

## OZONIDI STABILI CON VITAMINA E ACETATO (OZOILE) VERSUS CORTICOSTEROIDI NEL TRATTAMENTO DI LICHEN SCLEROSUS SUL PREPUZIO: VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI SULL'INFIAMMAZIONE

Tiziana Russo<sup>a</sup> Monica Currò<sup>b</sup> Nadia Ferlazzo<sup>b</sup> Daniela Caccamo<sup>b</sup>  
Patrizia Perrone<sup>a</sup> Salvatore Arena<sup>a</sup> Enrica Antonelli<sup>a</sup> Pietro Antonuccio<sup>a</sup>  
Riccardo Ientile<sup>b</sup> Carmelo Romeo<sup>a</sup> Pietro Impellizzeri<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Human Pathology of Adult and Childhood "Gaetano Barresi", Pediatric Surgery Unit- University of Messina, Messina, Italy; <sup>b</sup>Department of Biomedical and Dental Sciences and Morphofunctional Imaging, University of Messina, Messina, Italy

### Keywords

Lichen sclerosus · Fimosi · Bambini · Ozonidi stabili  
· Vitamina E acetato · Corticosteroidi

### Abstract

**Background:** Il lichen sclerosus (LS) è una patologia della pelle ad eziologia sconosciuta che può colpire il prepuzio. La terapia topica raccomandata è con corticosteroidi, ma essi possono avere effetti collaterali. **Obiettivi:** Abbiamo mirato a comparare gli effetti degli Ozonidi Stabili con vitamina E acetato (OZOILE) rispetto ai corticosteroidi ad uso topico in bambini in fase di circoncisione. **Metodo:** Dodici bambini in fase di circoncisione sono stati trattati prima dell'intervento: 10 bambini con OZOILE crema e 10 con 0.1% di mometasone furoato una volta al

giorno per 7 giorni. Sono stati reclutati inoltre dieci pazienti di età comparabile con LS del prepuzio, senza alcun trattamento, come controlli. Mediante la tecnica di qRT-PCR sono stati valutati i livelli trascrizionali di citochine proinfiammatorie, citochine antinfiammatorie ed E-caderina dai prepuzi asportati. **Risultati:** Il trattamento con OZOILE e con corticosteroidi ha prodotto una riduzione simile dei livelli di TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  in prepuzi di pazienti affetti da LS rispetto ai pazienti non trattati ( $p < 0.001$ ). OZOILE e il trattamento steroideo hanno determinato un incremento dei livelli trascrizionali di IL-13 ed E-Caderina nel prepuzio di pazienti affetti da LS rispetto al prepuzio dei controlli ( $p < 0.001$ ). **Conclusioni:** Sulla base dei nostri dati biochimici, uno studio clinico randomizzato potrebbe essere utile per verificare l'effetto clinico corrente di OZOILE come trattamento alternativo ai corticosteroidi in bambini affetti da LS del prepuzio.

## Introduzione

Il lichen sclerosus (LS) è una patologia infiammatoria cronica della pelle che si localizza preferenzialmente a livello anogenitale. Il LS è stato descritto per la prima volta da Hallopeau[1]. La patologia è stata descritta con diversi nomi inclusi lichen scleroatrofico e Kraurosi della vulva. Nel 1976, la Società Internazionale per lo Studio di Patologia Vulvovaginale lo ha definito LS [2]. Il LS è stato descritto in adulti e bambini di entrambi i sessi, e colpisce molto più frequentemente le donne che gli uomini; inoltre gli adulti sono più affetti rispetto ai bambini [3, 4]. La reale incidenza di LS è difficile da stimare poiché spesso decorre asintomatico.

Il LS in età pediatrica è spesso mal diagnosticato e può causare effetti dannosi. La localizzazione di LS a livello prepuziale è stata anche chiamata Balanite Xerotica Obliterante. È stata descritta per la prima volta nel 1928 da Stuhmer ed è caratterizzata da placche atrofiche bianche che possono colpire il prepuzio, glande, frenulo e meato, oppure uretra, ma la zona perianale è spesso risparmiata. [5–7].

Celis e collaboratori [8] hanno stimato nella loro review un'incidenza di LS del prepuzio pari al 35%. Questa viene considerata responsabile in molti casi di fimosi acquisita (80–90%)[9, 10].

L'eziologia di LS del prepuzio è ancora sconosciuta e probabilmente multifattoriale. Si pensava fossero patologie autoimmuni causate sia da immunità umorale che da quella cellulo-mediata. In letteratura, è stata dimostrata un'associazione tra LS, atopia, tiroiditi, alopecia areata, diabete mellito, vitiligine, anemia pernicioso, celiachia e morbo di Crohn. Inoltre è stato ipotizzato che la predisposizione genetica porta allo sviluppo di una risposta immune. [10–12].

Il LS del pene può essere peggiorato quando coinvolge il meato uretrale o l'uretra. In letteratura, è stato riportato che la stenosi del meato può degenerare in stenosi uretrali e insufficienza renale dovute a uropatia ostruttiva [6, 13, 14].

È stata descritta la terapia medica ad uso topico, prima e dopo trattamento chirurgico con differenti farmaci[15]. Una recente linea guida, basata sull'evidenza, sul trattamento di LS anogenitale in adulti, ragazze e ragazzi, afferma che la metodica standard per il trattamento è l'uso di steroidi ad uso topico molto potenti[9, 16]. Inoltre, la terapia con corticosteroidi può avere diversi effetti, quali atrofia della pelle, rischio di superinfezioni, xerosi, ipopigmentazione, bruciore, irritazione, e raramente soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisario [17].

È stata proposta dunque una terapia di mantenimento con Vitamina E per LS vulvare dopo uso di corticosteroidi [18]. Estratti di avocado e soia sono stati impiegati come antinfiammatori, anti fibrotici, emollienti, e lenitivi e sono stati considerati una valida alternativa nel trattamento dei sintomi e segni di LS vulvari da lievi a moderate [19].

Nel nostro studio precedente, sono stati valutati gli effetti dell'uso preoperatorio degli Ozonidi Stabili con vitamina E acetato (OZOILE) in crema, sullo stato infiammatorio e sul rimodellamento tissutale in bambini di sesso maschile con LS del prepuzio in fase di circoncisione[20].

Nello studio osservazionale, abbiamo comparato gli effetti di OZOILE versus i corticosteroidi topici nel trattamento preoperatorio di bambini con fimosi, affetti da LS in fase di circoncisione, valutando gli effetti antinfiammatorio e di rigenerazione tissutale.

## Materiali e Methods

### *Reclutamento dei pazienti*

Trenta bambini con fimosi in fase di circoncisione e con diagnosi pregressa di LS sono stati inclusi in questo studio osservazionale. L'età media alla diagnosi era  $9.4 \pm 3.6$ , dai 5 ai 15 anni. Tutti i pazienti non mostravano alterazione dell'emocromo o della Proteina C reattiva al momento dell'operazione chirurgica.

La diagnosi pregressa di LS era stata definita da patologi come una lesione epitelio-stromale caratterizzata da atrofia squamosa o iperplasia, una banda come infiltrazione, ialinizzazione del derma papillare, ipercheratosi, incontinenza pigmenti, e/o edema. I pazienti sono stati suddivisi in 3 gruppi da 10 ciascuno.

Il gruppo dei controlli (n=10) non ha ricevuto nessun trattamento preoperatorio, mentre i pazienti degli altri due gruppi sono stati trattati dai pediatri prima dell'operazione con OZOILE crema (n=10) o 0.1% di mometasone furoato (n=10) una volta al giorno per 7 giorni.

I campioni di prepuzi ottenuti in fase di circoncisione sono stati suddivisi in due parti: una porzione è stata utilizzata per l'analisi istologica mentre l'altra per l'analisi dei livelli trascrizionali delle citochine pro e antinfiammatorie nonché dell'E-caderina mediante qRT-PCR.

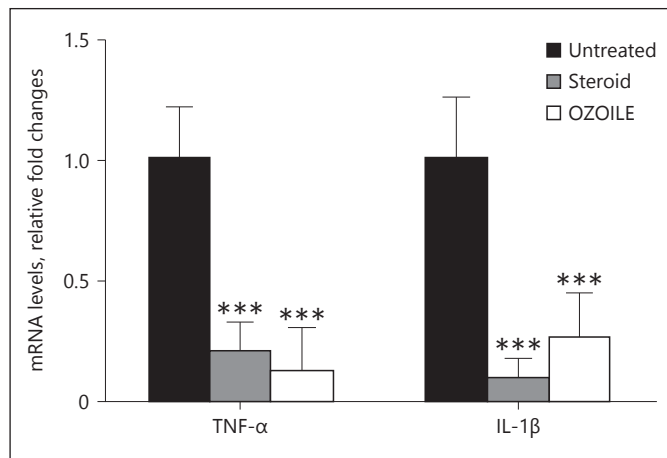
Il protocollo di studio è stato approvato dal Comitato Etico del nostro ospedale e tutte le procedure messe in pratica nello studio sono state in linea con gli standard etici e con la Dichiarazione di Helsinki del 1964 e sue successive modifiche o standard etici comparabili. Il consenso informato e l'autorizzazione all'utilizzo di dati sensibili, sono stati ottenuti dai genitori di tutti i bambini nel momento del ricovero.

### *Analisi dell'espressione genica*

Dopo il campionamento, i tessuti del prepuzio sono stati immersi in 500  $\mu$ L di reagente di stabilizzazione dell'RNA (RNAlater; Life Technologies, Milano, Italia), e conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$  fin quando è stato isolato l'RNA. L'RNA totale è stato isolato utilizzando il reagente TRIzol (Life Technologies), e 2  $\mu$ L dello stesso RNA totale sono stati retrotrascritti con cDNA Archive kit ad alta capacità (Life Technologies). Successivamente sono stati analizzati i livelli di mRNA di TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-13 ed E-caderina, mediante Sybr Green Real-Time PCR), 0.1  $\mu$  M di primer specifici e 25 ng di RNA retrotrascritto in cDNA. La reazione di RT-PCR è stata condotta in un termociclatore 7900 HT fast Real-Time (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) con il seguente programma: un ciclo a  $95^{\circ}\text{C}$  per 10 min, seguito da 40 cicli a  $95^{\circ}\text{C}$  per 15 s e  $60^{\circ}\text{C}$  per 1 min. una curva di dissociazione standard è stata aggiunta per verificare la specificità dei primers.

**Table 1.** qRT-PCR primer sequences

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
ACT-β	TGGTTACAGGAAGTCCCTTGCC	ATGCTATCACCTCCCCTGTGTG
TNF-α	GTGAGGAGGACGAACATC	GAGCCAGAAGAGGTTGAG
IL-1β	GCTTATTACAGTGGCAATGA	TAGTGGTGGTCGGAGATT
IL-13	GTCTCAGCTGGGCAGTTTTC	TCTGCAACTTCAATAGTCAGGTCC
E-cadherin	TGAGTGTCCCCCGGTATCTTC	CAGTATCAGCCGCTTTCAGATTTT



**Fig. 1.** 5a`Xa`fa VW`hWV`V`fSeUj`a`WWWUfaUz`W bda`XS`\_`SfadW`VfWegf`V`bWgl`a`V`bS`[Wf`SXXf`VS`>E`V`bWgl`a`fSfSfa`Ua`ALA;>7`/`/#`f`"1#`V`\_`a`WSe`W`XcaSfa`/`/#`fia`a`fSfSfa`/`/#`fz`deg`fSf`ea`a`rapportati`S`bS`[Wf`a`fSfSfz`VSf`ea`a`[\_`VM`[`E7?`žffp`."1"##`V`XXUM`Wey`[XUS`hWde`Vfa`S`bS`[Wf`a`fSfSfz`ALA;>7`al`a`[M`stabil`Ua`h`fS`[\_`S7`SUM`Sfa`ž

I dati sono stati analizzati utilizzando il metodo di quantificazione relativa  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ , e i valori sono stati presentati come fold change relativo al gruppo dei non trattati. La  $\beta$ -actina è stata utilizzata come controllo interno. Le sequenze dei primers sono riportate in Tabella 1.

**Analisi Statistica**

Tutti i valori sono espressi come la media  $\pm$  errore standard della media. L'analisi statistica dei dati dell'espressione genica è stata eseguita utilizzando l'analisi univoca della varianza, seguita da post hoc Bonferroni test. Sono stati considerati significativi valori di *p* inferiori a 0.005.

**Resultati**

I livelli di espressione delle citochine pro- e antinfiammatorie in campioni di prepuzi ottenuti da pazienti affetti da LS trattati o non trattati con creme ad uso topico, 0.1% di mometasone furoato o OZOILE, sono stati ottenuti mediante Real-Time PCR.

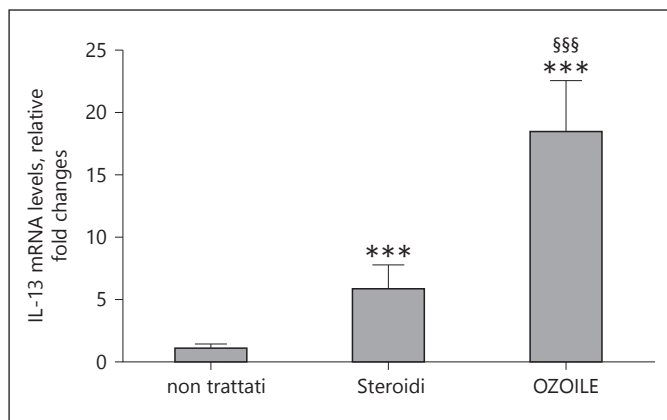
Il trattamento con entrambe le creme ha determinato una riduzione significativa dei livelli di mRNA delle citochine proinfiammatorie rispetto ai tessuti di prepuzio provenienti da pazienti affetti da LS non trattati. I livelli di TNF- $\alpha$  e di IL-1 $\beta$  sono diminuiti di più del 70% nei tessuti trattati sia con 0.1% di mometasone furoato, sia OZOILE rispetto a quelli non trattati (*p* < 0.001; Fig.1). Accanto a ciò, il livello di espressione della citochina antinfiammatoria IL-13 è stato up-regolato dal trattamento topico con steroidi e OZOILE. Sebbene entrambi i trattamenti abbiano determinato un incremento dei livelli di mRNA dell'IL-13, è stato provato che OZOILE crema è risultato più efficace del mometasone furoato. Infatti, la crema cortisonica ha prodotto un incremento di 6 volte, mentre OZOILE ha indotto un incremento di 18 volte dei livelli trascrizionali di IL-13 rispetto a quelli dei tessuti di controllo (Fig.2).

Abbiamo comparato anche gli effetti di entrambe le creme sull'espressione dell'E-Caderina, dimostrando un incremento di quest'ultima nei tessuti provenienti da pazienti trattati rispetto ai tessuti provenienti dai controlli. In particolare, rispetto ai campioni di prepuzio provenienti da pazienti non trattati, i livelli trascrizionali di E-Caderina sono stati incrementati di 4 volte e 9 volte dal trattamento rispettivo con mometasone furoato e OZOILE (*p* < 0.001; Fig. 3).

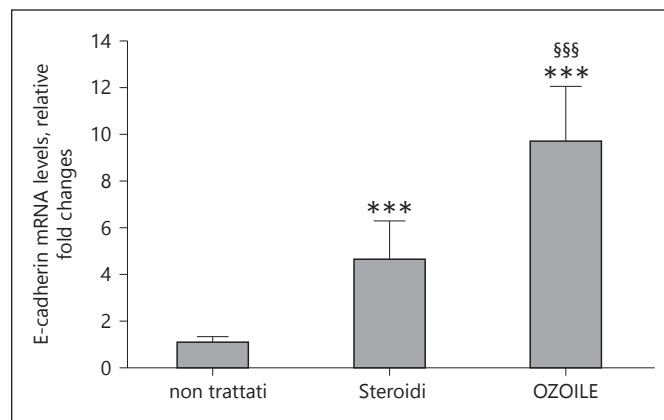
**Discussione**

Il Lichen Sclerosus è considerato una patologia infiammatoria cronica dei genitali maschili. Il primo caso è stato riportato nel 1962 da Caterall e Oates in un bambino di 7 anni[22-24].

Anche se la diagnosi può essere clinica, molti autori sono d'accordo che è utile inviare i prepuzi per l'esame istologico dopo circoncisione.



**Fig. 2.** Cambiamenti nei livelli di mRNA di IL-13 nei tessuti di prepuzio di pazienti con LS con prepuzio non trattato o trattato con creme topiche (0,1% di mometasone furoato o OZOILE). I risultati ottenuti mediante PCR in tempo reale sono rapportati ai pazienti non trattati. I dati sono i mezzi  $\pm$  errore standard della media (SEM). \*\*\*  $p < 0,001$  differenze significative rispetto ai pazienti non trattati; §§§  $p < 0,001$  differenze significative rispetto ai prepuzi dei pazienti trattati con 0,1% di mometasone furoato. OZOILE, ozonidi stabili con vitamina E acetato.



**Fig. 3.** Analisi dei livelli di espressione di E-caderina nei prepuzi di pazienti affetti da LS non trattati o trattati con creme topiche (0,1% di mometasone furoato o OZOILE). I risultati ottenuti dalla PCR in tempo reale sono rapportati ai prepuzi non trattati. I dati sono i mezzi  $\pm$  SEM. \*\*\*  $p < 0,001$  differenze significative rispetto ai pazienti non trattati; §§§  $p < 0,001$  differenze significative rispetto ai prepuzi dei pazienti trattati con 0,1% di mometasone furoato. OZOILE, ozonidi stabili con vitamina E acetato.

Per questo motivo, è raccomandato che venga eseguito un prolungato follow-up di pazienti affetti da LS [25]. Dunque, l'obiettivo del trattamento è l'eliminazione dei segni e sintomi della malattia con conseguente ripristino della funzione urinaria e sessuale per evitare complicanze.

Il trattamento di LS del prepuzio potrebbe essere rappresentato da operazione chirurgica con circoncisione. Questa procedura è considerata il trattamento preferenziale, secondo 10 dei 13 articoli, inclusi i pazienti pediatrici di sesso maschile studiati da Celis e coll.[8]; in aggiunta essi hanno riportato che 5 (50%) dei 10 pazienti che hanno subito circoncisione parziale hanno mostrato una ricaduta.

Trattamento alternativo alla chirurgia è la terapia medica topica. Ad oggi, in letteratura sono riportati pochi studi su larga scala o studi clinici randomizzati di trattamenti del LS. I corticosteroidi topici sono stati utilizzati prima dell'intervento chirurgico [10], al momento dell'operazione e dopo di essa, ed è stato visto che il loro utilizzo può arrestare o ritardare la progressione del LS[26]. The most com-monly used agents include clobetasol propionate and be-tamethasone valerate [2]. Gli agenti principalmente utilizzati per il trattamento includono: clobetasolo propionato e betametasona valerato [27]. È stato riportato che il trattamento con clobetasolo propionato (0.05%) per 2-3 mesi è efficace in più del 90% dei casi [26].

Uno studio clinico randomizzato placebo-controllato ha valutato l'efficacia di mometasone furoato 0.05 unguento nel trattamento di LS del pene in 40 ragazzi dopo 5 settimane di applicazione.

È stato osservato che il mometasone furoato migliora il grado clinico di fimosi in 7 dei 17 ragazzi (41%) dopo 5 settimane di trattamento. Uno studio retrospettivo condotto su 21 uomini con LS del pene ha evidenziato l'efficacia di clobetasolo dipropionato (0.05%) crema dopo 7 settimane di trattamento in circa il 76% dei pazienti [28]. Sono stati analizzati retrospettivamente circa 185 uomini trattati con clobetasolo propionato (0.05%) e di questi il 60% è stato trattato con successo, con una ricaduta in qualcuno ridotta al 50% del tasso di successo; il follow-up medio è stato di 15 mesi [29].

Uno studio della Cochrane del 2011 condotto da Chi e coll. ha revisionato 7 studi clinici randomizzati riguardanti l'efficacia di trattamenti comuni di LS in adulti senza indicazioni terapeutiche per età pediatrica. In particolare uno studio clinico randomizzato esaminante l'efficacia del mometasone furoato unguento 0.05% in 40 ragazzi affetti da LS, ha mostrato un miglioramento clinico nel 40% [30].

Sono state proposte altre formulazioni farmaceutiche. In passato erano stati utilizzati testosterone ad uso topico, diidrotestosterone e progesterone; a questo proposito, Chi e coll. [30] non hanno riscontrato che gli androgeni ad uso topico siano efficaci nel trattamento di uomini e donne; inoltre, questi agenti non possono essere utilizzati nei bambini.

Nel 2008, Ebert e coll. [31] hanno riportato la loro esperienza nel trattamento di LS del pene con tacrolimus 0.1% dopo circoncisione, descrivendo il 9% di ricorrenza, che è stata trattata con successo con lo stesso farmaco.



Kirtschig e coll. [16] nelle loro linee guida basate sull'evidenza riguardanti LS anogenitale hanno riportato l'uso di mometasone e clobetasolo solo negli uomini.

Alcuni autori credono che l'azione terapeutica del clobetasolo propionato nel LS sembra essere esercitata con maggiore probabilità attraverso il ripristino dell'equilibrio della sintesi di collagene da parte dei fibroblasti e/o ripristinando la distorsione della membrana basale mediata da una locale induzione di immunosoppressione e modulazione dell'espressione delle citochine e molecole di superficie richieste per la funzionalità delle cellule immunocompetenti [32, 33].

È noto che il trattamento a lungo termine con corticosteroidi può portare a atrofia della pelle, xerosi, ipopigmentazione, bruciore, irritazione, e raramente soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisario [34]. Inoltre, Dahlman-Ghozla e coll. [28] hanno riportato la loro esperienza nel trattamento di LS del pene, con clobetasolo propionato affermando che questa terapia è sicura ed efficace nonostante il potenziale innesco di infezioni latenti, tra le più importanti il papillomavirus umano. In aggiunta, in letteratura, è stato descritto il fenomeno noto come "fobia da cortisonici"; questa condizione rappresenta la principale causa di ansia e barriera all'effettiva collaborazione dei pazienti, determinando problemi per i dermatologi e pediatri nel trattare i bambini con terapia cortisonica [35].

Nel nostro studio precedente, abbiamo dimostrato che l'utilizzo preoperatorio di OZOILE, ha un effetto favorevole nei pazienti in fase di circoncisione, inducendo una riduzione significativa dello stato infiammatorio rispetto ai pazienti affetti da LS del prepuzio non sottoposti a terapia [21].

Sono stati studiati gli effetti dell'ozono in termini di capacità ossidante e proprietà disinfettante e sanificante [36]. Gli Ozonidi sono una classe di composti chimici, in cui l'ozono viene stabilizzato dalla reazione con gli acidi grassi insaturi dell'olio. Essi possono rappresentare un'alternativa alla terapia farmacologica e vengono utilizzati sotto forma di formulazione ad uso topico con proprietà germicide [36, 37]. In particolare, a contatto con la pelle e le mucose, l'olio ozonizzato, in ambiente caratterizzato da un incremento protonico, come nel caso di ischemia, ipossia o danno tissutale, rilascia ossigeno molecolare, che guida la produzione di specie radicaliche con conseguente moderato stress ossidativo. Questi effetti promuovono la liberazione di fattori di crescita, attivazione locale dei meccanismi antiossidanti e riparazione del danno tissutale [36, 37]. Patel e coll. [38] hanno mostrato gli effetti terapeutici dell'olio ozonizzato su tessuto epiteliale. In aggiunta questi composti non sono stati ritenuti tossici ed inoltre hanno esercitato effetti antinfiammatori [38].

In questo studio abbiamo comparato gli effetti di OZOILE versus corticosteroidi (0.1% mometasone furoato) nel trattamento preoperatorio di bambini affetti da LS del prepuzio. I nostri risultati hanno dimostrato che il trattamento dei prepuzi affetti da LS con OZOILE per 7 giorni mostra un'efficacia simile al trattamento steroideo in termini di riduzione dello stato infiammatorio, come dimostrato dalla ridotta espressione dei livelli di mRNA di TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e l'aumentata espressione di IL-13 nei prepuzi trattati. In particolare, il trattamento a base di OZOILE è risultato più efficace rispetto alla crema cortisonica nell'induzione dell'upregolazione dell'IL-13. Questo è un risultato rilevante considerando il ruolo svolto dall'IL-13 nella salute della PELLE. L'IL-13 è una citochina immunoregolatoria, prodotta da diversi citotipi, come le cellule Th2 attivate, mastociti, cellule NK, ed è stato dimostrato che inibisce la produzione di citochine proinfiammatorie e chemochine [39]. Inoltre, l'IL-13 viene prodotta dai linfociti intraepiteliali, dalle cellule T specializzate tessuto-resistenti, e sembra che contribuisca al mantenimento della salute epiteliale promuovendo l'integrità della barriera epidermica [40]. Questi effetti sono associati all'abilità dell'IL-13 di controllare la differenziazione e la maturazione dei cheratinociti necessari per ripristinare l'epitelio.

Sulla base dei nostri risultati precedenti, che hanno dimostrato la proprietà di OZOILE di indurre l'espressione dell'E-Caderina [20], nello studio presente, abbiamo inoltre comparato gli effetti del mometasone furoato e OZOILE nell'espressione dell'E-Caderina. L'E-Caderina è una proteina di adesione transmembrana appartenente alla famiglia delle caderine, implicata nell'adesione cellula-cellula dell'epitelio squamoso stratificato [41] ed espressa inoltre nei tessuti epiteliali [42].

I nostri risultati hanno dimostrato un incremento significativo dell'E-Caderina in prepuzi di pazienti trattati con corticosteroidi e OZOILE confrontati con quelli di controllo. Tuttavia l'up regolazione dell'E-Caderina indotta da OZOILE, è stata superiore rispetto a quella indotta dal trattamento con mometasone furoato.

Nel nostro studio abbiamo ipotizzato che il trattamento preoperatorio con OZOILE e 0.1% di mometasone furoato crema avessero effetti simili e favorevoli alla riduzione dello stato infiammatorio di prepuzi affetti da balanite xerotica obliterante. In aggiunta, il trattamento con OZOILE potrebbe essere efficace nel miglioramento della struttura e integrità della pelle.

In conclusione, ottenuti i dati del nostro studio sui cambiamenti biochimici in prepuzi stretti, potrebbe essere interessante verificare l'attuale effetto clinico di OZOILE come trattamento alternativo agli steroidi in bambini affetti da LS del prepuzio. Inoltre, incoraggiati dai nostri studi precedenti sui livelli molecolari, pensiamo che sia necessario uno studio clinico randomizzato, su un gran numero di bambini, verificante gli effetti reali del trattamento topico

preoperatorio ma soprattutto postoperatorio con OZOILE, per poterlo introdurre nei protocolli terapeutici.

## Scheda etica

Il protocollo di studio è stato approvato dal Comitato Etico del nostro ospedale e tutte le procedure messe in pratica nel nostro studio sono state in accordo con gli standard etici e con la dichiarazione di Helsinki del 1964 e le sue successive modifiche o standard etici di confronto. Il consenso informato e l'autorizzazione all'utilizzo dei dati sensibili sono stati ottenuti dai genitori di tutti i soggetti al loro ricovero.

## References

- Hallopeau H. Du lichen plan et particulièrement de sa forme atrophique: lichen plan scléreux. *Ann Dermatol Syphiligr (Paris)*. 1887;8:790-1.
- Bercaw-Pratt JL, Boardman LA, Simms-Cendan JS; North American Society for Pediatric and Adolescent Gynecology. Clinical recommendation: pediatric lichen sclerosis. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2014 Apr;27(2):111-6.
- Powell J, Wojnarowska F. Childhood vulvar lichen sclerosis: an increasingly common problem. *J Am Acad Dermatol*. 2001 May;44(5):803-6.
- Powell JJ, Wojnarowska F. Lichen sclerosis. *Lancet*. 1999 May;353(9166):1777-83.
- Kiss A, Király L, Kutasy B, Merksz M. High incidence of balanitis xerotica obliterans in boys with phimosis: prospective 10-year study. *Pediatr Dermatol*. 2005 Jul-Aug;22(4):305-8.
- Christman MS, Chen JT, Holmes NM. Obstructive complications of lichen sclerosis. *J Pediatr Urol*. 2009 Jun;5(3):165-9.
- Stühmer A. Balanitis xerotica obliterans (post-operationem) und ihre Beziehungen zur "Kraurosis glandis et praeputii penis". *Arch Dermatol Syph*. 1928;156(3):613-23.
- Celis S, Reed F, Murphy F, Adams S, Gillick J, Abdelhafeez AH, et al. Balanitis xerotica obliterans in children and adolescents: a literature review and clinical series. *J Pediatr Urol*. 2014 Feb;10(1):34-9.
- Neill SM, Lewis FM, Tatnall FM, Cox NH; British Association of Dermatologists. British Association of Dermatologists' guidelines for the management of lichen sclerosis 2010. *Br J Dermatol*. 2010 Oct;163(4):672-82.
- Becker K, Meissner V, Farwick W, Bauer R, Gaiser MR. Lichen sclerosis and atopy in boys: coincidence or correlation? *Br J Dermatol*. 2013 Feb;168(2):362-6.
- Jacobs L, Gilliam A, Khavari N, Bass D. Association between lichen sclerosis and celiac disease: a report of three pediatric cases. *Pediatr Dermatol*. 2014 Nov-Dec;31(6):e128-31.
- Guarneri F, Giuffrida R, Di Bari F, Cannavò SP, Benvenga S. Thyroid Autoimmunity and Lichen. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017 Jun;8:146.
- Homer L, Buchanan KJ, Nasr B, Losty PD, Corbett HJ. Meatal stenosis in boys following circumcision for lichen sclerosis (balanitis xerotica obliterans). *J Urol*. 2014 Dec;192(6):1784-8.
- Potts BA, Belsante MJ, Peterson AC. Intraurethral Steroids are a Safe and Effective Treatment for Stricture Disease in Patients with Biopsy Proven Lichen Sclerosis. *J Urol*. 2016 Jun;195(6):1790-6.
- Tong LX, Sun GS, Teng JM. Pediatric Lichen Sclerosis: A Review of the Epidemiology and Treatment Options. *Pediatr Dermatol*. 2015 Sep-Oct;32(5):593-9.
- Kirtschig G, Becker K, Gunthert A, Jasaitiene D, Cooper S, Chi CC, et al. Evidence-based (S3) Guideline on (anogenital) Lichen sclerosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015 Oct;29(10):e1-43.
- Smith YR, Quint EH. Clobetasol propionate in the treatment of premenarchal vulvar lichen sclerosis. *Obstet Gynecol*. 2001 Oct;98(4):588-91.
- Virgili A, Minghetti S, Borghi A, Corazza M. Long-term maintenance therapy for vulvar lichen sclerosis: the results of a randomized study comparing topical vitamin E with an emollient. *Eur J Dermatol*. 2013 Apr;23(2):189-94.
- Borghi A, Corazza M, Minghetti S, Toni G, Virgili A. Avocado and soybean extracts as active principles in the treatment of mild-to-moderate vulvar lichen sclerosis: results of efficacy and tolerability. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015 Jun;29(6):1225-30.
- Currò M, Russo T, Ferlazzo N, Caccamo D, Antonuccio P, Arena S, et al. Anti-Inflammatory and Tissue Regenerative Effects of Topical Treatment with Ozonated Olive Oil/Vitamin E Acetate in Balanitis Xerotica Obliterans. *Molecules*. 2018 Mar;23(3):E645.
- Catterall RD, Oates JK. Treatment of balanitis xerotica obliterans with hydrocortisone injections. *Br J Vener Dis*. 1962 Jun;38(2):75-7.
- Pugliese JM, Morey AF, Peterson AC. Lichen sclerosis: review of the literature and current recommendations for management. *J Urol*. 2007 Dec;178(6):2268-76.
- Bochove-Overgaauw DM, Gelders W, De Vylder AM. Routine biopsies in pediatric circumcision: (non) sense? *J Pediatr Urol*. 2009 Jun;5(3):178-80.
- Naji H, Jawad E, Ahmed HA, Mustafa R. Histopathological examination of the prepuce after circumcision: is it a waste of resources? *Afr J Paediatr Surg*. 2013 Apr-Jun;10(2):164-6.
- Pradhan A, Patel R, Said AJ, Upadhyaya M. 10 Years' Experience in Balanitis Xerotica Obliterans: A Single-Institution Study. *Eur J Pediatr Surg*. 2018, Epub ahead of print.
- Kiss A, Csontai A, Pirót L, Nyírády P, Merksz M, Király L. The response of balanitis xerotica obliterans to local steroid application compared with placebo in children. *J Urol*. 2001 Jan;165(1):219-20.
- Poindexter G, Morrell DS. Anogenital pruritus: lichen sclerosis in children. *Pediatr Ann*. 2007 Dec;36(12):785-91.
- Dahlman-Ghozlan K, Hedblad MA, von Krogh G. Penile lichen sclerosis et atrophicus treated with clobetasol dipropionate 0.05% cream: a retrospective clinical and histopathological study [Level V]. *J Am Acad Dermatol*. 1999 Mar;40(3):451-7.
- Edmonds E, Barton G, Buisson S, Francis N, Gotch F, Game L, et al. Gene expression profiling in male genital lichen sclerosis. *Int J Exp Pathol*. 2011 Oct;92(5):320-5.
- 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 sclerosis. *J Am Acad Dermatol*. 2012 Aug;67(2):305-12.

## Dichiarazione di divulgazione

Gli autori dichiarano di non avere conflitti di interesse da dichiarare.

## Contributo degli autori

C.R. and R.I. conceived the study; D.C. and P.I. designed the experiments; M.C. and N.F. performed the experiments; P.P., E.A., and T.R. collected the samples and clinical data; P.A. and S.A. analyzed the data; M.C. and T.R. wrote the manuscript; D.C. and P.I. provided suggestion and revised the manuscript.

- 31 Ebert AK, Rösch WH, Vogt T. Safety and tolerability of adjuvant topical tacrolimus treatment in boys with lichen sclerosis: a prospective phase 2 study. *Eur Urol*. 2008 Oct;54(4):932–7.
- 32 Marren P, Dean D, Charnock M, Wojnarowska F. The basement membrane zone in lichen sclerosis: an immunohistochemical study. *Br J Dermatol*. 1997 Apr;136(4):508–14.
- 33 Oikarinen A, Sandberg M, Hurskainen T, Kinnunen T, Kallioinen M. Collagen biosynthesis in lichen sclerosis et atrophicus studied by biochemical and in situ hybridization techniques. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*. 1991;162:3–12.
- 34 Coureau B, Bussièrès JF, Tremblay S. Cushing's syndrome induced by misuse of moderate- to high-potency topical corticosteroids. *Ann Pharmacother*. 2008 Dec;42(12):1903–7.
- 35 Smith SD, Hong E, Fearn S, Blaszczyński A, Fischer G. Corticosteroid phobia and other confounders in the treatment of childhood atopic dermatitis explored using parent focus groups. *Australas J Dermatol*. 2010 Aug; 51(3):168–74.
- 36 Travagli V, Zanardi I, Bocci V. Topical applications of ozone and ozonated oils as anti-infective agents: an insight into the patent claims. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*. 2009 Jun;4(2):130–42.
- 37 Sechi LA, Lezcano I, Nunez N, Espim M, Duprè I, Pinna A, et al. Antibacterial activity of ozonized sunflower oil (Oleozon). *J Appl Microbiol*. 2001 Feb;90(2):279–84.
- 38 Patel PV, Kumar V, Kumar S, Gd V, Patel A. Therapeutic effect of topical ozonated oil on the epithelial healing of palatal wound sites: a planimetric and cytological study. *J Investig Clin Dent*. 2011 Nov;2(4):248–58.
- 39 Wynn TA. IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol*. 2003;21(1):425–56.
- 40 Dalessandri T, Crawford G, Hayes M, Castro Seoane R, Strid J. IL-13 from intraepithelial lymphocytes regulates tissue homeostasis and protects against carcinogenesis in the skin. *Nat Commun*. 2016 Jun;7(1):12080.
- 41 Gooding JM, Yap KL, Ikura M. The cadherin-catenin complex as a focal point of cell adhesion and signalling: new insights from three-dimensional structures. *BioEssays*. 2004 May; 26(5):497–511.
- 42 Neppelberg E, Loro LL, Oijordsbakken G, Johannessen AC. Altered CD40 and E-cadherin expression—putative role in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med*. 2007 Mar;36(3):153–60.