infatti un ruolo essenziale nel processo infiammatorio, in gran parte a causa della sua capacità di indurre l'espressione di geni pro-infiammatori, tra cui quelli per le citochine, le chemochine e le molecole di adesione¹⁵⁰.

Negli ultimi anni, diversi studi hanno evidenziato l'esistenza di un feedback positivo TG2 / NF- κ B, in cui NF- κ B direttamente up-regola la trascrizione di TG2 e, a sua volta, TG2 attiva NF- κ B attraverso una via non canonica^{151,152,153,154}, portando ad una persistente attivazione del pathway di NF- κ B.

La prolungata up-regolazione di TG2 nel prepuzio dei pazienti affetti da BXO potrebbe essere anche coinvolta nel processo di fibrosi tipico della malattia.

Le anomalie nella matrice extracellulare (ECM) sono un fattore importante per la fibrosi della cute. L'attivazione extracellulare della TG2 contribuisce alla stabilizzazione della ECM e promuove l'interazione cellula-substrato e la guarigione delle ferite¹⁵⁵.

Diversi studi indicano che la TG2 possa essere coinvolta nella fibrosi del polmone, del fegato e del cuore^{156,11,157}. Anche nelle cicatrici renali sperimentali, la TG2 è stata associata ad alterazione della ECM, sia direttamente attraverso l'interazione con le proteine ECM sia indirettamente, attraverso l'attivazione del TGF- β 1¹⁵⁸.

Anche IFN- γ può contribuire alla formazione delle cicatrici e alla fibrosi, anche se è stato riportato un ruolo controverso nella fibrosi, con numerosi studi che mostrano effetti sia pro-fibrotici che^{101,159,160} anti-fibrotici^{161,162,163}.

Abbiamo dimostrato, inoltre, che TG1 e TG3 sono espressi anche nel prepuzio di pazienti con e senza BXO.

I prodotti della loro attività enzimatica sono associati a diversi processi biologici a seconda della posizione delle proteine bersaglio.

La TG1 e la TG3 prodotte dai cheratinociti agiscono in cooperazione nella formazione dell'epidermide favorendo l'organizzazione di diverse proteine strutturali^{164,124, 165}.

La TG1 è abbondantemente espressa nello strato squamoso dell'epitelio ed è essenziale per agevolare la rigenerazione epidermica¹⁶⁶.

La TG3 è altamente espressa sia nei cheratinociti che nei corneociti¹⁶⁷, contribuendo alla funzione di barriera epidermica.

Usando topi knockout per la TG3, è stato dimostrato che la carenza di TG3 è associata ad una ridotta risposta infiammatoria e ad alterazione dei meccanismi di barriera¹⁶⁸.

Studi effettuati sui tessuti gengivali affetti da malattia periodontale hanno mostrato una diminuzione nell'espressione sia di TG1 che di TG3 in questi, indicando che l'espressione di questi enzimi nel tessuto danneggiato può essere modificata in risposta all'infiammazione cronica¹⁶⁹.

Allo stesso modo, in questo studio sia TG1 che TG3 sono significativamente down-regolate nei tessuti dei pazienti affetti da BXO rispetto ai pazienti senza la malattia. Pertanto, i risultati qui riportati suggeriscono che i cambiamenti osservati nell'espressione TG1 e TG3 potrebbero essere associati al danno dei cheratinociti innescato dai mediatori dell'infiammazione.

Infatti, è stato riportato che nei pazienti affetti da LS l'epidermide inizialmente è iperplastica, e successivamente, probabilmente per la presenza di infiltrato linfocitario sub epiteliale, presenta un processo di morte dei cheratinociti per apoptosi.

Inoltre, l'IFN- γ , prodotta dalle cellule T attivate dall'infiltrato epiteliale, è coinvolta nell'attivazione dei linfociti T CD8 +, che possono poi innescare l'apoptosi dei cheratinociti¹⁴⁷.

Anche la Tg2 potrebbe essere coinvolta nell' apoptosi dei cheratinociti; anzi, in molti modelli sperimentali è stata segnalata la sua up-regolazione^{170,171,172}. Anche nel lichen planus, è stata dimostrata l'espressione della TG2, che viene rilasciata dai cheratinociti in fase di apoptosi, supportando l'ipotesi del coinvolgimento della TG2 nella cascata degli eventi che portano al fenotipo apoptotico¹⁷³.

I cheratinociti sono essenziali per mantenere l'integrità della membrana basale epiteliale, ma a loro volta richiedono un segnale dalla membrana basale per impedire l'apoptosi.

I cheratinociti normali esprimono diverse molecole di adesione necessarie per mantenere il meccanismo di contatto cellula-cellula e cellula-matrice^{174,175}.

L'E-caderina è una proteina di adesione transmembrana appartenente alla famiglia delle caderine, coinvolta nell'adesione cellula-cellula nell' epitelio squamoso stratificato¹⁷⁵ e si esprime anche nella cute normale¹⁷⁶.

È stato dimostrato che in linee cellulari rese immortali, E-caderina mantiene i contatti tra le cellule così da prevenire la morte cellulare per apoptosi.

Un precedente studio effettuato sul lichen planus orale ha dimostrato che la perdita di E-caderina compromette l'integrità epiteliale e che questa può essere coinvolta nella apoptosi dei cheratinociti dello strato basale¹⁷⁶.

Nel nostro studio, abbiamo trovato una riduzione dei livelli di espressione di E-caderina nei campioni di prepuzio dei pazienti affetti da BXO rispetto a quelli senza BXO. È interessante notare che la E-caderina, nonché l'espressione di TG1 e TG3, è down-regolata nei pazienti con la BXO. Pertanto, si può supporre che queste proteine siano coinvolte nella perdita dell'integrità strutturale del prepuzio affetto da BXO.

Studi sull'azione degli ozonidi hanno messo in evidenza un'attività antinfiammatoria svolta dagli stessi ¹⁷⁶, pertanto abbiamo valutato se l'utilizzo degli ozonidi in pazienti affetti da BXO potesse apportare benefici riducendo il processo infiammatorio nel tessuto malato.

Sono stati esaminati quindi i livelli di mRNA di alcune citochine pro-infiammatorie di fase acuta e cronica, IL1- β , TNF- α ed IFN- γ in prepuzi di bambini sottoposti a trattamento con ozonide una settimana prima dell'intervento chirurgico.

Dai dati ottenuti nel nostro studio si evidenzia un potente effetto antinfiammatorio derivante dal trattamento con ozonidi, infatti nei pazienti trattati si è notata una significativa riduzione nel trascritto genico delle citochine esaminate, rispetto ai pazienti non trattati.

Un'ulteriore conferma delle proprietà antinfiammatorie dell'olio ozonizzato applicato nei pazienti in esame si è avuta dall'osservazione della riduzione nei tessuti trattati dei livelli di mRNA di TG2, enzima con un ruolo ormai ben caratterizzato nel processo infiammatorio. Numerosi studi hanno inoltre dimostrato che in tessuti danneggiati per processi infiammatori e in cellule sottoposte a stress si osserva un aumento dell'attività e dell'espressione di TG2.

E' stato dimostrato che lo stress ossidativo induce sia un aumento dei livelli di calcio intracellulare, che stimola l'attività transamidasi di TG2, sia l'attivazione di NF- κ B mediata da TGF- β (come conseguenza del suo rilascio dalla sua subunità di regolazione I κ B α , in seguito alla sua fosforilazione da parte della chinasi di I κ B, IKK), che induce l'espressione di TG2, la traslocazione e l'attivazione, e ciò si traduce in un aumento della risposta infiammatoria.

Il pathway della TG2 indotto dallo stress ossidativo è coinvolto nell'inibizione dell'autofagia e nella formazione dell'aggresoma, ed è

stato suggerito che la TG2 agisca da legame tra stress ossidativo e infiammazione, guidando la decisione se una proteina debba sottoporsi alla regolazione mediata dalle proteine SUMO (Small ubiquitin-related modifier) o alla degradazione proteasomale¹⁷⁷.

In linea con l'attività antinfiammatoria attribuita agli ozonidi è stata evidente anche la riduzione dei livelli di NOS2 riscontrata nei soggetti con BXO trattati; infatti le specie reattive dell'azoto (RNS) sono considerate svolgere un ruolo chiave nei processi infiammatori in cui si produce ossido nitrico (NO) per azione delle NOS. L'NO è una sostanza chimica nociva, ma in piccole concentrazioni controllate agisce come un mediatore cronico fisiologico (vasodilatazione) e fisiopatologico (infiammazione).

La iNOS è stata identificata in diversi tipi di cellule, come i macrofagi e le cellule polimorfo nucleate (PMNL). La sovrapproduzione di NO porta alla generazione di varie RNS come NOx (si riferisce a NO e NO₂) e perossinitrito (ONOO⁻).

Le RNS mediano la formazione della 8OH-nitroguanosina, un marker di danno da nitrati che porta alla morte cellulare causando alterazioni a proteine cellulari, DNA e lipidi, lesioni dei tessuti, e insufficienza d'organo. Tutti i geni analizzati sono sotto il controllo dell'attività trascrizionale di NF-κB, importante fattore che interviene nella modulazione delle reazioni infiammatorie ed eventualmente nell'intero processo di guarigione.

Tuttavia, dall'EMSA effettuato sui campioni di tessuto prelevati da soggetti con BXO trattati con ozonidi e soggetti non trattati non è emersa una sostanziale variazione nell'attivazione di questo fattore trascrizionale.

Questo dato, che sembrerebbe discordare con quanto sopra detto, può essere giustificato tenendo conto che NF-κB non sia l'unico regolatore dell'espressione delle citochine, pertanto ulteriori studi sono necessari per

caratterizzare il pathway attraverso il quale gli ozonidi riescono a ridurre lo stato infiammatorio.

E' stato anche riportato un effetto benefico degli oli ozonizzati nel processo di guarigione delle ferite attribuibile in parte all'effetto antimicrobico, ma anche alla capacità di promuovere il rilascio dei fattori di crescita¹⁷⁸, all'attivazione di meccanismi antiossidanti locali¹⁷⁹ e alla promozione della riparazione tissutale¹⁸⁰.

Nei pazienti analizzati in questo studio, va evidenziato il dato proveniente dalla Real-time PCR che indica un significativo aumento dell'mRNA di VEGF nei soggetti con BXO trattati con ozonidi, circa 17 volte più alto rispetto ai soggetti non trattati.

Il VEGF o fattore di crescita dell'endotelio vascolare è una proteina interessata nel processo di angiogenesi ovvero per la formazione di nuovi vasi da strutture già esistenti. La sintesi di VEGF è indotta in cellule che non ricevono un apporto sufficiente di ossigeno: quando una cellula è in ipossia, essa produce HIF (Hypoxia Inducible Factor), un fattore di trascrizione che stimola il rilascio di VEGF in grado di forzare il processo di angiogenesi. Il fattore HIF è sensibile alla presenza di O₂, che se presente in alte concentrazioni ne determina la degradazione.

Infatti l'HIF in presenza di ossigeno viene idrossilato, e proprio a causa di questa idrossilazione è indirizzato verso la degradazione. Quando l'apporto cellulare di ossigeno è scarso l'HIF non viene più idrossilato e agisce come fattore di trascrizione per la sintesi di VEGF; è interessante notare che anche il perossido d'idrogeno, prodotto dagli ozonidi applicati sulla cute, induce potentemente il VEGF nei cheratinociti umani.

Il VEGF si lega a recettori specifici presenti sulla membrana delle cellule endoteliali, VEGFR-1 e VEGFR-2, che come la maggior parte dei recettori di altri fattori angiogenici, sono di tipo tirosinchinasico. Essi presentano

una porzione extracellulare cui si lega il VEGF, una porzione transmembrana e una regione intracellulare che trasmette il segnale all'interno della cellula. La maggior parte degli effetti del VEGF è mediata dal VEGFR-2, che, in seguito al legame del VEGF, causa una sequenza di reazioni enzimatiche che prevede la fosforilazione di substrati specifici (trasduzione del segnale).

Il risultato finale della stimolazione di tale recettore è la variazione della struttura del citoscheletro delle cellule endoteliali, con la conseguente modificazione della motilità cellulare. L'angiogenesi è un processo fondamentale nel processo di cicatrizzazione, pertanto i risultati ottenuti in questo studio evidenziano, oltre l'effetto antinfiammatorio, anche un ruolo degli ozonidi nel processo di riepitelizzazione.

6.CONCLUSIONI

L'eziologia della BXO è certamente complessa e probabilmente multifattoriale.

Alla luce dei nostri risultati, si può ipotizzare che i possibili fattori scatenanti (microtraumi, cause infettive, malattie autoimmuni) possano provocare una risposta infiammatoria del prepuzio con danni a carico dei cheratinociti e perdita dell' integrità funzionale della barriera epiteliale; questa condizione può quindi portare ad una maggiore suscettibilità ai trigger che comportano il mantenimento e la progressione della BXO nei bambini.

Possiamo affermare inoltre che la sovraespressione di TG2 e IFN- γ nel prepuzio dei pazienti affetti da BXO possa svolgere un ruolo fondamentale nel provocare e mantenere la risposta infiammatoria e che la diminuzione dell'espressione di TG1, TG3 e E-caderina comporti un sovvertimento dell'integrità strutturale del prepuzio.

Le TGasi sono quindi coinvolte nei meccanismi molecolari alla base della BXO e per tale motivo, possono essere considerate possibili bersagli per la terapia e il trattamento della patologia .

Inoltre dai risultati ottenuti in questo studio, il trattamento con ozonide ha comportato un notevole beneficio in termini di riduzione del processo infiammatorio e incremento del processo di riepitelizzazione.

Si potrebbe quindi proporre l' utilizzo degli ozonidi nel trattamento della BXO invece del clobetasolo proprionato considerato, ad oggi, il trattamento più appropriato per la BXO, in considerazione del fatto che la terapia topica steroidea può presentare effetti collaterali, quali atrofia cutanea, insufficienza surrenalica secondaria, ipopigmentazione e lesioni da contatto

mentre non esistono segnalazioni di reazioni avverse dovute all'utilizzo di prodotti a base di ozonidi .

Gli ozonidi risultano infatti negativi al patch test, al fotopatch test e al test di citotossicità. E' consigliabile quindi un loro utilizzo in tutti quei pazienti che presentano ipersensibilità a farmaci steroidei e non steroidei per uso topico, e quindi ancor di più in età pediatrica.

BIBLIOGRAFIA

1. Kirk PS, Yi Y, Hadj-Moussa M, Malaeb BS. Diversity of patient profile, urethral stricture, and other disease manifestations in a cohort of adult men with lichen sclerosus. *Investig Clin Urol*. 2016 May; 57(3):202-7
2. Celis S, Reed F, Murphy F, Adams S, Gillick J, Abdelhafeez AH, Lopez PJ. Balanitis xerotica obliterans in children and adolescents: a literature review and clinical series. *J Pediatr Urol* 2014; 10: 34-9
3. Bochove-Overgaauw DM, Gelders W, De Vylder AM. Routine biopsies in pediatric circumcision: (non) sense? *J Pediatr Urol* 2009; 5: 178-80
4. Jasanitiene D, Valiukeviciene S, Vaitkiene D, Jievaltas M, Barauska V, Gudnaviciene I, Franke I, Gollnick H. Lichen sclerosus et atrophicus in pediatric and adult male patients with congenital and acquired phimosis. *Medicina (Kaunas)* 2004;4(66)460- 466.
5. Neill SM, Lewis FM, Tatnall FM, Cox NH; British Association of Dermatologists. British Association of Dermatologists' guidelines for the management of lichen sclerosus 2010. *Br J Dermatol* 2010; 163: 672-82
6. Celis S, Reed F, Murphy F, Adams S, Gillick J, Abdelhafeez AH, Lopez PJ. Balanitis xerotica obliterans in children and adolescents: a literature review and clinical series. *J Pediatr Urol* 2014; 10: 34-9
7. Bale P, Lochhead A, Martin HCO, Gollow Ian. BXO in children. *Pediatr Pathol*. 1987;7:617–627.
8. Kiss A, Király L, Kutasy B, Merksz M. High incidence of balanitis xerotica obliterans in boys with phimosis: prospective 10-year study. *Ped Dermatol*. 2005;22:305–308

9. Becker K, Meissner V, Farwick W, Bauer R, Gaiser M.R. .Lichen sclerosus and atopy in boys :coincidence or correlation? .British Journ of Dermatology 2013,362-366.
10. Edmonds E, Barton G, Buisson S, Francis N, Gotch F, Game L, Haddad M, Dinneen M, Bunker C. Gene expression profiling in male genital lichen sclerosus. Int JExp Pathol. 2011;92(5):320-5
11. Oyama N, Chan I , Neill S, Hamada T. Autoantibodies to extracellular matrix protein 1 in lichen sclerosus, The Lancet (2003); 362: 118-123
12. Pilatz A, Altinkilic B, Schorman E, Maegel L, Izykowsky N, Becker J et al. Congenital phimosis in patients with and without lichen sclerosus: distinct expression patterns of tissue remodeling associated genes. J urol (2013); 189: 268-74
13. Philippou P , Shabbir M, Ralph DJ, Malone P, Nigam R, Freeman A, Muneer A, Minhas S. Genital lichen sclerosus/balanitis xerotica obliterans in men with penile carcinoma: a critical analysis. BJU Int. 2013 May;111(6):970-6
14. Stuhmer A: Balanitis xerotica obliterans (post-operationem) und ihre Beziehungen zur "Kraurosis glandis et praeputii penis" Arch Derm Syph 156:613,1928
15. Catterall RD, Oates JK. Treatment of balanitis xerotica obliterans with hydrocortisone injections. Br J Vener Dis 1962; 38: 75-7
16. Gargollo PC, Kozakewich HP, Bauer SB, Borer JG, Peters CA, Retik AB, Diamond DA. Balanitis xerotica obliterans in boys. J Urol 2005; 174: 1409-12
17. Tong LX, Sun GS, Teng JM. Pediatric Lichen Sclerosus: A Review of the Epidemiology and Treatment Options. Pediatr Dermatol. 2015 Sep-Oct;32(5):593-9

18. Calleja Aguayo E, Hernández Calvarro AE, Marhuenda Irastorza C. Balanitis xerotica obliterans, underdiagnosed pathology of clinical relevance. *Cir Pediatr.* 2015 Jul 20;28(3):133-136.
19. Meuli M, Briner J, Hanimann B, Lichen sclerosus et atrophicus causing phimosis in boys : a prospective study with 5 year follow –up after complete circumcision. *J Urol* 1994;152:987-989
20. Liatsikos EN, Perimenis P, Dandinis K, Kaladelfou E ,Barbalias G. Lichen sclerosus et atrophicus. Findings after complete circumcision. *Scand J Urol Nephrol* 1997;31:453e6.
21. Chalmers RJ, Burton PA, Bennett RF, Goring CC, Smith PJ. Lichen sclerosus et atrophicus. A common and distinctive cause of phimosis in boys. *Arch Dermatol.* 1984 Aug;120(8):1025-7.
22. Bale PM, Lochhead A, Martin HC, Gollow I. Balanitis xerotica obliterans in children. *Pediatr Pathol.* 1987;7(5-6):617-27.
23. Mattioli G, Repetto P, Carlini C, Granata C, Gambini C, Jasonni V. Lichen sclerosus et atrophicus in children with phimosis and hypospadias. *Pediatr Surg Int* 2002; 18: 273-5
24. Shankar KR1, Rickwood AM. The incidence of phimosis in boys. *BJU Int.* 1999 Jul;84(1):101-2.
25. Jayakumar S, Antao B, Bevington O, Furness P, Ninan GK. Balanitis xerotica obliterans in children and its incidence under the age of 5 years. *J Pediatr Urol* 2012; 8: 272-5
26. Azurdia R. M., Luzzi G. A., Byren I. et al. Lichen sclerosus in adult men: a study of HLA associations and susceptibility to autoimmune disease. *British Journal of Dermatology* (1999)
27. Powell J, Wojnarowska F. Lichen Sclerosus: seminar. *Lancet* (1999); 353: 1777-1783)

28. Sherman V, Mc Pherson T, Baldo M, Salim A, Gao XH, Wojnarowska F. The high rate of familial lichen sclerosis suggests a genetic contribution: an observational cohort study. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2010 Sep;24(9):1031-4
29. Dendrinis ML1, Quint EH. Lichen sclerosis in children and adolescents. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2013 Oct;25(5):370-4
30. Chan I, Oyama N, Neill SM, Wojnarowska F, Black MM, McGrath JA. Characterization of IgG autoantibodies to extracellular matrix protein 1 in lichen sclerosis. *Clin Exp Dermatol.* 2004 Sep;29(5):499-504
31. Pilatz A, Altinkilic B, Schormann E, Maegel L, Izykowski N, Becker J, Weidner W, Kreipe H, Jonigk D. Congenital phimosis in patients with and without lichen sclerosis: distinct expression patterns of tissue remodeling associated genes. *J Urol.* 2013 Jan;189(1):268-74.
32. Gao XH1, Barnardo MC, Winsey S, Ahmad T, Cook J, Agudelo JD, Zhai N, Powell JJ, Fuggle SV, Wojnarowska F. The association between HLA DR, DQ antigens, and vulval lichen sclerosis in the UK: HLA DRB112 and its associated DRB112/DQB10301/04/09/010 haplotype confers susceptibility to vulval lichen sclerosis, and HLA DRB10301/04 and its associated DRB10301/04/DQB10201/02/03 haplotype protects from vulval lichen sclerosis. *J Invest Dermatol.* 2005 Nov;125(5):895-9.
33. Baldo M, Bhogal B, Groves RW, Powell J, Wojnarowska F. Childhood vulval lichen sclerosis: autoimmunity to the basement membrane zone protein BP180 and its relationship to autoimmunity. *Clin Exp Dermatol.* 2010 Jul;35(5):543-5
34. Lipscombe TK, Wayte J, Wojnarowska F. A study of clinical and aetiological factors and possible associations of lichen sclerosis in males. *Australas J dermatol* 1997;38:132-6

35. Gambichler T, Skrygan M, Czempiel V, Tigges C, Kobus S, Meier JJ, Köhler CU, Scola N, Stücker M, Altmeyer P, Kreuter A. Differential expression of connective tissue growth factor and extracellular matrix proteins in lichen sclerosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012 Feb;26(2):207-12
36. Cancer Reserch UK (2009).[http://info.cancersearchuk.org/cancerstats/types/vulva incidence](http://info.cancersearchuk.org/cancerstats/types/vulva%20incidence)
37. Pietrzak P, Hadway P, Corbishley CM, Watkin NA. Is the association between balanitis xerotica obliterans and penile carcinoma underestimated? *BJU Int*. 2006 Jul;98(1):74-6.
38. Weid B, Waltz T and Garbe C. Is morphoea caused by *Borrelia burgdorferi*? A review. *Br J Dermatol* (2000); 142: 636
39. Drut RM, Gomez MA, Drut R and Lojo MM. Human Papillomavirus is present in some cases of childhood penile lichen sclerosis: an in situ hybridization and SP-PCR study. *Pediatr Dermatol* (1998); 15:85
40. Yashar S, Han KF and Haley JC. Lichen sclerosis-lichen planus overlap in a patient with hepatitis C virus infection. *Br J Dermatol* (2004); 150: 168
41. Kohlberger PD, Joura EA, Bancher D, Gitsh G, Breitenecker G and Kieback DG. Evidence of androgen receptor expression in lichen sclerosis: an immunohistochemical study. *J Soc Gynecol Investig* (1998); 5: 331
42. Pock L. Koebner phenomenon in Lichen sclerosis and atrophicus. *Dermatologica* (1990); 181: 76
43. De Pasquale I, Park AJ, Bracka A. The treatment of balanitis erotica obliterans .*BJU Int* 2000;86:459-65
44. Becker K.Lichen Sclerosis in boys. *Dtsch Arztebl Int*.2011;108:53

45. Pugliese J, Morey A, Peterson A. Lichen sclerosus: review of literature and current recommendations for management. *J Urol* 2007;178:2268-76
46. Hinchliffe SA, Ciftci AO, Khine MM, Rickwood AM, Ashwood J, McGill F, Clapham EM, van Velzen D. Composition of the inflammatory infiltrate in pediatric penile lichen sclerosus et atrophicus (balanitis xerotica obliterans): a prospective, comparative immunophenotyping study. *Pediatr Pathol* (1994); 14:223-33
47. Chi CC, Kirtschig G, Baldo M, Lewis F, Wang SH, Wojnarowska F. Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials on topical interventions for genital lichen sclerosus. *J Am Acad Dermatol*. 2012 Aug;67(2):305-12
48. Kiss A, Csontai A, Pirot L, Nyrady P, Merksz M, Kiraly L. The response of balanitis xerotica obliterans to local steroid application compared with placebo in children. *J Urol* 2001 165:219-20
49. Goldstein AT, Creasey A, Pfau R, Phillips D, Burrows LJ. A double-blind, randomized controlled trial of clobetasol versus pimecrolimus in patients with vulvar lichen sclerosus. *J Am Acad Dermatol*. 2011 Jun;64(6)
50. Basak PY and Basak K. Lichen sclerosus et atrophicus of the scalp: satisfactory response of acitretin. *J Eur Acad Dermatol Venereol* (2002); 16:183
51. Holbrook C, Tsang T. Management of boys with abnormal appearance of meatus at circumcision for balanitis xerotica obliterans. *Ann R Coll Surg Engl* 2011; 93: 482-4
52. Wilkinson DJ, Lansdale N, Everitt LH, Marven SS, Walker J, Shawis RN, Roberts JP, Mackinnon AE, Godbole PP. Foreskin preputioplasty and intralesional triamcinolone: a valid alternative to

circumcision for balanitis xerotica obliterans. *J Pediatr Surg* 2012; 47: 756-9

53. Homer L, Buchanan KJ, Nasr B, Losty PD, Corbett HJ. Meatal stenosis in boys following circumcision for lichen sclerosus (balanitis xerotica obliterans). *J Urol* 2014; 192: 1784-8

54. Kirk PS, Yi Y, Hadj-Moussa M, Malaeb BS. Diversity of patient profile, urethral stricture, and other disease manifestations in a cohort of adult men with lichen sclerosus. *Investig Clin Urol.* 2016 May;57(3):202-7

55. Dogra PN, Singh I, Khaitan A. Urethral stone presenting as a stop valve--a rare complication of balanitis xerotica obliterans. *Int Urol Nephrol.* 2001;33(2):395-6.

56. Christman MS, Chen JT, Holmes NM. Obstructive complications of lichen sclerosus. *J Pediatr Urol* 2009; 5: 165-9

57. Kulkarni S, Barbagli G, Kirpekar D, Mirri F, Lazzeri M. Lichen sclerosus of the male genitalia and urethra: surgical options and results in a multicenter international experience with 215 patients. *Eur Urol* 2009; 55: 945-54

58. M. Lazzeri, G. Guazzoni, D. Turini, G. Barbagli. New 2-stage buccal mucosal graft urethroplasty. *J Urol* (2002); 167: 130-132

59. Peterson AC, Palminteri E, Lazzeri M, Guanzoni G, Barbagli G, Webster GD. Heroic measures may not always be justified in extensive urethral stricture due to lichen sclerosus (balanitis xerotica obliterans). *Urology.* 2004 Sep;64(3):565-8

60. Raj G1, Bell HK. A multi-centre audit on genital lichen sclerosus in the North West of England. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2014 Jul;28(7):963-6

61. Walker , Gooderham K, Hastings JR, Mayes E, Johns EW. The primary structure of non histone chromosomal proteins HMG-1 and 2 FEBS lett 1980
62. Yotov WV, St-Arnaud R. Nucleotide sequence of a mouse cDNA encoding the non histone chromosomal high mobility group protein-1 (HMG1). Nucleic Acid Res 1992)
63. Bianchi ME. The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes
64. Stemmer C, Ritt C, Igloi GL, Grimm R, Grasser KD. Variability in Arabidopsis thaliana chromosomal high-mobility-group-1-like proteins. European journal of biochemistry / FEBS 1997
65. Wittmeyer J, Formosa T. The Saccharomyces cerevisiae DNA polymerase alpha catalytic subunit interacts with Cdc68/Spt16 and with Pob3, a protein similar to an HMG1-like protein Journal of molecular cell biology 1997
66. Taniguchi N Kawahara K, Yone K, Hashiguchi T, Yamakuchi M, Goto M, Inoue K, Yamada S, Ijiri K, Matsunaga S, Nakajima T, Komiya S, Maruyama I. High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine. Arthritis Rheum 2003
67. Degryse B Bonaldi T, Scaffidi P, Müller S, Resnati M, Sanvito F, Arrigoni G, Bianchi ME The high mobility group (HMG) boxes of the nuclear protein HMG1 induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells. Journal of Cell Biology. (2001)
68. Scaffidi P Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation Nature 2002

69. Gardella S, Andrei C, Ferrera D, Lotti LV, Torrisi MR, Bianchi ME, Rubartelli A. The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO rep.* 2002
70. Oh YJ, Youn JH, Ji Y, Lee SE, Lim KJ, Choi JE, Shin JS. HMGB1 is phosphorylated by classical protein kinase C and is secreted by a calcium-dependent mechanism. *Journal of Immunology* 2009
71. Wang D, Zamorano J, Keegan AD, Boothby M. HMG-1(Y) phosphorylation status as a nuclear target regulated through insulin receptor substrate 1 and the I4R motif of the interleukin 4 receptor. *Journal of Biological Chemistry* (1997)
72. Pristle J.P., Schar H.P., Grutter M.G. (1988). Crystal structure of the cytokine interleukin-1 beta. *EMBO J.*; 7: 339–343.
73. Browning J.L., Ribolina A. (1987). Interferon blocks interleukin 1-induced prostaglandin release from human peripheral monocytes. *J. Immunol.*; 138: 2857–2863.
74. Schindler R., Ghezzi P., Dinarello C.A. (1990). IL-1 β induces IL-1 β . IFN- γ suppresses IL-1 β but not lipopolysaccharide-induced transcription of IL-1 β . *J. Immunol.*; 144: 2216–2222.
75. Van Snick J., Cayphas S., Szikora J.P., Renauld J.C., Van Rooste E., Boon T., Simpson R.J. (1988). cDNA cloning of murine interleukin-HP1: homology with human interleukin 6. *Eur. J. Immunol.*; 18: 193–197
76. Hirano T., Matsuda T., Turner M., Miyasaka N., Buchan G., Tang B., Sato K., Shimizu M., Maini R., Feldmann M., Kishimoto T. (1988). Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.*; 18: 1797–1801
77. Remick D.G., Bolgos G., Copeland S., Siddiqui J. (2005). Role of interleukin-6 in mortality from and physiologic response in sepsis. *Infection and immunity.*; 73: 2751-2757

78. Hirano T. (1992). The biology of interleukin-6. *Chem. Immunol.*; 51: 153–180
79. Paquet P., Pierard G. (1996). Interleukin-6 and the skin. *Int. Arch. Allergy Immunol.*; 109: 308–317
80. Grossman R.M., Krueger J., Yourish D., Granelli Piperno A., Murphy D.P., May L.T., Kupper T.S., Sehgal P.B., Gottlieb A.B. (1989). Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; 86: 6367–6371
81. Aggarwal B.B., Khor W.J., Hass Moffat B., Spencer S.A., Henzel W.J., Bringman T.S., Nedwin G.E., Goeddel D.V., Harkins R.N. (1985b). Human tumor necrosis factors: production, purification and characterization. *J. Biol. Chem.*; 260: 2345.
82. Giraud E., Primo L., Audero E., Gerber H.P., Koolwijk P., Soker S., Klagsbrun M., Ferrara N., Bussolino F. (1998). Tumor necrosis factor- α regulates expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 and of its co-receptor neuropilin-1 in human vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.*; 273: 22128–22135
83. Feldmann M., Brennan F.M., Maini R.N. (1995) in *Human Cytokines: Their Role in Disease and Therapy*, (ed. B. B. Aggarwal and R. K. Puri), Role of cytokines in autoimmune diseases, pp. 185–194 Blackwell Science, Boston.
84. Manetti R., Parronchi P., Guidizi M. G. et al. (1993). Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing cells. *J. Exp. Med.*; 177: 1199–1204

85. Trinchieri G. (1995). Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.*; 13: 251–276.
86. Moncada S., Higgs A. (1993). Mechanisms of disease: The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.*; 329: 2002–2012
87. Green S.J., Nancy C.A., Meltzer M.S. (1991). Cytokine-induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages: a protective host response to *Leishmania* and other intracellular pathogens. *J. Leukoc. Biol.*; 50: 93– 103
88. Dustin M.L., Singer K.H., Tuck D.T., Springer T.A. (1988). Adhesion of T lymphoblasts to epidermal keratinocytes is regulated by interferon and is mediated by intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1). *J. Exp. Med.*; 167: 1323–1340
89. Twardzik D.R., Mikovits J.A., Ranchalis J.E., Purchio A.F., Ellingsworth L., Ruscetti F.W. (1990). Interferon-induced activation of latent transforming growth-factor by human monocytes. *Ann. NY Acad. Sci.*; 593: 276–284
90. Roy M., Waldschmidt T., Aruffo A., Ledbetter J., Noelle R.J. (1993). The regulation of the expression of gp39, the CD40 ligand, on normal cloned CD4+ cells. *J. Immunol.*; 151: 2497.
91. Moncada, S., R.M. Palmer, and E.A. Higgs, Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 1991. 43(2): p. 109-42
92. Denninger, J.W. and M.A. Marletta, Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta*, 1999. 1411(2-3): p. 334-50
93. Lewis, R.S. and W.M. Deen, Kinetics of the reaction of nitric oxide with oxygen in aqueous solutions. *Chem Res Toxicol*, 1994. 7(4): p. 568-74.

94. Semenza G.L.. "Targeting HIF-1 for cancer therapy". *Nature Reviews Cancer* (2003) Vol: 3: 721-732
95. Leung, D.W., Cachianes, G., Kuang, W.J., Goeddel, D.V., and Ferrara, N. 1989. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246, 1306-1309.
96. Maglione, D., Guerriero, V., Viglietto, G., Delli-Bovi, P., and Persico, M.G. 1991. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 9267-9271.
97. Conn G., Bayne M.L., Soderman D.D., Kwok P.W., Sullivan K.A., Palisi T.M. et al. 1990. Aminoacid and cDNA sequences of a vascular endothelial cell mitogen that is homologous to platelet-derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 2628-2632
98. Ferrara, N., Gerber, H.P., and LeCouter, J. 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9, 669-676.
99. Claffey K.P., Shih S.C., Mullen A., Dziennis S., Cusick J.L., et al. 1998. Identification of a human VPF/VEGF 3' untranslated region mediating hypoxiainduced mRNA stability. *Mol Biol Cell* 9: 469-81
100. Mukhopadhyay D, Tsiokas L, Zhou XM, Foster D, Brugge JS, SukhatmeVP, 1995. Hypoxic induction of human vascular endothelial growth factor expression through c-Src activation. *Nature* 375: 577-581
101. Chen B.S., Wang M.R., Xu X., Cai Y., Xu Z.X., Han Y.L., Wu M., Transglutaminase-3, an esophageal cancer-related gene. *Int J Cancer*, 2000; 88: 862-865
102. Griffin M., Casadio R., Bergamini C.M., "Transglutaminases: nature's biological glues", *Biochem. J.* 2002; 368: 377-396

103. Wu J, Zern M A. Tissue transglutaminase, a key enzyme involved in liver diseases. *Hepatol. Res.*, 2004; 29: 1-8.
104. Nadalutti, C.; Viiri, K.M.; Kaukinen, K.; Mäki ,M.; Lindfors, K. Extracellular transglutaminase 2 has a role in cell adhesion, whereas intracellular transglutaminase 2 is involved in regulation of endothelial cell proliferation and apoptosis. *Cell Prolif.* 2011 Feb;44(1):49-58
105. Zemskov, E.A.; Janiak, A.; Hang, J.; Waghray, A.; Belkin A.M.; The role of tissue transglutaminase in cell-matrix interactions. *Front Biosci.* 2006 Jan 1;11:1057-76.
106. Kuo, T.F.; Tatsukawa, H. ; Kojima, S. New insights into the functions and localization of nuclear transglutaminase 2. *FEBS J.* 2011 Dec;278(24):4756-67
107. Verderio, E.A.; Johnson, T.; Griffin, M. Tissue transglutaminase in normal and abnormal wound healing: review article. *Amino Acids.* 2004 Jul;26(4):387-404
108. Ientile, R.; Caccamo, D.; Griffin, M. Tissue transglutaminase and the stress response. *Amino Acids.* 2007 Aug; 33(2):385-94
109. Iismaa, S.E.; Mearns, B.M. ; Lorand, L.; Graham, R.M. Transglutaminases and disease: lessons from genetically engineered mouse models and inherited disorders. *Physiol Rev.* 2009 Jul;89(3):991-1023.
110. Lu, Saydak, Gentile, Stein, Davies. Isolation and characterization of the human tissue transglutaminase gene promoter, *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 9748–9756
111. Mirza A, Liu SL, Frizell E, Zhu J, Maddukuri S, Martinez J, Davies P, Schwarting R, Norton P, Zern MA A role for tissue transglutaminase in hepatic injury and fibrogenesis, and its regulation by NF-kappaB. *Am J Physiol* 1997; 272: G281–G288

112. Jang, Jeon, Cho, Shin, Kim, Jeong, Bae, Kim, Lee, Choi, Lee, Park, Kim. Transglutaminase 2 suppresses apoptosis by modulating caspase 3 and NF-kappaB activity in hypoxic tumor cells. *Oncogene* 2010; 29: 356–367.
113. Kuncio, Tsyganskaya, Zhu, Liu, Nagy, Thomazy, Davies, Zern. TNF-alpha modulates expression of the tissue transglutaminase gene in liver cells. *Am. J. Physiol.* 1998; 274: G240–G245
114. Johnson, Hashimoto, Lotz, Pritzker, Terkeltaub. Interleukin-1 induces pro-mineralizing activity of cartilage tissue transglutaminase and factor XIIIa. *Am. J. Pathol.* 2001; 159: 149–163
115. Kim SY, Jeitner TM, Steinert PM. Transglutaminases in disease. *Neurochem Int.* 2002; 40(1):85-103
116. Quan G, Choi JY, Lee DS, Lee SC. TGF-beta1 upregulates transglutaminase 2 and fibronectin in dermal fibroblasts: a possible mechanism for the stabilization of tissue inflammation. *Arch Dermatol Res* 2005; 297:84–90.
117. Haroon ZA, Hettasch JM, Lai TS, Dewhirst MW, Greenberg CS. Tissue transglutaminase is expressed, active, and directly involved in rat dermal wound healing and angiogenesis. *FASEB J.* 1999; 13(13):1787-95
118. Kalinin, A.; Marekov, L.N.; Steinert P.M. Assembly of the epidermal cornified cell envelope. *J Cell Sci.* 2001 Sep 114(Pt 17): 3069–3070
119. Zhang, Z.; Xing, J.; Ma, L.; Gong, R., Chin, Y.E.; Zhuang, S. Transglutaminase-1 regulates renal epithelial cell proliferation through activation of Stat-3. *J Biol Chem.* 2009 Jan 30;284(5):3345-53
120. Kim, S. Y. Molecular design and biological activities of NF-kappaB inhibitors. *Front. Biosci.*, 2006; 11: 3026–3035.

121. Steinert, P.M.; Marekov, L.N. Direct evidence that involucrin is a major early isopeptide cross-linked component of the keratinocyte cornified cell envelope. *J Biol Chem.* 1997. 272:2021–2030
122. Egberts, F.; Heinrich, M.; Jensen, J. M. ; Winoto-Morbach, S.; Pfeiffer, S.; Wickel, M.; Schunck, M.; Steude, J.; Saftig, P.; Proksch, E.; Schütze, S. Cathepsin D is involved in the regulation of transglutaminase 1 and epidermal differentiation. *J Cell Sci.* 2004 May 1;117(Pt 11):2295-307
123. Candi, E.; Schmidt, R.; Melino, G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 Apr;6(4):328-40.
124. Hitomi, K.; Horio, Y.; Ikura, K.; Yamanishi, K.; Maki, M. Analysis of epidermal-type transglutaminase (TGase 3) expression in mouse tissues and cell lines. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001 May;33(5):491-8.
125. Sardy, M.; Karpati, S.; Merkl, B.; Paulsson, M.; Smyth, N. Epidermal transglutaminase (TGase 3) is the autoantigen of dermatitis herpetiformis. *J Exp Med.* 2002 Mar 18;195(6):747-57.
126. Firestone, D. Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats and Waxes, 2th. AOCS, 2006
127. Scrimgeour, C. Chemistry of Fatty Acids. In: Bailey's Industrial Oil and Fat Products. 6 ed. vol 1. John Wiley & Sons, Inc. 2005
128. Bailey, P. S. Ozonation in Organic Chemistry. Volume 1, Olefinic Compounds. New York: Academic Press, 1978; p220
129. Criegee, R. Angew. Mechanism of Ozonolysis. *Chem. Int. Ed.* 1975; 14: 745.
130. Robinson, J. R.; Lee, V. H. Transdermal Therapeutic Systems. 2nd ed. 29, 1987, 182.
131. Patel, H. R.; Patel, R. B.; Patel, G. N.; Patel. M. M. The influence and compatibility of vegetable oils and other additives on release of

- ketoprofen from transdermal films. *East Cent. Afr. J. Pharm. Sci.* 2010; 13: 19-24.
132. Valacchi, G.; V. Fortino and V. Bocci. The dual action of ozone on the skin. *British Journal of Dermatology* 2005; 153: pp1096–1100
133. Luongo C, Sammartino A et al : “Fisica –chimica e Biochimica dell’Ozono” *Scienze algologiche* 172 Anno HI Gennaio/Aprile 1990
134. Valdenassi L., Franzini M., Richelmi P., Bertè F. Ossigeno-Ozono terapia. *Atti del I Convegno della sezione SIMFER di Riabilitazione Ambulatoriale. Pavia, 22 nov.2003*
135. Gurley, B. Ozone: Pharmaceutical sterilant of the future? *Journal of Parenteral Science and Technology*, 1985; 39 (6).
136. Travagli, V. Zanardi I., . Valachi G, Bocci V. Ozone and Ozonated oils in skin diseases. *Mediators of inflammation. Volume* 2010; 610418
137. Sagai M., Bocci V. Mechanism of action involved in Ozone Therapy: is haling induced via a mild oxidative stress?. *Medical gas research* 2011
138. Hernández F, Hernández D, Zamora Z, Díaz M, Ancheta O, Rodriguez S, Torres D. *Giardia duodenalis*: Effects of an ozonized sunflower oil on in vitro trophozoites. *Exp Parasitol.* 2008
139. Menéndez S, Falcón L, Simón DR, Landa N. Efficacy of ozonized sunflower oil in the treatment of tinea pedis. *Mycoses.* 2002; 45(8):329-32
140. Sechi LA, Lezcano I, Nunez N, Espim M, Duprè I, Pinna A, Molicotti P, Fadda G, Zanetti S Antibacterial activity of ozonized sunflower oil. *J Appl Microbiol.* 2001; 90(2):279-84.
141. C.C. Cardoso, S.B. Macedo, J.C.T. Carvalho, R. Daluaglio, L.R. Ferreira, M. Gomez , G. Demartini, F. Frascini. Azione dell’olio Ozonizzato nelle lesioni chirurgiche di modelli preclinici. *International Journal on drugs and therapy* Vol. XIX - n. 1/2 (56-60) 2002

142. Alleva R, Tomasetti M, Sartini D, Emanuelli M, Nasole E, Di Donato F, Borghi B, Santarelli L, Neuzil J. Alpha-Lipoic acid modulates extracellular matrix and angiogenesis gene expression in non-healing wounds treated with hyperbaric oxygen therapy. *Mol Med*. 2008, 14:3-4
143. Hee Su Kim, Sun Up Noh, Ye Won Han, Kyong Moon Kim, Hoon Kagn, Hyung Ok Kim and Young Min Park. Therapeutic Effects of Topical Application of Ozone on Acute cutaneous Wound Healing. *J Korean Med Sci* 2009; 24(3):368-74
144. Terlouw, A.; Santegoets L.A.; Van der Meijden, W.I.; Heijmans-Antonissen, C.; Swagemakers, S.M.; Van der Spek, P.J.; Ewing, P.C.; Van Beurden, M.; Helmerhorst, T.J.; Blok, L.J. An autoimmune phenotype in vulvar lichen sclerosus and lichen planus: a Th1 response and high levels of microRNA-155. *J Invest Dermatol*. 2012 Mar;132(3 Pt 1):658-66
145. Farrell, A.M.; Dean D.; Millard, P.R.; Charnock, F.M.; Wojnarowska F. Cytokine alterations in lichen sclerosus: an immunohistochemical study. *Br J Dermatol* 2006 Nov, 155(5) :931–940.
146. Carli, P.; Cattane, A.; Pimpinelli, N.; Cozza, A.; Bracco, G.; Giannotti, B. Immunohistochemical evidence of skin immune system involvement in vulvar lichen sclerosus et atrophicus. *Dermatologica*. 1991;182(1):18-22
147. Fayyazi, A.; Schwyer, S.; Soruri, A.; Duong, L.Q.; Radzun H.J.; Peters, J.; Parwaresch, R.; Berger H. T lymphocytes and altered keratinocytes express interferon-gamma and interleukin 6 in lichen planus. *Arch Dermatol Res*. 1999 Sep;291(9):485-90.
148. Mehta, K.; Kumar, A.; Kim, H.I. Transglutaminase 2: a multi-tasking protein in the complex circuitry of inflammation and cancer. *Biochem Pharmacol*. 2010 Dec 15;80(12):1921-9

149. Diraimondo, T.R.; Klöck, C.; Khosla, C. Interferon- γ Activates Transglutaminase 2 via a Phosphatidylinositol-3-Kinase-Dependent Pathway: Implications for Celiac Sprue Therapy. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012 Apr;341(1):104-14
150. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009 Dec;1(6):a001651
151. Condello, S.; Caccamo, D.; Currò, M.; Ferlazzo, N.; Parisi, G.; Ientile, R. Transglutaminase 2 and NF-kappaB interplay during NGF-induced differentiation of neuroblastoma cells. *Brain Res.* 2008 May 1;1207:1-8.
152. Kumar, S.; Mehta, K. Tissue transglutaminase constitutively activates HIF-1 α promoter and nuclearfactor- κ B via a non-canonical pathway. *PLoS One.* 2012;7(11):e49321.
153. Yakubov, B.; Chelladurai, B.; Schmitt, J.; Emerson, R.; Turchi, J.J.; Matei, D. Extracellular tissue transglutaminase activates noncanonical NF- κ B signaling and promotes metastasis in ovarian cancer. *Neoplasia.* 2013 Jun;15(6):609-19.
154. Matarese, G.; Currò, M.; Isola, G.; Caccamo, D.; Vecchio, M.; Giunta, M.L.; Ramaglia, L.; Cordasco, G.; Williams, R.C.; Ientile, R. Transglutaminase 2 up-regulation is associated with RANKL/OPG pathway in cultured HPDL cells and THP-1-differentiatedmacrophages. *Amino Acids.* 2015 Nov;47(11):2447-55.
155. Telci, D.; Griffin, M. Tissue transglutaminase (TG2)--a wound response enzyme. *Front Biosci.* 2006 Jan 1;11:867-82
156. Griffin, M.; Smith, L.L.; Wynne, J. Changes in transglutaminase activity in an experimental model of pulmonary fibrosis induced by paraquat. *Br J Exp Pathol.* 1979 Dec;60(6):653-61.

157. Small, K.; Feng, J.F.; Lorenz, J.; Donnelly, E.T.; Yu, A.; Im, M.J.; Dorn, G.W. 2nd; Liggett, S.B. Cardiac specific overexpression of transglutaminase II (G(h)) results in a unique hypertrophy phenotype independent of phospholipase C activation. *J Biol Chem.* 1999 Jul 23;274(30):21291-6.
158. Johnson, T.S.; Fisher, M.; Haylor, J.L.; Hau, Z.; Skill, N.J.; Jones, R.; Saint, R.; Coutts, I.; Vickers, M.E.; El Nahas, A.M.; Griffin, M. Transglutaminase inhibition reduces fibrosis and preserves function in experimental chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2007 Dec;18(12):3078-88
159. Marko, L.; Kvakan, H.; Park, J.K.; Qadri, F.; Spallek, B.; Binger, K.J.; Bowman, E.P.; Kleinewietfeld, M.; Fokuhl, V.; Dechend, R.; Muller D.N. Interferon-gamma signaling inhibition ameliorates angiotensin II-induced cardiac damage. *Hypertension.* 2012 Dec;60(6):1430-6.
160. Han, Y.L.; Li, Y.L.; Jia, L.X.; Cheng, J.Z.; Qi, Y.F.; Zhang, H.J.; Du, J. Reciprocal interaction between macrophages and T cells stimulates IFN-gamma and MCP-1 production in Ang II-induced cardiac inflammation and fibrosis. *PLoS One.* 2012;7(5):e35506
161. Eickelberg, O.; Pansky, A.; Koehler, E.; Bihl, M.; Tamm, M.; Hildebrand, P.; Perruchoud, A.P.; Kashgarian, M.; Roth M. Molecular mechanisms of TGF-(beta) antagonism by interferon (gamma) and cyclosporine a in lung fibroblasts. *FASEB J.* 2001 Mar;15(3):797-806
162. Fairweather, D.; Frisancho-Kiss, S.; Yusung, S.A.; Barrett, M.A.; Davis, S.E.; Gatewood, S.J.; Njoku, D.B.; Rose, N.R. Interferon-gamma protects against chronic viral myocarditis by reducing mast cell degranulation, fibrosis, and the profibrotic cytokines transforming growth factor-beta 1, interleukin-1 beta, and interleukin-4 in the heart. *Am J Pathol.* 2004 Dec;165(6):1883-94

163. Shao, D.D.; Suresh, R.; Vakil, V.; Gomer, R.H.; Pilling, D. Pivotal advance: Th-1 cytokines inhibit, and Th-2 cytokines promote fibrocyte differentiation. *J Leukoc Biol.* 2008 Jun;83(6):1323-33
164. Eckert, R.L.; Sturniolo, M.T.; Broome, A.M.; Ruse, M; Rorke, E.A. Transglutaminase function in epidermis. *J Invest Dermatol* 2005. 124, 481–492
165. Zeeuwen, P.L. Epidermal differentiation: the role of proteases and their inhibitors. *Eur J Cell Biol.* 2004 Dec;83(11-12):761-73.
166. Inada, R. ; Matsuki, M.; Yamada, K.; Morishima, Y.; Shen, S. C.; Kuramoto, N.; Yasuno, H.; Takahashi, K.; Miyachi, Y.; Yamanishi, K. Facilitated wound healing by activation of the Transglutaminase 1 gene. *Am J Pathol.* 2000 Dec;157(6):1875-82
167. Sardy, M.; Karpati, S.; Merkl, B.; Paulsson, M.; Smyth, N. Epidermal transglutaminase (TGase 3) is the autoantigen of dermatitis herpetiformis. *J Exp Med.* 2002 Mar 18;195(6):747-57
168. Bognar, P.; Nemeth, I.; Mayer, B.; Haluszka, D.; Wikonkal, N.; Ostorhazi, E.; John, S.; Paulsson, M.; Smyth, N.; Pasztoi, M.; Buzas, E.I.; Szipocs, R.; Kolonics, A.; Temesvari, E.; Karpati, S. Reduced inflammatory threshold indicates skin barrier defect in transglutaminase 3 knockout mice. *J Invest Dermatol.* 2014 Jan;134(1):105-11.
169. Currò, M.; Matarese, G.; Isola, G.; Caccamo, D.; Ventura, V.P.; Cornelius, C.; Lentini, M.; Cordasco, G.; Ientile, R. Differential expression of transglutaminase genes in patients with chronic periodontitis. *Oral Dis.* 2014 Sep;20(6):616-23
170. Gabr ,S.A. ; Berika, M.Y.; Alghadir, A.H.; Apoptosis and clinical severity in patients with psoriasis and HCV infection. *Indian J Dermatol.* 2014 May;59(3):230-6.

171. Rodolfo, C.; Mormone, E.; Matarrese, P.; Ciccocanti, F.; Farrace, M.G. Garofano E, Piredda L, Fimia GM, Malorni W, Piacentini M. Tissue transglutaminase is a multifunctional BH3-only protein. *J Biol Chem.* 2004 Dec 24;279(52):54783-92
172. Fesus, L.; Szondy, Z. Transglutaminase 2 in the balance of cell death and survival. *FEBS Lett.* 2005 Jun 13;579(15):3297-302
173. Bianchi, L.; Farrace, M.G.; Nini, G.; Piacentini, M. Abnormal Bcl-2 and "Tissue" Transglutaminase expression in psoriatic skin. *J Invest Dermatol.* 1994 Dec;103(6):829-33
174. Presland, R.B.; Jurevic, R.J. Making sense of the epithelial barrier: what molecular biology and genetics tell us about the functions of oral mucosal and epidermal tissues. *J Dent Educ.* 2002 Apr;66(4):564-74.
175. Gooding, J.M.; Yap, K.L.; Ikura M. The cadherin-catenin complex as a focal point of cell adhesion and signalling: new insights from three-dimensional structures. *Bioessays.* 2004 May;26(5):497-511
176. Neppelberg, E.; Loro, L.L.; Oijordsbakken, G.; Johannessen, A.C.; Altered CD40 and E-cadherin expression--putative role in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.* 2007 Mar;36(3):153-60.
177. Caccamo D, Condello S, Ferlazzo N, Currò M, Griffin M, Ientile R. Transglutaminase 2 interaction with small heat shock proteins mediate cell survival upon excitotoxic stress. *Amino Acids.* 2011; 44(1):151-9
178. Schulz S. Antioxidant mechanism is involved in the gastroprotective effects of ozonized sunflower oil in ethanol-induced ulcers in rats. *Mediators Inflamm.* 2007; 2007:65873.
179. Zamora Rodríguez ZB, González Alvarez R, Guanche D, Merino N, Hernández Rosales F, Menéndez Cepero S, Alonso González Y, Zamora Z, González R, Guanche D, Merino N, Menéndez S, Hernández F, Alonso Y,

Schulz S. Ozonized sunflower oil reduces oxidative damage induced by indomethacin in rat gastric mucosa. *Inflamm Res.* 2008; 57(1):39-43.

180. Silveira AM, Lopes HP, Siqueira JF Jr, Macedo SB, Consolaro A. Periradicular repair after two-visit endodontic treatment using two different intracanal medications compared to single-visit endodontic treatment. *Braz Dent* 2007; 18(4):299-304