

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II**



**DOTTORATO DI RICERCA IN**  
**MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE**  
*CURRICULUM IN SCIENZE MEDICHE TRASLAZIONALI*

**XXXIII Ciclo**  
*(Anni 2018-2021)*

**Coordinatore: Prof. Francesco Beguinot**

**TESI DI DOTTORATO**

**TITOLO**

*NUOVI BIOMARKERS PREDITTIVI NELL'IDROSADENITE  
SUPPURATIVA: DALLA PROFILAZIONE METABOLICA ALLA  
STRATIFICAZIONE PROGNOSTICA*

TUTOR/RELATORE

**Chiar.ma**  
**Prof.ssa Gabriella Fabbrocini**

CANDIDATA

**Dott.ssa Sara Cacciapuoti**

# INDICE

## 1. INTRODUZIONE

1.1 GENERALITÀ SULL'IDROSADENITE SUPPURATIVA

1.2 IL RUOLO DEI DISORDINI METABOLICI NELL'IDROSADENITE SUPPURATIVA

1.3. BIOMARKERS METABOLICI NELL'IDROSADENITE SUPPURATIVA

1.4 TNF- $\alpha$  NELL' IDROSADENITE SUPPURATIVA

## 2. OBIETTIVI DELLO STUDIO

## 3. MATERIALI E METODI

3.1 ARRUOLAMENTO DEI PAZIENTI

3.2 STUDIO *IN VIVO*

3.3 STUDIO *EX VIVO*

## 4. RISULTATI

4.1 CARATTERIZZAZIONE CLINICA DEI PAZIENTI

4.2 STUDIO *IN VIVO*

4.3 STUDIO *EX VIVO*

## 5. DISCUSSIONE

## **1.INTRODUZIONE**

### **1.1 GENERALITÀ SULL'IDROSADENITE SUPPURATIVA**

#### *Definizione ed Epidemiologia*

L'idrosadenite suppurativa (IS) è una dermatosi infiammatoria cronica ad elevato impatto sulla qualità di vita dei pazienti affetti, alla cui patogenesi concorrono numerosi fattori esogeni che si sovrappongono ad un substrato genetico predisponente, modificando significativamente sia la gravità delle manifestazioni che la loro responsività alle diverse terapie (1-4). Lesioni nodulari, spesso tendenti all'ascessualizzazione con associata formazione di fistole, si localizzano in sedi come quella inguino-crurale, ascellare, alla piega sottomammaria e in zona perineale.

Inizialmente considerata una malattia rara, L'IS ha in realtà una prevalenza maggiore rispetto ai tassi stimati, che variano tra l'1% e il 4 % (5), essendo spesso misdiagnosticata con un conseguente ritardo medio nella diagnosi di circa 7 anni dalla comparsa delle prime lesioni (6). Si manifesta quasi sempre dopo la pubertà, di solito nella seconda decade di vita, con picco di insorgenza intorno ai 20 anni e netta prevalenza nel sesso femminile, con un rapporto di sesso di 3:1(5).

#### *Storia della malattia*

Letteralmente "hidradenitis suppurativa" significa infiammazione delle ghiandole sudoripare (dal greco ἰδρώς: sudore e ἀδήν: ghiandola). L'IS fu descritta per la prima volta nel 1839 dal chirurgo francese Velpeau. Nel 1854 il chirurgo francese Verneuil attribuì la causa degli accessi recidivanti della malattia all'infiammazione delle ghiandole sudoripare apocrine, da cui il nome di malattia di Verneuil (7). Anche il filosofo Karl Marx era affetto da IS. Dalla analisi

del suo carteggio si evidenzia come questa patologia inficiasse profondamente il benessere non solo fisico, ma anche psicologico del filosofo (8). Nel 1955, Shelley e Cahn ostruirono sperimentalmente le ghiandole sudoripare del cavo ascellare, assistendo allo sviluppo di lesioni simili a quelle dell'IS, deducendo che l'ostruzione delle ghiandole sudoripare fosse il principale evento patogenetico. Nel 1989 i dermatologi Plewig e Steger introdussero la definizione di acne inversa (9). L'ipercheratosi infundibolare del follicolo terminale venne considerata come il *primum movens* nella patogenesi di questa condizione, proprio come lo è l'ipercheratosi infundibolare dell'unità pilo-sebacea nell'acne: ne derivò la definizione, poi andata in disuso, di acne inversa (10). Nel 1990 Yu e Cook dimostrarono che l'infiammazione delle ghiandole apocrine era presente solo in una piccola percentuale di casi e che la peculiarità delle aree lesionali era, invece, l'occlusione del follicolo pilifero (11). Nel corso dei decenni successivi il complesso puzzle patogenetico della IS si è andato via via definendo e questa patologia è divenuta oggetto di particolare attenzione nella comunità scientifica dermatologica, dimostrando numerose similitudini, particolarmente in termini di comorbidità dismetaboliche, articolari e autoimmuni con altre dermatosi infiammatorie croniche ben più studiate e conosciute, prima tra tutte la psoriasi.

### ***Clinica***

La diagnosi di IS si basa su parametri clinici e può essere esemplificata mediante i seguenti 3 criteri: 1) presenza delle lesioni tipiche: noduli profondi e dolorosi, e/o ascessi, e/o fistole drenanti, e/o cicatrici a ponte; 2) tipica topografia, con importante interessamento di ascelle e inguine; 3) decorso cronico-ricidivante (12,13).



**Figura 1.** Noduli ascessualizzati, fistole e concomitanti cicatrici a ponte in sede ascellare in pazienti affetti da IS.

Le prime lesioni sono in genere dei noduli dolorosi, spesso solitari, tanto da rendere difficile nelle fasi iniziali la diagnosi differenziale con la foruncolosi. Sono frequenti anche i cosiddetti comedoni ‘tombstone’. I noduli possono trasformarsi in ascessi ed eventualmente aprirsi all'esterno drenando materiale purulento. Tutto ciò può condurre alla formazione di fistole, con liberazione continua di contenuto purulento e sieroso (14). La guarigione avviene mediante processi di fibrosi che determinano la formazione di vere e proprie bande lineari, provocando una significativa limitazione funzionale delle zone anatomiche coinvolte (**Figura 1**).

Al fine di standardizzare la valutazione clinica della gravità dell'IS sono state proposte varie classificazioni. La prima proposta nel 1989 da Hurley (15) distingue 3 gradi di gravità della malattia:

*1° grado:* uno o più ascessi senza fistole e cicatrizzazione.

*2° grado:* uno o più ascessi separati da tratti sinusali e cicatrici.

*3° grado:* multipli tratti interconnessi e ascessi nell'intera area interessata.

Il limite di questa classificazione consiste principalmente nella difficoltà di quantificare la gravità della patologia, nel definirne la prognosi e nel monitorarne la risposta alla terapia. Uno

score utilizzato che supera alcuni di questi limiti è quello proposto da Sartorius che ha il merito di essere più dettagliato e dinamico rispetto a quello di Hurley (16).

Il punteggio del Sartorius Score è il risultato della sommatoria delle seguenti varianti:

1. Regioni anatomiche coinvolte: ascella, inguine, regione glutea o piega sottomammaria della regione destra e sinistra, attribuendo 3 punti per regione interessata.
2. Numero e punteggio per lesione. Per ogni regione coinvolta si attribuisce un punteggio per tipo di lesione: 2 punti per i noduli, 4 per le fistole, 1 per le cicatrici e 1 per altro tipo di lesione.
3. Massima distanza esistente tra due lesioni rilevanti, ad esempio tra noduli e fistole, in ogni regione, o se singoli in base alla dimensione della lesione (< 5 cm, 2 punti; < 10 cm, 4 punti; > 10 cm, 8 punti).
4. Le lesioni sono chiaramente separate dalla cute normale? Se sì, si attribuisce un punteggio di 0, altrimenti di 6; il calcolo va effettuato per ogni area interessata.

Più di recente (17) è stato proposto un sistema di valutazione clinica denominato International Hidradenitis Suppurativa Severity Score System (IHS4). Il punteggio IHS4 è ottenuto dal numero di noduli (moltiplicato per 1) più il numero di ascessi (moltiplicato per 2) più il numero di tunnel drenanti (moltiplicato per 4). Un punteggio totale di 3 o meno significa lieve, 4-10 significa moderato e 11 o superiore indica una malattia grave. Il nuovo IHS4 è uno strumento utile per valutare dinamicamente la gravità dell'HS e può essere utilizzato agevolmente sia nella real life che negli studi clinici.

Il decorso della malattia è variabile e tendente ad una progressione con esacerbazioni e remissioni. Le lesioni dell'IS impattano enormemente sulla qualità di vita dei pazienti affetti, essendo dolorose, maleodoranti, impedendo spesso al paziente lo svolgimento delle normali attività quotidiane, isolandolo e spesso conducendolo alla depressione (18-20).

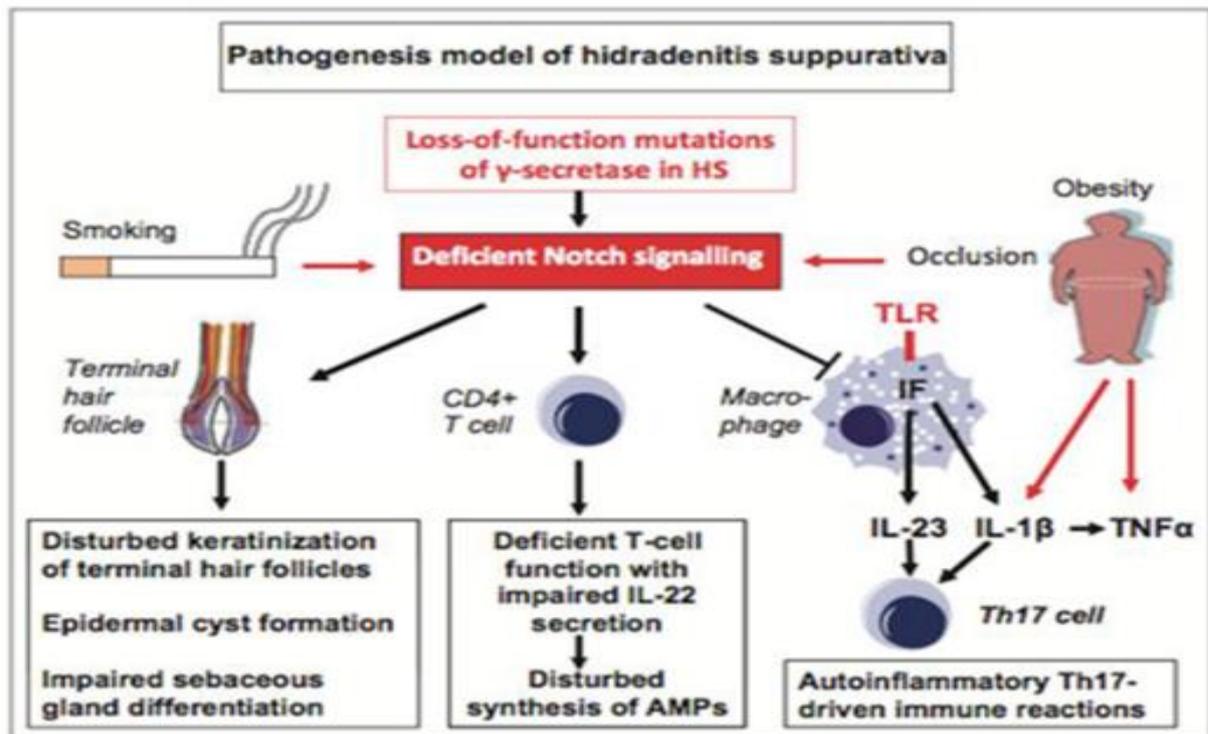
### *Meccanismi patogenetici*

Secondo l'ipotesi proposta da van derZee (21) la patogenesi dell'IS è imputabile a fattori ambientali in un individuo geneticamente suscettibile.

La predisposizione genetica è considerata un importante fattore di rischio nello sviluppo della patologia e i pazienti con malattia di grado più elevato sono coloro che presentano familiarità per IS (22). Sono state riportate mutazioni nel gene NCSTN (1q22-23) in alcune famiglie cinesi. NCSTN codifica per la Nicastrina, subunità del complesso delle  $\gamma$ -secretasi. Queste ultime sono delle proteasi transmembrana formate da 4 subunità proteiche che mediano il clivaggio di vari tipi di proteine di membrana tra cui Notch36 e la proteina precursore dell'amiloide. La perdita di funzione di Notch dovuta a mutazioni a carico della  $\gamma$ -secretasi potrebbe avere un ruolo chiave nelle forme familiari e non di IS portando ad un'anomala cheratinizzazione. È stato dimostrato in modelli animali che mutazioni inattivanti di questa proteina inducono la formazione di cisti epidermiche e carcinomi squamocellulari o carcinomi basocellulari (22-24).

La loss of function della  $\gamma$ -secretasi e la conseguente disfunzione del signalling di Notch costituiscono un substrato predisponente sul quale diversi altri fattori ambientali (e pertanto modificabili) come il fumo e l'obesità vanno ad agire, scatenando una cascata di eventi a valle che hanno come principale conseguenza una alterazione della risposta immunitaria. Una produzione cheratinocitaria aberrante di citochine proinfiammatorie determinerebbe, infatti, l'afflusso di linfociti T e mastociti che a loro volta promuoverebbero la liberazione di diverse citochine tra cui TNF- $\alpha$  e IL-1b determinando a livello cutaneo iperplasia psoriasiforme (25), ipercheratinizzazione ed occlusione follicolare. Campioni istologici provenienti da pazienti con IS mostrano occlusione del follicolo pilifero, formazione di cisti e iperplasia psoriasiforme epidermica, il tutto associato ad un infiltrato infiammatorio costituito da diversi tipi di cellule: neutrofili, macrofagi, cellule giganti multinucleate e linfociti B e T (26). Come

schematicamente illustrato nella **Figura 2**, fattori ambientali quali fumo, obesità, ormoni e attrito meccanico amplificano questo processo, innescando un loop in grado di autoalimentarsi.



**Figura 2.** Il ruolo di Notch nello sviluppo dell'IS (27).

L'occlusione del follicolo pilifero può evolvere fino alla formazione di una vera e propria cisti che può andare incontro a rottura spontanea, provocando la manifestazione clinica di noduli e ascessi infiammatori. Il contenuto della cisti, costituito da fibre di cheratina frammiste a batteri, è liberato nel derma determinando un notevole afflusso di istiociti e cellule giganti multinucleate.

Diversi autori hanno evidenziato come nella patogenesi dell'IS il sistema immunitario giochi un ruolo cruciale mediato da diversi meccanismi. L'IS è associata, ad esempio, ad un'up-

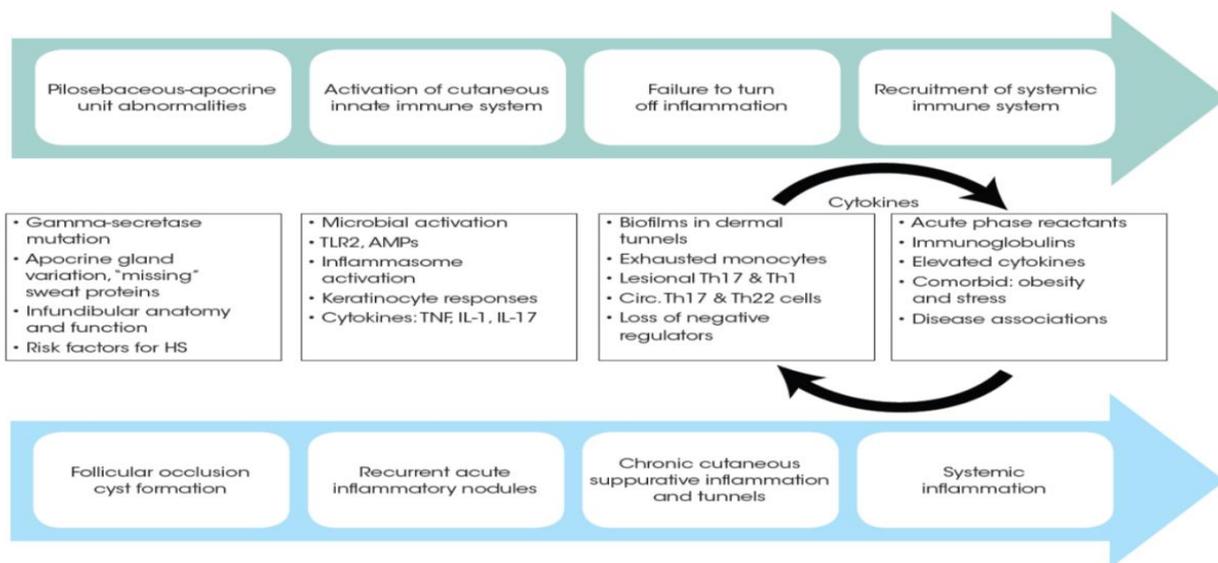
regulation dei toll-like receptors. In particolare, è stata osservata un'elevata espressione del Toll-like receptor 2 (TLR-2) nei macrofagi e nelle cellule dendritiche del derma. È noto che il TLR-2 ha un ruolo cruciale nella risposta immunitaria e la sua aumentata espressione può avere un ruolo importante nella patogenesi dell'IS (28). Inoltre, nelle aree lesionali di pazienti affetti si è riscontrata un'incrementata presenza di neutrofili che determinano una notevole liberazione di radicali dell'ossigeno (29). Su cute lesionale di soggetti affetti è stato osservato un netto incremento di citochine pro-infiammatorie come IL-1 $\beta$ , IL-10 e di TNF- $\alpha$ . Livelli elevati di TNF- $\alpha$  sono stati in particolare riscontrati in pazienti con uno stadio II e III stadio di Hurley (30,31). Il ruolo di questa citochina nella patogenesi dell'IS ha anche importanti implicazioni metaboliche e sarà discusso nel dettaglio più avanti. I macrofagi delle aree lesionali e di pazienti con IS esprimono abbondantemente IL-12 e IL-23, portando alla formazione di IL-17 e all'infiltrazione di linfociti T-Helper (32). È stato anche ipotizzato un ruolo chiave dell'inflammosoma NLRP3 (NOD-like receptor family pyrin domain containing 3) attivato dalle fibre di cheratina. Questo inflammosoma genera la citochina infiammatoria IL-1 $\beta$  dal clivaggio dell'IL-1. Anche il ruolo di alcuni fattori ambientali come il fumo di sigaretta nell'IS (33,34) è da ricondurre alla capacità di quest'ultimo di incidere significativamente sulla liberazione di alcuni mediatori infiammatori. Il fumo di sigaretta, infatti, contiene più di 4500 elementi che possono promuovere il reclutamento dei polimorfonucleati, l'espressione di IL-8 e di TNF- $\alpha$  da parte dei cheratinociti (25-37) mentre la nicotina promuove l'iperplasia dell'infundibolo, l'occlusione del follicolo e stimola la crescita dello *S. aureus* (38), eventi che a loro volta sono in grado di agire da trigger infiammatori. La risposta infiammatoria è, infatti, incrementata dalla liberazione di molecole rilasciate dalla distruzione tissutale e secondariamente della sovrainfezione batterica.

La stessa risposta del sistema immunitario alla sovrainfezione batterica sembra essere alterata nei pazienti affetti da IS. Gli AMP (peptidi antimicrobici) rivestono un ruolo importante

nell'immunità innata ed è stato dimostrato che i livelli di questi peptidi nelle aree lesionali è ridotto. È noto che l'espressione dell'AMP è regolata da IL-22 e IL-20. Si è visto che i livelli di IL-22 e IL-20, come dei recettori IL-22R1, IL-20R1, IL-20R2 e IL-22BP, sono ridotti nei pazienti con IS rispetto a quelli con psoriasi e dermatite atopica (39). La riduzione di IL-20 e IL-22 e la conseguente ridotta espressione di 17 peptidi antimicrobici permetterebbe la persistenza dei batteri nelle lesioni favorendo uno stato infiammatorio cronico (40).

In quest'ottica, in un recente lavoro del nostro gruppo di ricerca è stato indagato il ruolo dell'IL-26, una citochina prodotta dai linfociti Th17 helper, dalle note proprietà antimicrobiche e proinfiammatorie. Nonostante i livelli di questa citochina siano risultati significativamente più elevati nei pazienti affetti da IS, la sua attività antimicrobica si è dimostrata inefficace suggerendo come un deficit qualitativo dell'IL-26 potrebbe essere uno dei meccanismi che predispongono questi pazienti ad una risposta antimicrobica inefficace e alle infezioni cutanee ricorrenti. (41).

In conclusione, l'IS è una patologia complessa a patogenesi multifattoriale in cui numerosi fattori esogeni legati a stili di vita e/o esposizione a fattori in grado di agire da trigger si sovrappongono a un substrato genetico predisponente, alimentando una risposta aberrante del sistema immunitario in grado a sua volta di autoalimentarsi in un loop che, una volta innescato, è molto difficile da arrestare (**Figura 3**).



**Figura 3.** Descrizione schematica della complessa interazione tra fattori endogeni ed esogeni implicati nella patogenesi dell'IS (42).

### *Opzioni terapeutiche*

La terapia dell'IS è difficilmente risolutiva, determinando più che altro la remissione della malattia per periodi di tempo variabili e spesso non prevedibili sulla base delle caratteristiche cliniche del paziente. Il trattamento dell'IS si avvale spesso di cicli terapeutici con associazioni antibiotiche a base di clindamicina-rifampicina o combinazioni di rifampicina-moxifloxacina-metronidazolo (43-45). L'isotretinoina può dare dei miglioramenti parziali, ma non paragonabili agli eccellenti risultati che dà nel trattamento nell'acne. È stata proposta una monoterapia a base di acitretina orale a lungo termine, che si è dimostrata efficace in alcune casistiche, seppur con limitata numerosità campionaria (46). La terapia a base di dapsone è stata valutata in uno studio retrospettivo con 24 pazienti. Il miglioramento è stato osservato nel 38% dei pazienti. Tuttavia, sono frequenti gli eventi avversi e la riattivazione della patologia al termine del trattamento (47). Anche laser terapia, terapia fotodinamica (PDT) con acido 5-aminolevulinico e laser Nd: YAG (1064 nm) sono stati utilizzati per il trattamento dell'IS (48-49). Sebbene laser e luce sembrano essere efficaci nel controllare l'IS, sono caratterizzati da

tempi di risposta alquanto lunghi e scarsa efficacia nelle forme gravi della malattia. Queste terapie sono, pertanto, indicate nei pazienti con malattia lieve-moderata ed in associazione ad altri presidi terapeutici. La chirurgia è il trattamento riservato alle forme più gravi e debilitanti dove i presidi farmacologici si dimostrano insufficienti (50-51).

Negli ultimi anni l'attenzione è stata rivolta alla terapia a base di inibitori del TNF-  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$  I) come infliximab, adalimumab, etanercept, che sono stati utilizzati con successo nel trattamento di gravi forme di IS. In una metanalisi di 65 studi che hanno incluso 459 pazienti è stata osservata una risposta da buona/moderata nell'82% dei pazienti trattati con infliximab, nel 76% trattati con adalimumab e nel 68% dei pazienti trattati con etanercept (52). Più recentemente ustekinumab, un anticorpo monoclonale umano che si lega alla subunità p40 di IL-12 e IL-23, è stato utilizzato con successo in tre pazienti con IS, di cui uno ha raggiunto una remissione completa dopo 6 mesi (53). Attualmente l'adalimumab è l'unico farmaco approvato per l'utilizzo label in pazienti con forme gravi di IS resistenti alle terapie convenzionali.

## **1.2 IL RUOLO DEI DISORDINI METABOLICI NELL'IDROSADENITE SUPPURATIVA**

Le potenziali funzioni di "sentinella biologica" della cute hanno destato particolare interesse nella comunità scientifica, trattandosi di un organo in grado di agire sia da regolatore che da bersaglio metabolico e ormonale, rivelando lo stato di salute degli organi interni nonché la presenza di anomalie metaboliche, seppur incipienti. È nota, ad esempio, la stretta correlazione esistente tra psoriasi e sindrome metabolica, alimentata da un complesso cross-talk tra citochine proinfiammatorie e adipochine coinvolte in pathways comuni ad entrambe queste patologie (54). Più recentemente, anomalie metaboliche favorite da abitudini alimentari tipiche della

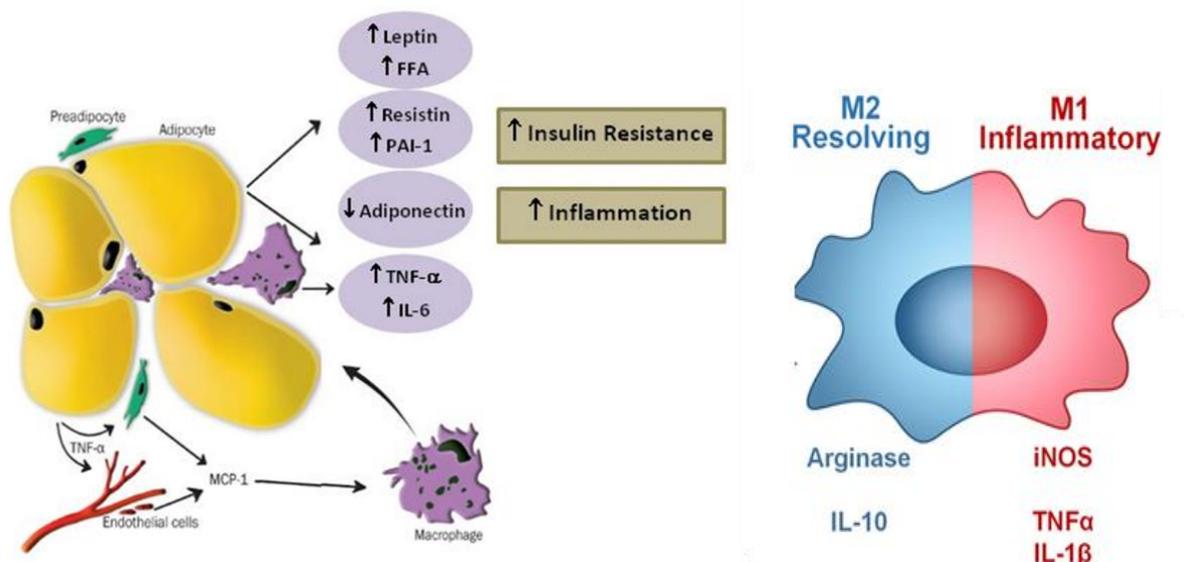
“Western diet”, quali il diabete e l’insulino-resistenza, sono state correlate a dermatosi infiammatorie croniche a tipica insorgenza giovanile come l’IS. La dieta occidentale è caratterizzata da un consistente introito di cibi ad elevato indice glicemico, nonché di proteine animali, particolarmente quelle di derivazione casearia. Entrambe queste caratteristiche favoriscono l’attivazione di eventi trasduzionali in grado di modificare alcune attività cellulari, come la proliferazione e la differenziazione, coinvolte nella patogenesi di diverse patologie tra cui l’IS. Non a caso, la correzione del regime alimentare, con particolare attenzione all’introito di zuccheri, viene considerata un valido supporto alla terapia farmacologica (55-58). Come altre dermatosi infiammatorie croniche, l’IS sembra, infatti, condividere pathways citochinici coinvolti in disordini metabolici come il diabete, l’insulinoresistenza e l’obesità (55-58).

A proposito di obesità, numerose evidenze confermano come l’IS sia associata con un body mass index (BMI) elevato e come esista una correlazione diretta tra BMI e severità della malattia. Un’indagine condotta su 383 pazienti ha studiato i sintomi associati ad IS prima e dopo interventi di chirurgia bariatrica. Si è riscontrata una prevalenza del 18.1% di IS prima della malattia e una riduzione del 35% dei sintomi associati e dei siti coinvolti dopo l’intervento ( $p=0.003$ ). È stato anche dimostrato che la prevalenza di IS è maggiore nei pazienti obesi che nel resto della popolazione e che una perdita di peso maggiore del 15% è associata con un’importante riduzione della severità della malattia (59).

Ulteriori studi riportano casi di pazienti affetti da forme di IS refrattarie al trattamento farmacologico che hanno mostrato un rapido miglioramento in seguito ad un intervento di chirurgia bariatrica e quindi ad una notevole perdita di peso (60). L’associazione tra obesità e IS sembra ascrivibile a differenti meccanismi. L’obeso presenta larghe pieghe che tendono a favorire meccanismi di frizione; a livello delle pieghe stesse, inoltre, la temperatura è più elevata e il microclima umido favorisce la crescita batterica. L’obesità, tuttavia, entra in gioco nella patogenesi dell’IS anche con meccanismi più complessi, che chiamano in causa lo stato

di “low grade inflammation” al quale un tessuto adiposo ipertrofico espone l’intero organismo. Il tessuto adiposo, infatti, è da considerarsi come un vero e proprio organo endocrino, produttore di una grande quantità di citochine, tra cui molte con azione pro-infiammatoria come TNF- $\alpha$ , IL-6, resistine, retinol binding protein 4 (RBP4), lipocalin 2, CCL2, IL-18, nicotinamide CXCL5 (61). Il tessuto adiposo ipertrofico e insulinoresistente del soggetto obeso affetto da IS va incontro a due fenomeni cruciali nell’induzione di infiammazione (62) (**Figura 4**):

1. Alterazione della produzione adipochinica, con riduzione di adipochine ad attività insulino-sensibilizzante e antinfiammatoria a favore di adipochine dotate di proprietà opposte.
2. Sbilanciamento dello switch fenotipico dei macrofagi verso la variante M1 dotata di attività proinfiammatoria.



**Figura 4:** Rappresentazione schematica dello squilibrio adipochinico promosso dal tessuto adiposo ipertrofico e insulino-resistente nel soggetto obeso affetto da IS e conseguente iperattivazione della popolazione macrofagica nella sua variante M1 dotata di attività proinfiammatoria (62).

Risulta, dunque, evidente come raramente l'obesità o il sovrappeso si presentino come comorbidità isolate nel paziente affetto da IS: molto più frequentemente esse si collocano nel contesto di alterazioni metaboliche concomitanti che coinvolgono, ad esempio, il metabolismo glucidico, configurando, talvolta, il quadro di una sindrome metabolica.

Alla luce di queste osservazioni è stato ipotizzato che le alterazioni metaboliche ricoprano un ruolo chiave nella patogenesi dell'IS. Diversi studi confermano questa associazione: una metanalisi in cui è stata riscontrata una significativa relazione tra IS e sindrome metabolica (63) e uno studio condotto da Karagiannidis et al. in cui gli autori confermano il legame esistente tra IS e sindrome metabolica (64) ne sono alcuni esempi. Essendo l'IS una patologia che insorge tipicamente in età giovanile, le anomalie precoci e subcliniche del metabolismo glucidico, sono senz'altro quelle di più frequente riscontro. Da qui la particolare attenzione rivolta in vari studi alla prevalenza dell'insulino-resistenza in questa categoria di pazienti. In uno studio caso-controllo, Vilanova et al. hanno determinato la prevalenza di insulino-resistenza nei pazienti affetti da IS, evidenziando una differenza statisticamente significativa nei valori di HOMA-IR nei pazienti con IS, suggerendo l'utilità di screenare i soggetti affetti da questa patologia e di gestirli di conseguenza (65). Diversi studi successivi, anche del nostro gruppo di ricerca (66) hanno confermato queste osservazioni dimostrando anche una correlazione diretta tra severità della patologia, insulino-resistenza e BMI.

### **1.3. BIOMARKERS METABOLICI NELL'IDROSADENITE SUPPURATIVA**

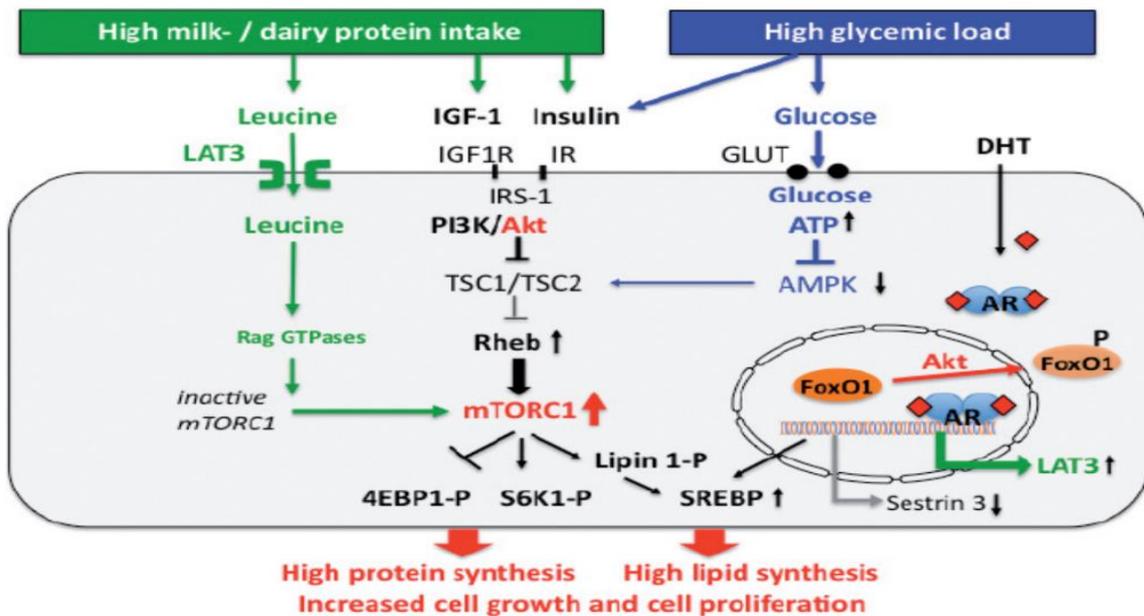
L'importanza dei disordini metabolici in una categoria di pazienti, come quelli affetti da IS, tendenzialmente giovani, ma già gravati da un ventaglio di comorbidità potenzialmente gravi, impone la necessità di valutare l'utilità di specifici biomarkers metabolici che siano in grado di svolgere una duplice funzione:

- identificare, in una fase ancora precoce e subclinica del loro decorso, le comorbidità metaboliche più frequentemente associate a questa patologia
- fungere da indicatori predittivi sia del decorso della dermatosi stessa sia della sua potenziale responsività a specifici approcci terapeutici.

In quest'ottica e per le suddette potenziali applicazioni, hanno destato particolare interesse due biomarkers metabolici, di cui descriveremo a seguire generalità e potenziali applicazioni nell'inquadramento diagnostico e nel follow-up terapeutico dei pazienti affetti da IS.

### ***Mammalian target of rapamycin (mTOR)***

Si tratta di una serina/treonina chinasi altamente conservata, sensibilissima agli stimoli nutrizionali in grado di integrare numerosi segnali intra- ed extra-cellulari, esercitando i suoi effetti attraverso due complessi: mTORC1 and mTORC2. Tra i due, mTORC1 è il complesso maggiormente implicato nelle malattie infiammatorie croniche della cute in quanto gli eventi da esso regolati risultano coinvolti nella patogenesi delle stesse. In particolare, mTOR è implicato in diverse funzioni cellulari quali la proliferazione cellulare, la lipogenesi e la gluconeogenesi in risposta a diversi mitogeni (IGF-1 e VEGF), nutrienti (aminoacidi, glucosio e acidi grassi), insulina e citochine (67) (**Figura 5**).



**Figura 5.** Meccanismo di stimolazione di mTOR da parte di insulina e nutrienti.

Il pathway di mTORC1 è coinvolto nella regolazione della sintesi lipidica ed aumenta la proliferazione cellulare mediante S6K1 e eIF4B complex. Questo pathway è essenziale per la crescita dell'organismo, ma l'eccessiva attivazione di mTOR può condurre la cellula ad uno stato di quiescenza e senescenza e portare ad una condizione di insulino-resistenza. mTOR stimola, infatti, l'attivazione e la secrezione di insulina da parte delle cellule beta pancreatiche. Tuttavia, la stimolazione cronica di mTOR rende tali cellule resistenti all'azione dell'IGF-1 e dell'insulina (68). Glucosio e insulina costituiscono potenti trigger di attivazione di mTOR, che, una volta attivato, attiva a sua volta la S6 chinasi (S6K), che fosforila e determina la degradazione dell'insuline receptor substrate 1-2 (IRS1-2), alterando così la sensibilità all'insulina. Alcune citochine pro-infiammatorie, tra cui il TNF- $\alpha$ , stimolando mTOR, possono favorire ulteriormente questa condizione di insulino-resistenza. Dunque, normalizzando i livelli di glicemia e insulinemia si può ridurre indirettamente l'attivazione di mTOR e, di conseguenza, migliorare la sensibilità tissutale all'insulina (68).

Il pathway di mTOR è coinvolto nella patogenesi di diverse condizioni di interesse dermatologico quali tumori epiteliali, micosi fungoide, sclerosi tuberosa, psoriasi e acne.

Nello strato basale delle aree lesionali dei pazienti affetti da psoriasi è stata riscontrata una riduzione di PI3-K/Akt ed una iperattivazione di mTOR. Tale condizione risulta associata ad uno stato di insulino-resistenza e lo stesso mTOR sembra capace di inibire Akt innescando così un loop in grado di automantenersi (69). Alcune citochine (IL-17 e 22) coinvolte nella patogenesi della psoriasi, determinano l'attivazione di mTOR, che riveste, pertanto, un ruolo chiave nella cascata infiammatoria e proliferativa della cute psoriasica (70-72).

Diversi autori hanno dimostrato il coinvolgimento del pathway di mTOR nella patogenesi dell'acne (73-74). Su cute lesionale e non lesionale di soggetti acneici è stata osservata un'espressione di mTOR significativamente maggiore rispetto ai controlli sani (75). Questo studio preliminare, seppur con limitata numerosità campionaria, ha fornito la prima evidenza dell'iperattivazione del pathway di mTOR, confermando il suo ruolo nel complesso scenario patogenetico dell'acne vulgaris.

Riguardo al ruolo di mTOR nella patogenesi dell'IS, esso è riconducibile innanzitutto alla sua capacità di interferire con le funzioni del sistema immunitario. Infatti, mTOR svolge un ruolo essenziale nella differenziazione dei linfociti Th17, come noto implicati nella patogenesi della IS (76-77). Monfrecola et al. (78) hanno, inoltre, dimostrato una iperespressione di mTOR sia in cute lesionale che non lesionale di pazienti affetti da IS, evidenziando una correlazione tra espressione genica e severità della patologia. Nello stesso studio è stata, inoltre, dimostrata una significativa correlazione tra iperespressione di mTOR e insulinoresistenza. Il nostro gruppo di ricerca ha recentemente confermato queste osservazioni, suggerendo come mTOR costituisca un attendibile biomarker di disordini incipienti del metabolismo glucidico nei pazienti affetti da IS (66).

Alla luce di queste evidenze è chiaro come il pathway di mTOR svolga un ruolo cruciale nella patogenesi dell'IS, costituendo un biomarker potenzialmente utile sia nella profilazione metabolica che nella stratificazione prognostica del paziente affetto da IS.

### ***Irisina***

L'irisina nasce nella comunità scientifica grazie ad uno studio (79), condotto da Bostrom et al. nel 2012, volto a valutare il ruolo del coattivatore trascrizionale PGC1- $\alpha$  (cofactor peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  co-activator 1- $\alpha$ ) nell'obesità. Questo studio ha dimostrato che l'irisina, originata dal clivaggio di un precursore indotto dalla proteina PGC1- $\alpha$ , rappresenta un potenziale strumento terapeutico per combattere i disordini metabolici, in quanto in grado di causare dispendio energetico, riduzione ponderale sensibilizzando i tessuti periferici all'insulina. Seguirono studi in cui emerse che l'incremento di irisina circolante, indotto con la stessa tecnica sperimentale, in topi predisposti ad obesità e diabete mellito indotti dalla dieta, migliorava la tolleranza al glucosio, potenziava il consumo di ossigeno, riducendo i livelli di insulina a digiuno e comportando conseguentemente una riduzione del peso corporeo.

Uno studio condotto da Arturo Roca-Rivada et al. (80) ha messo in luce la capacità del tessuto adiposo bianco, al pari del muscolo scheletrico, di produrre l'irisina evidenziando, inoltre, che la secrezione di quest'ormone dipende, anche nel tessuto adiposo, dall'attività fisica. Uno studio condotto da Fox J1 et al. (81) ha dimostrato, dopo un intenso esercizio fisico, l'aumento sostanziale della concentrazione di irisina negli adulti, in assenza di una correlazione significativa tra la concentrazione di irisina post-esercizio e l'età, l'intensità di esercizio aerobico o il tipo di sessione di allenamento (resistenza o allenamento aerobico). Il livello di forma fisica e l'indice di massa corporea sono stati identificati come variabili predittive significative per la concentrazione di irisina post-esercizio. Choj et al. in (82) hanno comparato i livelli sierici di irisina in pazienti affetti da diabete mellito di tipo 2 di nuova insorgenza con

controlli sani e normale tolleranza al glucosio, evidenziando come i livelli sierici di irisina fossero significativamente più bassi nei diabetici. Risultati simili sono stati riportati da Xiang et al. in (83). Altri autori hanno dimostrato come in soggetti adulti obesi l'irisina sierica sia associata negativamente con l'insulina (84). Inoltre, gli indicatori di resistenza all'insulina, come l'insulina a digiuno e l'HbA1c (emoglobina glicata A1c), l'adiposità addominale (circonferenza della vita) e il rapporto sierico di albumina/globulina sono stati associati negativamente al livello di irisina circolante. L'irisina sembrava anche capace di stimolare la lipolisi, inibire la lipogenesi ed indurre il metabolismo lipidico intracellulare mediante la regolazione di geni come, ad esempio, Pnpla2 (Patatin Like Phospholipase Domain Containing 2) e HSL (Hormone-sensitive lipase). Queste osservazioni implicano verosimilmente che l'irisina svolge un ruolo protettivo nell'insulino-resistenza e nelle condizioni ad essa correlate, come la sindrome metabolica e il diabete mellito di tipo 2. Diversi altri studi (85-87) hanno analizzato la correlazione esistente tra livelli di irisina e anomalie del metabolismo glucidico, osseo e lipidico e obesità. In quest'ultima condizione, sebbene la maggior parte degli studi riporti una correlazione positiva tra livelli circolanti di irisina e massa adiposa, esistono dati spesso contrastanti. La correlazione positiva tra massa grassa e livelli circolanti di irisina sembrerebbe confutare l'effetto anti-obesità dell'ormone stesso. Questa apparente contraddizione può in realtà essere spiegata assumendo che l'incremento di irisina nel soggetto obeso rappresenti un meccanismo compensatorio dovuto alla relativa insufficienza delle fisiologiche quantità di irisina circolante. Per incrementare il dispendio energetico e riequilibrare l'omeostasi metabolica il muscolo scheletrico produrrebbe una quantità maggiore di miochina, insieme alla quota aggiuntiva prodotta dallo stesso tessuto adiposo (88). Nei pazienti obesi, pertanto, l'incremento dei livelli sierici della miochina mirerebbe a ridurre la massa grassa, normalizzare la composizione corporea, sensibilizzare i tessuti periferici all'insulina e conseguire, pertanto, uno stato di normolipidemia e normoglicemia. Fin dalla

prima descrizione dell'irisina, inoltre, è stata evidenziata un'associazione significativa tra aumento dei livelli circolanti di questo ormone e miglioramento dell'omeostasi glucidica con riduzione dell'insulino-resistenza derivante da regimi dietetici ad alto intake calorico e miglioramento della tolleranza al glucosio. Il conseguimento di questi effetti può essere immaginato come frutto di una serie di azioni che l'ormone svolge contemporaneamente a diversi livelli: agisce sul tessuto adiposo bianco promuovendone il browning con conseguente incremento del dispendio energetico; sensibilizza i recettori dell'insulina (in particolare nel tessuto scheletrico); migliora il metabolismo epatico di lipidi e glucosio; supporta la funzione delle cellule  $\beta$  pancreatiche, promuovendo l'assorbimento glucidico nel muscolo cardiaco e nel tessuto muscolare scheletrico (89). Alcuni studi riportano che il trattamento di cellule muscolari umane con irisina ricombinante aumenta significativamente l'uptake cellulare di glucosio e di acidi grassi in modo simile a quanto accade in seguito all'esposizione delle cellule all'insulina. L'irisina up-regola l'espressione di geni coinvolti nel trasporto di glucosio e lipidi nelle cellule muscolari e down-regola geni implicati nei processi di glicogenolisi e gluconeogenesi. Ulteriori ricerche confermano quanto descritto e suggeriscono che l'assorbimento di glucosio irisina-indotto dipenda dall'attivazione di AMPK cui fanno seguito l'attivazione di p38 MAPK e la traslocazione di GLUT4 sulla membrana plasmatica delle cellule muscolari. Si ipotizza che l'irisina attivi il pathway di AMPK attraverso la riduzione dei livelli intracellulari di ATP oppure incrementando le specie reattive dell'ossigeno o le concentrazioni intracellulari di calcio. L'attivazione di AMPK stimola, tra l'altro, l'espressione di GLUT4 e dei geni PPARA (la cui overespressione stimola il metabolismo lipidico) ed aumenta la  $\beta$  ossidazione degli acidi grassi. L'irisina stimola anche la traslocazione di GLUT4 in membrana utilizzando, in questo caso, principalmente il pathway di p38 MAPK. Infine, la miochina stimola la biogenesi dei mitocondri attraverso la regolazione di PPARA, UCP ed altre proteine funzionalmente associate. Sebbene il più importante organo bersaglio dell'irisina sia rappresentato dal tessuto

adiposo in cui essa stimola il browning degli adipociti bianchi, gli effetti dell'ormone anche su muscolo e fegato contribuiscono al conseguimento di uno stato di normoglicemia e normolipidemia (90). Nell'enorme campo dei disordini metabolici e delle complicanze ad essi strettamente connesse l'irisina rappresenta, quindi, una molecola che desta molto interesse per le sue innumerevoli potenzialità terapeutiche, soprattutto per entità cliniche quali insulino-resistenza, diabete mellito di tipo 2, obesità e sindrome metabolica.

Più recente è l'interesse che l'irisina ha destato nell'ambito delle dermatosi infiammatorie croniche. Mustafa Al et al. (91) hanno evidenziato che pazienti con acne insulinoresistenti mostravano livelli sierici di irisina più bassi e HOMA-IR più alto rispetto ai controlli. Altri autori (92) hanno dimostrato gli effetti dell'esercizio fisico sui livelli di irisina circolante in pazienti acneici. L'irisina si presenta, dunque, per le sue peculiari funzioni regolatorie attive a più livelli, come un potenziale utile biomarker metabolico dai potenziali molteplici campi di applicazione, particolarmente nell'ambito delle dermatosi infiammatorie croniche associate a comorbidità metaboliche, come l'IS.

#### **1.4 TNF- $\alpha$ NELL' IDROSADENITE SUPPURATIVA**

Il TNF- $\alpha$  è una citochina proinfiammatoria prodotta principalmente dai macrofagi, ma anche da mastociti, cellule endoteliali, fibroblasti, coinvolta, attraverso il legame con due diversi recettori (TNFR1 e TNFR2), in varie funzioni non solo immunologiche, ma anche e metaboliche (93). La funzione principale e maggiormente studiata del TNF- $\alpha$  è l'induzione di una risposta infiammatoria a seguito di un insulto da parte di patogeni intracellulari o di fenomeni di autoimmunità: in queste situazioni, infatti, dopo essere stata rilasciata in circolo, induce l'espressione locale di altre citochine e chemochine, richiamando e attivando i leucociti,

e sostenendo l'infiammazione. Questi fenomeni sono coinvolti nell'eziopatogenesi di diverse patologie infiammatorie croniche: intestinali, reumatiche e cutanee, psoriasi *in primis*.

Più recente è l'interesse per i meccanismi attraverso i quali questa citochina potrebbe contribuire alla patogenesi dell'IS. Diverse evidenze sembrano suggerire come, al di là del suo ruolo consolidato nella risposta infiammatoria e nel sistema immunitario, il TNF- $\alpha$  eserciti complesse azioni regolatorie sul metabolismo lipidico e glucidico, che come noto, risultano spesso alterati nei pazienti con IS. Una quota di TNF- $\alpha$  è, infatti, prodotta dagli adipociti ed influenza molti aspetti della loro funzione, dal loro sviluppo al metabolismo lipidico. È noto come un aumento significativo dei livelli di mRNA del TNF- $\alpha$  si verifichi con l'aumento dell'adiposità, con una correlazione significativa tra i livelli di questa citochina e la percentuale di grasso corporeo, così come una significativa riduzione della stessa con la perdita di peso (94). Lo studio delle attività biologiche del TNF- $\alpha$  ha anche evidenziato la sua capacità di svolgere funzioni regolatorie sul tessuto adiposo attraverso diversi meccanismi, come la soppressione di geni per fattori trascrizionali coinvolti nell' adipogenesi e nella lipogenesi nonché la modulazione dell'espressione di diversi fattori secreti dagli adipociti, tra cui l'adiponectina e l'IL-6, favorendo così il rilascio di FFA, ma anche l'aumento della sintesi di colesterolo e VLDL da parte del fegato (95). A queste complesse funzioni sul metabolismo del tessuto adiposo sono strettamente connesse le proprietà del TNF- $\alpha$  nella modulazione del metabolismo glucidico (96).

È noto che il diabete mellito di tipo 2 e l'insulino-resistenza sono condizioni morbose, alla cui patogenesi concorrono, tra numerosi altri fattori epigenetici, anche la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e livelli aumentati di citochine infiammatorie; tra queste il TNF- $\alpha$  è uno dei più importanti (97). La via di segnalazione dell'insulina può essere alterata da diverse modificazioni molecolari, alcune delle quali dimostrate in seguito all'aggiunta di TNF- $\alpha$  in colture cellulari. Tra queste annoveriamo la fosforilazione di una serina di IRS-1, ovvero

il substrato 1 del recettore dell'insulina; questa alterazione rende IRS-1 resistente alla successiva fosforilazione della tirosina, azione normalmente promossa dall'insulina. Il risultato è una riduzione dell'azione di IRS-1 che, non riuscendo più ad attivare la PI-3 chinasi, comporta una compromissione nel trasporto del glucosio, in quanto la PI3K normalmente fosforila e attiva il pathway della proteina AKT la quale incrementa il numero di trasportatori di membrana del glucosio GLUT4.

È stato dimostrato che il TNF- $\alpha$  induce questa modificazione nelle cellule che sono di maggiore interesse per la resistenza all'insulina (98-99). Alla luce di queste considerazioni è stato ipotizzato che le terapie con agenti in grado di legare e inibire il TNF- $\alpha$  possano avere degli effetti non solo meramente antinfiammatori, ma anche di complessa modulazione metabolica. Questa seconda azione potrebbe essere altrettanto importante in patologie, come l'IS, in cui, come ampiamente descritto sopra, le alterazioni metaboliche concorrono alla patogenesi tanto quanto quelle immunologiche, anzi costituendo spesso eventi trigger di queste ultime. L'Adalimumab, anticorpo monoclonale bloccante del TNF- $\alpha$ , è l'unico farmaco biologico approvato per il trattamento dell'IS resistente alle terapie convenzionali. Le iniziali evidenze sull'efficacia del farmaco per questa specifica indicazione derivarono dall'osservazione che in pazienti con malattie infiammatorie intestinali e concomitante IS trattati con farmaci anti-TNF- $\alpha$  si osservava un miglioramento simultaneo dei sintomi cutanei (101). Successivamente negli studi clinici (PIONEER I e II), l'efficacia è stata confermata con una percentuale maggiore di pazienti che raggiungevano l'endpoint terapeutico rispetto ai soggetti trattati con placebo. La risposta clinica si è dimostrata stabile nel tempo con un profilo di sicurezza coerente con quello noto del farmaco per altre indicazioni, senza criticità aggiuntive in termini di sicurezza [102-103]. Restano, tuttavia, ancora parzialmente inesplorati i risvolti metabolici di tale approccio terapeutico nei pazienti con IS.

## **2. OBIETTIVI DELLO STUDIO**

Analizzare l'effetto del blocco selettivo del TNF- $\alpha$  sull'assetto metabolico di pazienti con IS e l'eventuale correlazione con la risposta clinica alla terapia stessa, mediante l'utilizzo di specifici biomarkers (Irisina e mTOR), noti come possibili indicatori predittivi di disordini metabolici incipienti.

## **3. MATERIALI E METODI**

### ***3.1 Arruolamento dei pazienti***

Sono stati arruolati 30 pazienti, affetti da IS afferenti alla Sezione di Dermatologia dell'Università di Napoli Federico II.

*Criteri di inclusione:* Età  $\geq 18$  anni, anamnesi negativa per neoplasie maligne, diagnosi di IS resistente alle terapie convenzionali con Ss  $> 50$ , durata della patologia  $\geq 6$  mesi, wash out da terapie topiche o sistemiche  $\geq 3$  settimane.

*Criteri di esclusione:* gravidanza, allattamento, infezioni attive acute o croniche in atto, patologie dermatologiche o metaboliche concomitanti (diabete mellito, sindrome metabolica, PCOS), trattamenti antidiabetici o altre terapie farmacologiche in atto in grado di influenzare il metabolismo glucidico. Nessuno dei partecipanti era sottoposto a restrizioni dietetiche. Sono stati anche esclusi pazienti che riferivano di essersi impegnati nei sei mesi precedenti in programmi di attività fisica sia in ambito professionale che non. Tutti i partecipanti hanno fornito un consenso informato firmato prima della loro inclusione nello studio e lo studio è stato approvato dal locale Comitato Etico. La somministrazione di Adalimumab (ADA) ha seguito la posologia e le indicazioni previste per i pazienti con IS: 160 mg come dose iniziale di induzione, seguita da 80 mg dopo 2 settimane e infine da 40 mg a settimana.

La risposta clinica, valutata mediante Sartorius Score (Ss), Physician Global Assessment (PGA) e International Hidradenitis Suppurativa Severity Score System (iHS4), è stata considerata eccellente, intermedia o scarsa a seconda della riduzione del Ss o del PGA rispetto alla baseline. In particolare, è stata considerata eccellente una risposta clinica con una riduzione di almeno 20 punti del Ss o il raggiungimento di un PGA “clear”. È stata considerata intermedia una risposta con una riduzione del Ss di 10-19 punti o il miglioramento di un grado nel PGA score rispetto alla baseline. È stata considerata scarsa una riduzione del Ss di meno di 10 punti o nessun miglioramento del PGA score rispetto alla baseline.

Al momento dell’arruolamento (W0) e dopo 16 settimane di terapia con adalimumab (W16) tutti i pazienti sono stati sottoposti ad una fenotipizzazione clinica con specifiche misurazioni antropometriche (peso, altezza, body mass index), nonché metabolica con indagini volte ad analizzare lo stato del metabolismo glucidico (glicemia basale, insulinemia basale, OGTT e calcolo del valore di HOMA-IR).

### ***3.2 Studio in vivo***

In tutti i pazienti arruolati è stato eseguito lo studio *in vivo* su campioni ematici per la valutazione dei livelli circolanti di irisina (alla W0 e alla W16). In primis, al fine di valutare la quota di questa adipomiochina nei pazienti affetti da IS abbiamo dosato i livelli sierici di irisina al basale nei 30 pazienti in studio alla W0 e in un gruppo di controllo di volontari sani appaiato per sesso, età, BMI e per abitudini di attività fisica. Successivamente, lo stesso dosaggio è stato effettuato dopo 16 settimane di terapia con adalimumab (W16), al fine di valutare l’impatto dell’inibizione del pathway del TNF sui livelli circolanti di irisina, nonché l’eventuale correlazione tra variazione dei livelli circolanti di questo ormone ed entità della risposta clinica nei pazienti trattati.

Campioni di sangue (3 ml, ciascuno) sono stati raccolti da tutti i pazienti utilizzando provette EDTA (BD Vacutainer®) al basale e alla settimana 16. Il plasma è stato separato dai campioni mediante centrifugazione a 1262 g per 10 minuti, aliquotato e immediatamente conservato a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino ad ulteriori analisi. I livelli plasmatici di irisina sono stati rilevati da un kit ELISA con doppio anticorpo per uso di ricerca (Cat # EQ027943HU Cusabio, Wuhan, Cina).

I dati ottenuti sono stati analizzati statisticamente utilizzando GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, U.S.A.). Per analizzarli è stato utilizzato il paired t-test e un valore  $p < 0,05$  è stato considerato statisticamente significativo.

### **3.3 Studio *ex vivo***

In un sottogruppo di 13 pazienti è stato anche eseguito lo studio *ex vivo* su campioni biotici da cute lesionale e non lesionale per la valutazione del pathway di mTOR (alla W0 e alla W16). Biopsie cutanee con punch di 3 mm sono state ottenute sia da cute lesionale (CL) che da cute non lesionale (CNL) dei pazienti affetti, mentre i controlli sani (CS) sono stati ottenuti da cute di 10 differenti soggetti sottoposti ad addominoplastica. Mediante RT-PCR è stata valutata l'espressione di mTOR sia in CL che in CNL, mentre l'Immunofluorescenza (IF) è stata usata per valutare l'espressione della proteina S6K1 su CL di pazienti affetti prima e dopo la terapia con adalimumab.

***Estrazione RNA, sintesi cDNA e real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR):*** L'RNA è stato estratto (RNeasy Mini Protocol Qiagen, Valencia, CA) dalle biopsie cutanee e il cDNA è stato preparato (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis, Roche, Indianapolis, IN). La qRT-PCR (LightCycler, Roche) è stata usata per l'analisi dell'espressione genica di mTOR, S6K1 e P-S6K1. Il quantitativo di mRNA calcolato per ogni gene è stato normalizzato comparandolo al gene housekeeping di riferimento 18S nello stesso campione.

**Immunofluorescenza (IF):** Il rilevamento dell'immunofluorescenza di S6K1 e della sua forma fosforilata P-S6K1 è stato effettuato su cute lesionale prima dell'inizio della terapia con adalimumab (W0) e dopo 16 settimane (W16) e su cute non lesionale. Dopo il prelievo, i campioni bioptici cutanei sono stati immediatamente immersi nel mezzo di congelamento specifico per tessuti (Jung, Leica, Wetzlar, Germany) e conservati a  $-80^{\circ}$  C. Cinque sezioni micrometriche sono state tagliate con un criostato, fissate con paraformaldeide al 4% per 10 minuti e incubate con SDS all'1% (S6K1, P-S6K1) per 5 minuti. Le sezioni sono state lavate tre volte in soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) all'1% per 5 min. Quindi, le sezioni sono state incubate dapprima con una soluzione bloccante (5% di siero normale d'asino, 0,5% di siero bovino, 0,2% di TBS-T - 50 mmol L<sup>-1</sup> Tris – HCl pH 7,5, 50 mmol L<sup>-1</sup> NaCl, 0,1% Tween 20- in PBS 1X) per 20 min a 22 °C e, successivamente, con anticorpi diluiti in PBS con lo 0,5% di albumina di siero bovino specifici per S6K1 (1/100 Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) e P-S6K1 (Ser 235/6) (1/100 Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) per una notte a 4 ° C. In parallelo, i campioni di cute sono stati incubati con anticorpi di controllo dell'isotipo specifico (Rabbit IgG, monoclonale e policlonale - Isotype Control, Abcam Cambridge, UK) utilizzati alla stessa concentrazione dell'anticorpo primario corrispondente. I vetrini sono stati quindi incubati con anticorpi secondari NorthernLights anti-rabbit IgG-NL493 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) a una diluizione 1/200 per 1 ora a 4 ° C, al riparo dalla luce. I nuclei sono stati colorati con DAPI (GIBCO, Grand Island, NY, USA). La colorazione è stata osservata utilizzando il microscopio Leica DM2500 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germania).

**Analisi statistica:** I dati sono stati analizzati con il two-tailed t test, mentre è stato utilizzato il test di Mann-Whitney per calcolare le differenze statistiche. Valori di  $P < 0,05$  sono stati considerati statisticamente significativi. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA).

## 4. RISULTATI

### 4.1 Caratterizzazione clinica dei pazienti

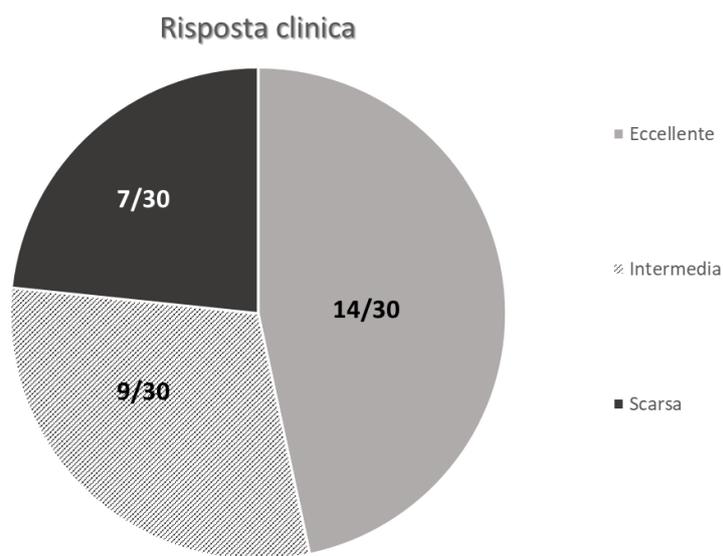
Relativamente alle caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti arruolati, i pazienti (11 maschi e 19 femmine) presentavano un'età media al momento dell'arruolamento di  $25,3 \pm 7,32$  anni; l'indice di massa corporea medio era  $26,5 \pm 2,6$  kg / m<sup>2</sup>; per quanto riguarda la gravità della malattia il Ss medio era di  $61,6 \pm 10,6$ , mentre il valore medio dell'International Hidradenitis Suppurativa Severity Score System (iHS4) era  $6.75 \pm 2.9$ . Nessun soggetto era classificabile come insulino-resistente o obeso.

Le caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti arruolati sono sintetizzate in **Tabella 1**.

Maschi:Femmine	11:19
Età (anni)	$25.3 \pm 7.32$
Durata della patologia (anni)	$7.19 \pm 4.59$
Familiarità positiva	6
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	$26.5 \pm 2.6$
Glicemia basale (mg/dL)	$91 \pm .3$
Insulinemia basale (IU/mL)	$9.32 \pm 4.3$
iHS4	$6.75 \pm 2.99$
Sartorius score	$61.6 \pm 10.6$

**Tabella 1.** Caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti arruolati (n=30). I dati sono forniti come media  $\pm$  deviazione standard. iHS4: International Hidradenitis Suppurativa Severity Score System.

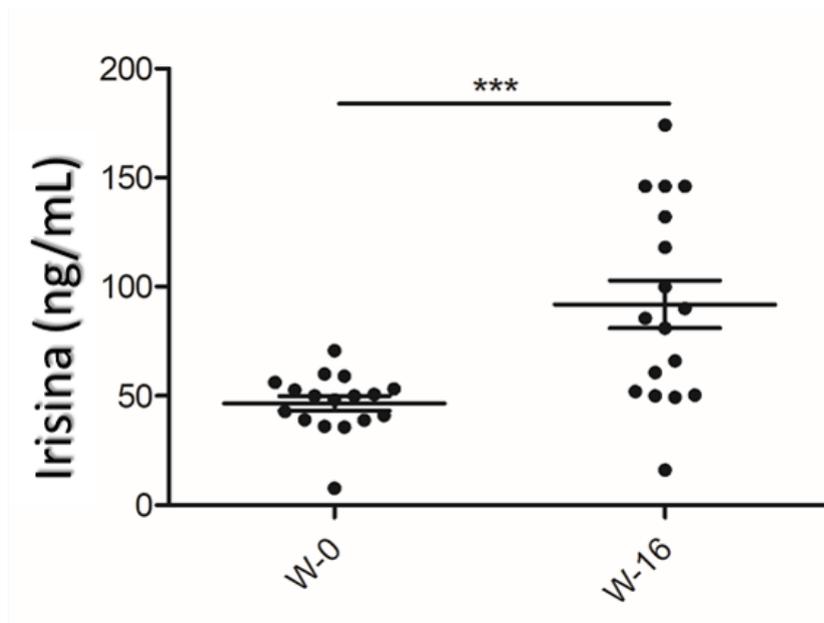
La risposta clinica (classificata in base alla riduzione del Ss o del PGA rispetto alla baseline) è stata valutata come eccellente in 14 pazienti su 30, scarsa in 7 pazienti su 30 e intermedia in 9 pazienti su 30 (**Figura 6**).



**Figura 6:** Distribuzione della risposta clinica in pazienti con IS dopo 16 settimane di terapia con adalimumab (ADA)

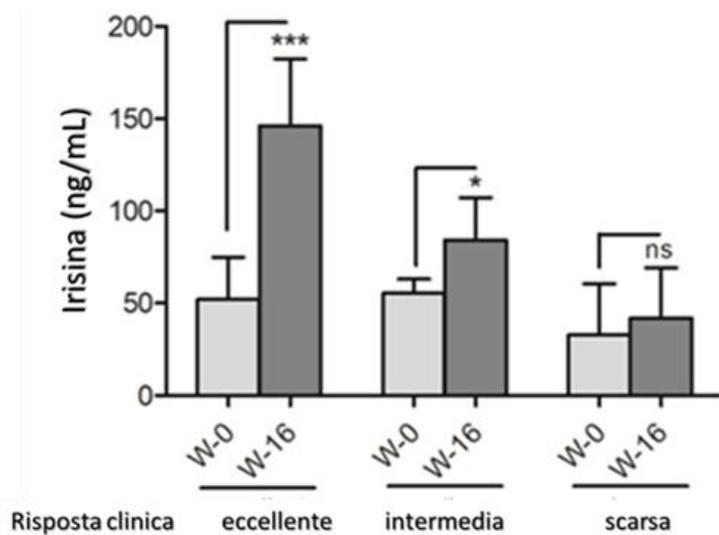
#### **4.2 Studio in vivo**

Nella fase *in vivo* dello studio abbiamo evidenziato come i livelli plasmatici di irisina siano significativamente più bassi, con una concentrazione ematica media di irisina pari a 38.11 ng/mL nei pazienti affetti da IS alla baseline rispetto ai controlli sani (130, 06 ng/mL). Fatto interessante, i livelli della adipomiochina risultavano significativamente aumentati dopo 16 settimane di terapia con ADA rispetto al basale (W-0) ( $p < 0,001$ ) (**Figura 7**).



**Figura 7.** Livelli plasmatici di irisina nei pazienti con IS al basale (W0) e dopo 16 settimane di terapia con adalimumab (ADA) (W-16). La significatività statistica è stata valutata con il paired t-test.\*\*\* p <0,001.

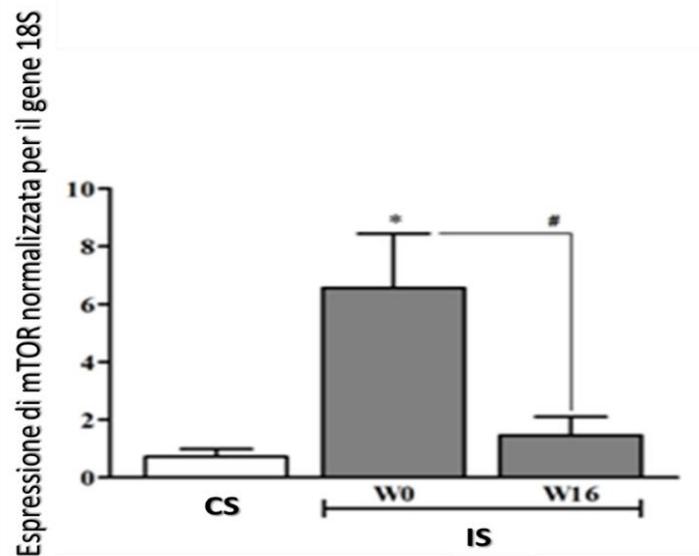
Per approfondire il legame tra irisina circolante e infiammazione sistemica nell'IS, i livelli plasmatici di irisina sono stati correlati alla risposta clinica. È interessante notare che un aumento significativo dell'irisina circolante è stato riscontrato nei pazienti con risposta media, con un ulteriore aumento significativo in quelli con risposta definita eccellente (p <0,05 e <0,001, rispettivamente). Al contrario, nessuna differenza significativa in termini di irisina circolante è stata trovata nei soggetti con scarsa risposta rispetto al basale (**Figura 8**).



**Figura 8.** Livelli plasmatici di irisina nei pazienti con IS al basale (W0) e dopo 16 settimane di terapia con ADA (W16) in pazienti con risposta eccellente, intermedia e scarsa. La significatività statistica è stata valutata con il paired t-test. \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*  $p < 0,05$ .

#### 4.3 Studio *ex vivo*

Lo studio *ex vivo* ha dimostrato, in linea con i dati della letteratura, una espressione del gene mTOR significativamente aumentata alla baseline (W0) su CL di pazienti con IS rispetto alla cute da CS. Dato, invece, innovativo riguarda la significativa riduzione dell'espressione di mTOR dopo 16 settimane (W16) di terapia con Adalimumab, suggerendo la stretta relazione tra TNF- $\alpha$  e pathway di mTOR (**Figura 9**).

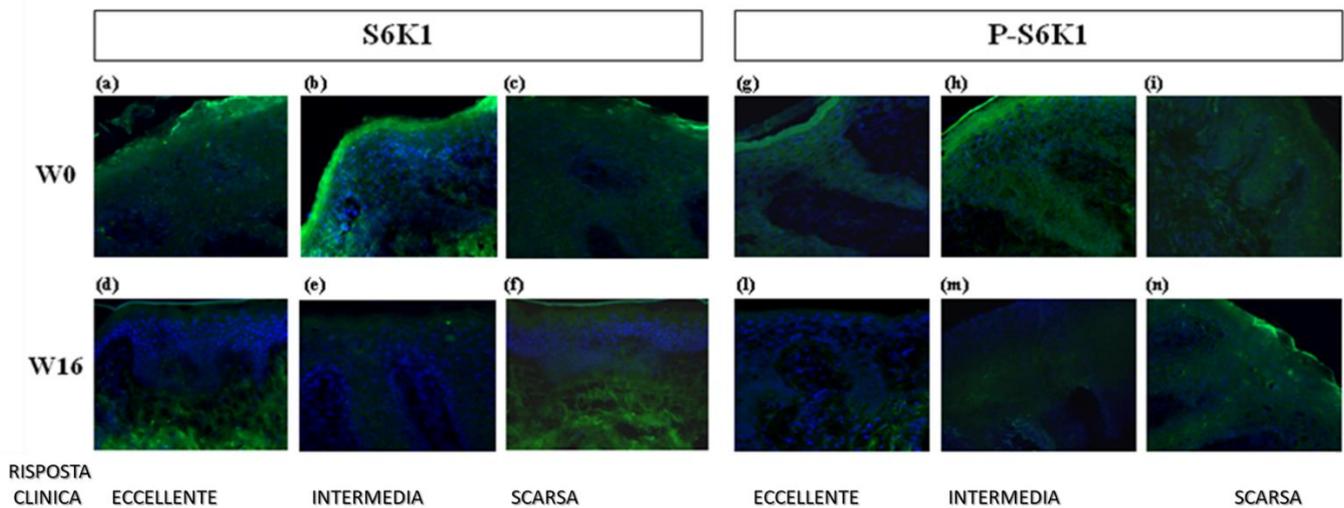


**Figura 9:** Espressione di mTOR aumentata nella cute di pazienti con IS alla W0 rispetto alla cute di controlli sani (CS). Espressione di mTOR significativamente ridotta alla W16 dopo terapia con adalimumab. I valori sono normalizzati rispetto al gene housekeeping 18S ed espressi come media  $\pm$  deviazione standard. La significatività statistica è stata valutata utilizzando il test di Mann-Whitney per il confronto con il controllo sano (\*  $P < 0,05$ ) e con il paired-t test (# $P < 0,05$ ) per l'analisi del trattamento con ADA (W16 vs W0).

L'analisi di IF ha dimostrato che la terapia con anti-TNF- $\alpha$  alla W16 è in grado di modulare l'espressione di mTOR, agendo su uno dei suoi principali effettori proteici, la proteina ribosomiale S6 kinase 1 (S6K1) e la sua forma attivata P-S6K1. Entrambe le proteine sono risultate aumentate nella CL di pazienti affetti e l'adalimumab era in grado di ridurne i livelli alla W16. Dato interessante, l'intensità di tale riduzione è risultata correlata in modo proporzionale alla risposta clinica.

In particolare, migliore era la risposta clinica, più evidente era la diminuzione nell'espressione di S6K1 e P-S6K1, come si può osservare nella **Figura 10**. Questa differenza era molto più

evidente per quanto riguarda la forma attivata, P-S6K1, evidenziando il coinvolgimento specifico del complesso mTORC1 nella patogenesi dell'IS e nella risposta clinica dopo terapia.



**Figura 10.** Livelli di S6K1 (a-f) e P-S6K1(g-n) in cute lesionale di pazienti affetti da IS alla baseline (W0) e dopo 16 settimane (W16) di terapia con ADA. L'intensità della colorazione è correlata alla risposta clinica (eccellente, media e scarsa).

## 5. DISCUSSIONE

L'idrosadenite suppurativa è una dermatosi infiammatoria cronica, profondamente invalidante per i pazienti affetti. La giovane età di insorgenza, la compromissione della sfera relazionale e la frequente associazione con comorbidità sia conclamate che subcliniche, ne fanno una delle patologie dermatologiche a più elevato impatto sulla qualità di vita (104). I mediatori molecolari in comune tra questa dermatosi e le molteplici comorbidità a cui essa si associa, sono costituiti da un complesso pool di citochine proinfiammatorie, adipochine e miochine in grado di agire non solo sui fenomeni infiammatori, ma anche sul metabolismo glucidico e lipidico. Tra i mediatori più ampiamente studiati in tal senso, annoveriamo il TNF- $\alpha$ , citochina

coinvolta nella modulazione non solo delle funzioni immunitarie, ma anche di quelle metaboliche promuovendo, come sopra descritto, attraverso complessi meccanismi molecolari, obesità e insulinoresistenza (96-97). È stato, pertanto, ipotizzato che l'efficacia delle terapie con agenti in grado di legare e inibire il TNF- $\alpha$  possa essere riconducibile non solo all'effetto meramente antinfiammatorio, ma anche alle proprietà di complessa modulazione metabolica ad esso associate. Questa seconda azione rivestirebbe particolare importanza in patologie, come l'IS, in cui le anomalie metaboliche concorrono alla patogenesi tanto quanto quelle immunologiche, amplificandone l'entità con conseguente innesco di un loop in grado di autoalimentarsi. Le evidenze sempre crescenti dello stretto legame esistente tra dermatosi infiammatorie croniche e disordini metabolici, anche in fasi precoci e subcliniche del loro sviluppo, ha destato grande interesse nella comunità scientifica. Ciò ha favorito l'identificazione di biomarkers utili non solo nell'identificazione di disordini metabolici incipienti, ma anche nel fornire informazioni prognostiche sulla responsività a specifiche terapie. Tra questi, un biomarker emergente è l'irisina: una delle adipomiochine di più recente scoperta.

Sia studi *in vivo* che *in vitro* hanno dimostrato come l'irisina sia in grado di esplicare funzioni antinfiammatorie modulando l'espressione di diverse citochine, tra cui lo stesso TNF- $\alpha$  (105). Alcuni autori hanno esplorato le potenzialità dell'irisina come biomarker anche nell'ambito di alcune dermatosi infiammatorie come l'acne vulgaris e la psoriasi (91, 106), ma non nell'IS. Più ampia è, invece, la quantità di dati disponibile su un altro biomarker metabolico: il Mammalian target of rapamycin (mTOR), una serina/treonina implicata nella modulazione di diverse funzioni quali proliferazione cellulare, lipogenesi e gluconeogenesi in risposta a diversi stimoli sia intra- che extracellulari. Una iperespressione di mTOR è stata dimostrata in varie patologie cutanee, compresa l'IS (78). Tale fenomeno, tuttavia, non è stato mai correlato ad una terapia con TNF- $\alpha$ , né alla relativa risposta clinica in questa patologia.

Sulla base di queste osservazioni abbiamo esaminato un gruppo di 30 pazienti affetti da IS e trattati con adalimumab, al fine di analizzare, attraverso specifici biomarkers, l'effetto del blocco selettivo del TNF- $\alpha$  sull'assetto metabolico di pazienti con IS e l'eventuale correlazione con la risposta clinica alla terapia stessa. Abbiamo dimostrato, per la prima volta, come nell'IS i livelli circolanti di irisina siano significativamente ridotti rispetto ai controlli sani e come una terapia in grado di bloccare selettivamente una citochina infiammatoria come il TNF- $\alpha$  possa indirettamente influenzare anche i livelli di questa adipomiochina coinvolta nell'omeostasi metabolica. È stata, inoltre, dimostrata una correlazione diretta tra efficacia della terapia e variazioni dei livelli circolanti di irisina, il cui aumento era tanto più marcato quanto migliore era la risposta clinica al trattamento. Questo dato è stato ulteriormente confermato dallo studio *ex vivo* condotto in un sottogruppo di 13 pazienti, in cui è stata effettuata la valutazione dell'espressione genica di mTOR, anch'esso, come noto, implicato nel mantenimento dell'omeostasi metabolica.

Mentre l'aumento dell'espressione di mTOR, rispetto ai controlli sani, osservato nella cute lesionale di pazienti affetti da IS è in linea con i dati della letteratura (78), la sua significativa riduzione osservata dopo 16 settimane di terapia con Adalimumab è un dato innovativo, che suggerisce una stretta correlazione tra la via mTOR e quella del TNF- $\alpha$ .

L'analisi di immunofluorescenza ha consentito di analizzare i livelli di proteina S6K1 e P-S6K1, effettori del pathway di mTOR, dimostrando una riduzione direttamente correlata all'entità della risposta clinica nei pazienti responder e non responder.

La diretta correlazione osservata tra responsività clinica dei pazienti trattati e capacità della terapia di modificare i livelli dei biomarkers in esame, costituisce una possibile base per studi futuri. La validazione di specifici biomarkers utili nella profilazione metabolica e nella stratificazione prognostica dei pazienti è particolarmente vantaggiosa in una patologia come

l'IS. In essa, infatti, anomalie metaboliche subcliniche possono sussistere, pur in assenza di parametri clinici o di laboratorio che consentano una diagnosi tradizionale.

Questo costituirà un grosso passo in avanti nell'approccio all'IS, fornendo utili informazioni sia sulla sua potenziale responsività a specifici approcci terapeutici sia sulla presenza, in una fase ancora precoce e subclinica del loro decorso, delle comorbidità metaboliche frequentemente associate a questa patologia.

Gabriella Fabbrocini



### ***Bibliografia***

1. Lee EY, Alhusayen R, Lansang P, Shear N, Yeung J. What is hidradenitis suppurativa? Can Fam Physician. 2017 Feb;63(2):114-120. PMID: 28209676
2. Sabat R, Jemec GBE, Matusiak Ł, Kimball AB, Prens E, Wolk K. Hidradenitis suppurativa. Nat Rev Dis Primers. 2020 Mar 12;6(1):18. doi: 10.1038/s41572-020-0149-1. PMID: 32165620

3. Nguyen TV, Damiani G, Orenstein LAV, Hamzavi I, Jemec GB. Hidradenitis suppurativa: an update on epidemiology, phenotypes, diagnosis, pathogenesis, comorbidities and quality of life. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020 May 27. PMID: 32460374
4. Vekic DA, Frew J, Cains GD. Hidradenitis suppurativa, a review of pathogenesis, associations and management. Part 1. *Australas J Dermatol*. 2018 Nov;59(4):267-277. doi: 10.1111/ajd.12770. Epub 2018 Jan 21. PMID: 29355905
5. Goldberg SR, Strober BE, Payette MJ. Hidradenitis suppurativa: Epidemiology, clinical presentation, and pathogenesis. *J Am Acad Dermatol*. 2020 May;82(5):1045-1058. doi: 10.1016/j.jaad.2019.08.090. Epub 2019 Oct 9. PMID: 31604104
6. Esmann S, Jemec GB. Psychosocial impact of hidradenitis suppurativa: a qualitative study. *Acta Derm Venereol* 2011; 91: 328-32
7. Dessinioti C, Katsambas A, Antoniou C. Hidradenitis suppurativa (acne inversa) as a systemic disease. *Clin Dermatol*. 2014 May-Jun;32(3):397-408. doi: 10.1016/j.clindermatol.2013.11.006. Epub 2013 Nov 22
8. Shuster S. The nature and consequence of Karl Marx's skin disease. *Br J Dermatol* 2008; 158: 1-3

9. Plewig G, Steger M. Acne inversa (alias acne triad, acne tetrad or hidradenitis suppurativa). In: Marks R, Plewig G, eds. Acne and related disorders. London: Martin Dunitz; 1989. p. 345-357.
10. Von Laffert M, Helmbold P, Wohlrab J, et al. Hidradenitis suppurativa (acne inversa): early inflammatory events at terminal follicles and interfollicular epidermis. *Exp Dermatol*. 2010;19:533-537
11. Yu CC, Cook MG. Hidradenitis suppurativa: a disease of follicular epithelium, rather than apocrine glands. *Br J Dermatol* 1990; 122: 763–769.
12. Fimmel S, Zouboulis CC. Comorbidity of hidradenitis suppurativa (acne inversa). *Dermatol Endocrinol*. 2010;2:9-16.
13. Hidradenitis Suppurativa Foundation (HSF). Second International Conference on hidradenitis suppurativa, San Francisco, CA, March 5, 2009. Available from: [www.hs-foundation.org](http://www.hs-foundation.org). Accessed May 2, 2013.
14. Revuz J. Hidradenitis suppurativa. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2009;23:985-998
15. Hurley H. Axillary hyperhidrosis, apocrine bromhidrosis, hidradenitis suppurativa, and familial benign pemphigus: surgical approach. In: Dermatologic surgery (Roenigh R, Roenigh H, eds). New York: Marcel Dekker. 1989; 729-39.

16. Sartorius K, Lapins J, Emtestam L et al. Suggestions for uniform outcome variables when reporting treatment effects in hidradenitis suppurativa. *Br J Dermatol* 2003; 149: 211
17. Zouboulis CC, Tzellos T, Kyrgidis A, et al. European Hidradenitis Suppurativa Foundation Investigator Group. Development and validation of the International Hidradenitis Suppurativa Severity Score System (IHS4), a novel dynamic scoring system to assess HS severity. *Br J Dermatol*. 2017 Nov;177(5):1401-1409. doi: 10.1111/bjd.15748. Epub 2017 Oct 30. PMID: 28636793.
18. Onderdijk AJ, van der Zee HH, Esmann S, Lophaven S, Dufour DN, Jemec GB, Boer J. Depression in patients with hidradenitis suppurativa. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2013 Apr;27(4):473-8. doi: 10.1111/j.1468-3083.2012.04468.x. Epub 2012 Feb 20.
19. Matusiak L, Bieniek A, Szepietowski JC. Psychophysical aspects of hidradenitis suppurativa. *Acta Derm Venereol*. 2010 May;90(3):264-8. doi: 10.2340/00015555-0866.
20. Shavit E, Dreiherr J, Freud T, Halevy S, Vinker S, Cohen AD. Psychiatric comorbidities in 3207 patients with hidradenitis suppurativa. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014 Jun 9. doi: 10.1111/jdv.12567.
21. Hessel H, van der Zee J, Jon D, Laman, Jurr Boer and Errol P. Prens. Hidradenitis suppurativa: viewpoint on clinical phenotyping, pathogenesis and novel treatments. *Experimental Dermatology*, 2012, 21, 735–739.

22. Wang B, Yang W, Wen W, et al. Gamma-secretase gene mutations in familial acne inversa. *Science*. 2010;330:1065 . 66
23. Li CR, Jiang MJ, Shen DB, et al. Two novel mutations of the nicastrin in Chinese patients with acne inversa. *Br J Dermatol*. 2011;165:415-418
24. Pink AE, Simpson MA, Brice GW, et al. PSENEN and NCSTN mutations in familial hidradenitis suppurativa (acne inversa). *J Invest Dermatol*. 2011;131:1568-1570.
25. Von Laffert M, Helmbold P, Wohlrab J et al. Hidradenitis suppurativa (acne inversa): early inflammatory events at terminal follicles and at interfollicular epidermis . *ExpDermatol* 2010; 19: 533–537.
26. Attanoos RL, Appleton MA, Douglas-Jones AG. The pathogenesis of hidradenitis suppurativa: a closer look at apocrine and apoeccrine glands. *Br J Dermatol* 1995; 133: 254–258
27. Shah A, Alhusayen R, Amini-Nik S. The critical role of macrophages in the pathogenesis of hidradenitis suppurativa. *Inflamm Res*. 2017 Nov;66(11):931-945. doi: 10.1007/s00011-017-1074-y. Epub 2017 Jun 27. PMID: 28656364.
28. Hunger RE, Surovy AM, Hassan AS, Braathen LR, Yawalkar N. Toll-like receptor 2 is highly expressed in lesions of acne inversa and colocalizes with C-type lectin receptor. *Br J Dermatol* 2008; 158: 691–697.

29. Lapins J, Asman B, Gustafsson A, Bergstrom K, Emtestam L. Neutrophil-related host response in hidradenitis suppurativa: a pilot study in patients with inactive disease. *ActaDermVenereol* 2001; 81: 96–99.
30. Mozeika E1, Pilmane M, Nürnberg BM, Jemec GB. Tumour necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase-2 are expressed strongly in hidradenitis suppurativa. *ActaDermVenereol*. 2013 May;93(3):301-4. doi: 10.2340/00015555-1492.
31. Van der Zee HH, de Rooter L, van den Broecke DG, Dik WA, Laman JD, Prens EP. Elevated levels of tumour necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-10 in 67 hidradenitissuppurativa skin: A rationale for targeting TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . *Br J Dermatol* 2011;164:1292-8.
32. Matusiak L, Bieniek A, Szepietowski JC. Increased serum tumour necrosis factor-alpha in hidradenitis suppurativa patients: Is there a basis for treatment with anti-tumour necrosis factor-alpha agents? *Acta Derm Venereol* 2009;89:601-3.
33. König A1, Lehmann C, Rompel R, Happle R. Cigarette smoking as a triggering factor of hidradenitis suppurativa. *Dermatology*. 1999;198(3):261-4.
34. Revuz JE, Canoui-Poitaine F, Wolkenstein P, Viallette C, Gabison G, Pouget F, Poli F, Faye O, Roujeau JC, Bonnelye G, Grob JJ, Bastuji-Garin S. Prevalence and factors associated with hidradenitis suppurativa: results from two case-control studies. *J Am Acad Dermatol*. 2008 Oct;59(4):596-601. doi: 10.1016/j.jaad.2008.06.020. PMID: 18674845.

35. Sartorius K, Emtestam L, Jemec GBE, Lapins J. Objective scoring of hidradenitissuppurativa reflecting the role of tobacco smoking and obesity. *Br J Dermatol*. 2009;161:831-839.
36. Jeong SH, Park JH, Kim JN et al. Up-regulation of TNF-alpha secretion by cigarette smoke is mediated Egr-1 in HaCaT human keratinocytes. *Exp Dermatol* 2010; 19: e206-12.
37. Torii K, Saito C, Furuhashi T et al. Tobacco smoke is related to Th17 generation with clinical implicationsfor psoriasis patients. *Exp Dermatol* 2011; 20: 371-3.
38. Pavia CS, Pierre A, Nowakowski J. Antimicrobial activity of nicotine against a spectrum of bacterial and fungal pathogens. *J Med Microbiol* 2000; 49: 675-6.
39. Schlapbach C, Hänni T, Yawalkar N, Hunger RE. Expression of the IL-23/Th17 pathway in lesions of hidradenitis suppurativa. *J Am AcadDermatol* 2011;65:790-8.
40. Wolk K, Warszawska K, Hoeflich C, Witte E, Schneider-Burrus S, Witte K, et al. Deficiency of IL-22 contributes to a chronic inflammatory disease: Pathogenetic mechanisms in acne inversa. *J Immunol*; 2011;186:1228-39.
41. Scala E, Di Caprio R, Cacciapuoti S, Caiazzo G, Fusco A, Tortorella E, Fabbrocini G, Balato A. A new T helper 17 cytokine in hidradenitis suppurativa: antimicrobial and proinflammatory role of interleukin-26. *Br J Dermatol*. 2019 Nov;181(5):1038-1045. doi: 10.1111/bjd.17854. Epub 2019 Jun 23. PMID: 30829398.

42. Lauren K Hoffman, BS;<sup>1</sup> Mondana H Ghias, BS;<sup>1</sup> and Michelle A Lowes, MBBS. Pathophysiology of hidradenitis suppurativa *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery* .Vol 36, June 2017.
43. Gener G, Canoui Poitrine F, Revuz JE, Faye O, Poli F, Gabison G, et al. Combination therapy with clindamycin and rifampicin for hidradenitis suppurativa: A series of 116 consecutive patients. *Dermatology* 2009;219:148-54.
44. Rambhatla PV, Lim HW, Hamzavi I. A systematic review of treatments for hidradenitis suppurativa. *Arch Dermatol* 2012;148:439-46.
45. Join Lambert O, Coignard H, Jais JP, Guet Revillet H, Poirée S, Raitag S, et al. Efficacy of rifampicin moxifloxacin metronidazole combination therapy in hidradenitis suppurativa. *Dermatology* 2011;222:49-55.
46. Boer J, Nazary M. Long term results of acitretin therapy for hidradenitis suppurativa. Is acne inverse also a misnomer? *Br J Dermatol* 2011;164:170-5.
47. Yanzdanyar S, Boer J, Ingvarsson G, Szepietowski JC, Jemec GB. Dapsone therapy for hidradenitis suppurativa: A series of 24 patients. *Dermatology* 2011;222:342-6.
48. Fabbrocini G, Cacciapuoti S, Capasso C, Monfrecola G. Photodynamic therapy: a treatment tool for hidradenitis suppurativa. *Journal of Plastic Dermatology*. 2011; 7: 241-246.

49. Mahmoud BH, Tierney E, Hexsel CL, Pui J, Ozog DM, Hamzavi IH. Prospective controlled clinical and histopathologic study of hidradenitis suppurativa treated with the long pulsed neodymium: yttrium aluminium garnet laser. *J Am Acad Dermatol* 2010;62:637-45.
50. Bieniek A, Matusiak L, Okulewicz G, Gajlik D, Szepietowski JC. Surgical treatment of hidradenitis suppurativa: Experiences and recommendations. *Dermatol Surg* 2010;36:1998-2004.
51. Menderes A, Sunay O, Vayvada H, Yilmaz M. Surgical management of hidradenitis suppurativa. *Int J Med Sci* 2010;7:240-7.
52. Van Rappard DC, Limpens J, Mekkes JR. The off label treatment of severe hidradenitis suppurativa with TNF alpha inhibitors: A systematic review. *J Dermatolog Treat* 2012. 70
53. Gulliver WP, Jemec GB, Baker KA. Experience with ustekinumab for the treatment of moderate to severe hidradenitis suppurativa. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2012;26:911-4.
54. Gisondi P, Fostini AC, Fossà I, Girolomoni G, Targher G. Psoriasis and the metabolic syndrome. *Clin Dermatol*. 2018 Jan-Feb;36(1):21-28. doi: 10.1016/j.clindermatol.2017.09.005. Epub 2017 Sep 8. PMID: 29241748.
55. Sivanand A, Gulliver WP, Josan CK, Alhusayen R, Fleming PJ. Weight Loss and Dietary Interventions for Hidradenitis Suppurativa: A Systematic Review. *J Cutan Med Surg*.

2020 Jan/Feb;24(1):64-72. doi: 10.1177/1203475419874412. Epub 2019 Sep 10. PMID: 31502868.

56. Silfvast-Kaiser A, Youssef R, Paek SY. Diet in hidradenitis suppurativa: a review of published and lay literature. *Int J Dermatol.* 2019 Nov;58(11):1225-1230. doi: 10.1111/ijd.14465. Epub 2019 Apr 21. PMID: 31006861.

57. Choi F, Lehmer L, Ekelem C, Mesinkovska NA. Dietary and metabolic factors in the pathogenesis of hidradenitis suppurativa: a systematic review. *Int J Dermatol.* 2020 Feb;59(2):143-153. doi: 10.1111/ijd.14691. Epub 2019 Oct 25. PMID: 31651051.

58. Marasca C, Cinelli E, Annunziata MC, Barrea L, Savastano S, Fabbrocini G. Dietary Intervention: An Essential Part of the Management of Patients Affected by Hidradenitis Suppurativa. *Dermatology.* 2020;236(4):296-297. doi: 10.1159/000504912. Epub 2019 Dec 5. PMID: 31805559.

59. Kromann C1, Ibler KS, Kristiansen V, Jemec GB. The Influence of Body Weight on the Prevalence and Severity of Hidradenitis Suppurativa. *Acta Derm Venereol.* 2014 Feb 27. doi: 10.2340/00015555-1800.

60. Thomas CL1, Gordon KD, Mortimer PS. Rapid resolution of hidradenitis suppurativa after bariatric surgical intervention. *Clin Exp Dermatol.* 2014 Apr;39(3):315-7; quiz 317-8. doi: 10.1111/ced.12269.

61. Kurzen H, Kurokawa I, Jemec GBE, et al. What causes hidradenitis suppurativa? *ExpDermatol*. 2008;17:455-472.
62. Malara A, Hughes R, Jennings L, Sweeney CM, Lynch M, Awdeh F, Timoney I, Tobin AM, Lynam-Loane K, Tobin L, Hogan A, O'Shea D, Kirby B. Adipokines are dysregulated in patients with hidradenitis suppurativa. *Br J Dermatol*. 2017 Aug 23.
63. Ellie C. Stefanadi, Georgios Dimitrakakis, Christos-Konstantinos Antoniou, Dimitrios Challoumas, Nikita Punjabi, Inetzi Aggeliki Dimitrakaki, Sangeeta Punjabi, and Christodoulos I. Stefanadis; Metabolic syndrome and the skin: a more than superficial association. Reviewing the association between skin diseases and metabolic syndrome and a clinical decision algorithm for high risk patients, *Diabetology & Metabolic Syndrome*, Vol. 10, pp 1-11, 2018.
64. Karagiannidis I, Nikolakis G, Zouboulis CC. Endocrinologic Aspects of Hidradenitis Suppurativa. *Dermatol Clin*. 2016 Jan;34(1):45-9. doi: 10.1016/j.det.2015.08.005. PMID: 26617357.
65. Vilanova I, Hernández JL, Mata C, Durán C, García-Unzueta MT, Portilla V, Fuentevilla P, Corrales A, González-Vela MC, González-Gay MA, Blanco R, González-López MA; Insulin resistance in hidradenitis suppurativa: a case-control study, *European Academy of Dermatology and Venereology*, 32(5) pp 820-824, 2018.
66. Marasca C, Balato A, Annunziata MC, Cacciapuoti S, Fabbrocini G. Insulin resistance, mTOR and hidradenitis suppurativa. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2019 Mar;33(3):e106-e107. doi: 10.1111/jdv.15271. Epub 2018 Oct 24. PMID: 30288789.

67. Cornu M, Albert V, Hall MN. mTOR in aging, metabolism, and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2013; 23: 53–62.
68. Blagosklonny MV. TORcentric view on insulin resistance and diabetic complications: perspective for endocrinologists and gerontologists. *Cell Death Dis.* 2013 Dec 12;4:e964. doi: 10.1038/cddis.2013.506.
69. Leo MS1, Sivamani RK. Phytochemical modulation of the Akt/mTOR pathway and its potential use in cutaneous disease. *Arch Dermatol Res.* 2014 Jun 28.
70. Buerger C, Malisiewicz B, Eiser A, Hardt K, Boehncke WH (2013) Mammalian target of rapamycin and its downstream signaling components are activated in psoriatic skin. *Br J Dermatol* 169(1):156–159;
71. Burger C, Shirsath N, Lang V et al. Blocking mTOR Signalling with Rapamycin Ameliorates Imiquimod-induced Psoriasis in Mice. *ActaDerm Venereol.* 2017 Oct 2;97(9):1087-1094.
72. Balato A, Lembo S, Ayala F, Balato N, Caiazzo G, Raimondo A, Di Caprio R, Monfrecola G Mechanistic target of rapamycin complex 1 is involved in psoriasis and regulated by anti-TNF- $\alpha$  treatment. *Exp Dermatol.* Apr;26(4):325-327).

73. Melnik BC: Is nuclear deficiency of FoxO1 due to increased growth factor/PI3K/Akt-signalling in acne vulgaris reversed by isotretinoin treatment? *Br J Dermatol* 2010; 162: 1398–1400.
74. Melnik BC, Schmitz G: Are therapeutic effects of antiacne agents mediated by activation of FoxO1 and inhibition of mTORC1? *Exp Dermatol* 2013; 22: 502–504.
75. Monfrecola G, Lembo S, Caiazzo G, De Vita V, Di Caprio R, Balato A, Fabbrocini G. *Exp Dermatol*. 2016 Feb;25(2):153-5. doi: 10.1111/exd.12885. Epub 2015 Dec 3. Mechanistic target of rapamycin (mTOR) expression is increased in acne patients' skin.
76. Ren W, Yin J, Duan J, et al: mTORC1 signaling and IL-17 expression: defining pathways and possible therapeutic targets. *Eur J Immunol* 2016; 46: 291–299.
77. Moran B, Sweeney CM, Hughes R, et al: Hidradenitis suppurativa is characterised by dysregulation of the Th17:Treg cell axis, which is corrected by anti-TNF therapy. *J Invest Dermatol* 2017; 137: 2389–2395.
78. Monfrecola G, Balato A, Caiazzo G, De Vita V, Di Caprio R, Donnarumma M, Lembo S, Fabbrocini G. Mammalian target of rapamycin, insulin resistance and hidradenitis suppurativa: a possible metabolic loop. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2016 Sep;30(9):1631-3. doi: 10.1111/jdv.13233. Epub 2015 Aug 24.

79. Pontus Boström, Jun Wu, Mark P. Jedrychowski, Anisha Korde, Li Ye, James C. Lo, Kyle A. Rasbach, Elisabeth Almer Boström, Jang Hyun Choi, Jonathan Z. Long, Shingo Kajimura, Maria Cristina Zingaretti, Birgitte F. Vind, Hua Tu, Saverio Cinti, Kurt Højlund, Steven P. Gygi, and Bruce M. Spiegelman; A PGC1 $\alpha$ -dependent myokine that drives browning of white fat and thermogenesis, *Nature*. 481(7382): pp 463–468, 2012.
80. Roca-Rivada A, Castela C, Senin LL, Landrove MO, Baltar J, Belén Crujeiras A, Seoane LM, Casanueva FF, Pardo M; FNDC5/irisin is not only a myokine but also an adipokine, *PLoS One*, 8(4):e60563, 2013.
81. Fox J, Rioux BV, Goulet EDB, Johanssen NM, Swift DL, Bouchard DR, Loewen H, Sénéchal M.; Effect of an acute exercise bout on immediate post-exercise irisin concentration in adults: A meta-analysis, *Scand J Med Sci Sports*. , 28(1) pp 16-28, 2018.
82. Choi YK, Kim MK, Bae KH, Seo HA, Jeong JY, Lee WK, Kim JG, Lee IK, Park KG; Serum irisin levels in new-onset type 2 diabetes , *Diabetes Res Clin Pract.*, Vol. 100, pp 96–101, 2013.
83. Xiang L, Xiang G, Yue L, Zhang J, Zhao L.; Circulating irisin levels are positively associated with endothelium-dependent vasodilation in newly diagnosed type 2 diabetic patients without clinical angiopathy, *Atherosclerosis*, 235(2) pp 328-33, 2014.
84. Yan B, Shi X, Zhang H, Pan L, Ma Z, Liu S, Liu Y, Li X, Yang S, Li Z; Association of serum irisin with metabolic syndrome in obese Chinese adults, *PLoS One*. 7;9(4):e94235, 2014.

85. Moreno-Navarrete JM, Ortega F, Serrano M, Guerra E, Pardo G, Tinahones F, Ricart W, Fernández-Real JM; Irisin is expressed and produced by human muscle and adipose tissue in association with obesity and insulin resistance, *J Clin Endocrinol Metab.*, 98(4):E769-78, 2013
86. Fabian Sanchis-Gomar , Rafael Alis, Helios Pareja-Galeano, Eva Sola,Victor M. Victor,Milagros Rocha, Antonio Hernandez-Mijares;Circulating irisin levels are not correlated with BMI, age,and other biological parameters in obese and diabetic patients, *Endocrine.*, 46(3) 674-7, 2014.
87. Gerhard GS, Styer AM, Strodel WE, Roesch SL, Yavorek A, Carey DJ, Wood GC, Petrick AT, Gabrielsen J, Ibele A, Benotti P, Rolston DD, Still CD, Argyropoulos G; Gene expression profiling in subcutaneous, visceral and epigastric adipose tissues of patients with extreme obesity, *Int J Obes (Lond).* , 38(3):371-8, 2014.
88. Jia-qi Chen,Yue-ye Huang, Aaron M Gusdon, and Shen Qu; Irisin: a new molecular marker and target in metabolic disorder, *Lipids Health Dis.*,14;14:2, 2015.
89. Gizaw, Anandakumar, Debela; A Review on the Role of Irisin in Insulin Resistance and Type 2 Diabetes Mellitus , *J Pharmacopuncture.* 2017 Dec; 20(4) pp 235–242, 2017.
90. Nikolaos Perakakis,Georgios A. Triantafyllou,José Manuel Fernández-Real,Joo Young Huh, Kyung Hee Park, JochenSeufert,and Christos S. Mantzoros; Physiology and role of irisin in glucose homeostasis, *Nat Rev Endocrinol.*, 13(6) pp 324-337, 2017

91. Mustafa AI, El-Shimi OS. Serum irisin: A prognostic marker for severe acne vulgaris, *J Cosmet Dermatol.*, 17(5):931-934., 2018.
92. Yoshifumi Tsuchiya, Daisuke Andob, Kaoru Takamatsuc, Kazushige Goto; Resistance exercise induces a greater irisin response than endurance exercise, *Metabolism.*; 64(9):1042-50, 2015.
93. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 2001 Feb 23;104(4):487-501. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00237-9. PMID: 11239407.
94. Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest.* 1995 May;95(5):2111-9.
95. Warne JP. Tumour necrosis factor alpha: a key regulator of adipose tissue mass. *J Endocrinol.* 2003 Jun;177(3):351-5. doi: 10.1677/joe.0.1770351. PMID: 12773114.
96. Ruan H, Miles PD, Ladd CM, Ross K, Golub TR, Olefsky JM, Lodish HF. Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor-alpha: implications for insulin resistance. *Diabetes.* 2002 Nov;51(11):3176-88.

97. Akash MSH, Rehman K, Liaqat A. Tumor Necrosis Factor-Alpha: Role in Development of Insulin Resistance and Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *J Cell Biochem.* 2018 Jan;119(1):105-110.
98. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- $\alpha$ - and obesity-induced insulin resistance. *Science.* 1996 Feb 2;271(5249):665-8. doi: 10.1126/science.271.5249.665. PMID: 8571133.
99. Paz K, Hemi R, LeRoith D, Karasik A, Elhanany E, Kanety H, Zick Y. A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 1997 Nov 21;272(47):29911-8. doi: 10.1074/jbc.272.47.29911. PMID: 9368067.
100. Ahmad F, Goldstein BJ. Effect of tumor necrosis factor- $\alpha$  on the phosphorylation of tyrosine kinase receptors is associated with dynamic alterations in specific protein-tyrosine phosphatases. *J Cell Biochem.* 1997 Jan;64(1):117-27. PMID: 9015760.
101. Savage KT, Flood KS, Porter ML, Kimball AB. TNF- $\alpha$  inhibitors in the treatment of hidradenitis suppurativa. *Ther Adv Chronic Dis.* 2019 May 27;10:2040622319851640.
102. Kim ES, Garnock-Jones KP, Keam SJ. Adalimumab: A Review in Hidradenitis Suppurativa. *Am J Clin Dermatol.* 2016 Oct;17(5):545-552.

103. Goldberg SR, Strober BE, Payette MJ. Hidradenitis suppurativa: Current and emerging treatments. *J Am Acad Dermatol*. 2020 May;82(5):1061-1082.
104. Nguyen TV, Damiani G, Orenstein LAV, Hamzavi I, Jemec GB. Hidradenitis suppurativa: an update on epidemiology, phenotypes, diagnosis, pathogenesis, comorbidities and quality of life. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020 May 27. doi: 10.1111/jdv.16677. Epub ahead of print. PMID: 32460374.
105. Mazur-Bialy AI. Irisin acts as a regulator of macrophages host defense. *Life Sci*. 2017 May 1;176:21-25. doi: 10.1016/j.lfs.2017.03.011. Epub 2017 Mar 15. PMID: 28315350.
106. Baran A, Myśliwiec H, Kiluk P, Świdarska M, Flisiak I. Serum irisin levels in patients with psoriasis. *J Dermatolog Treat*. 2017 Jun;28(4):304-308. doi: 10.1080/09546634.2016.1254327. Epub 2016 Nov 10. PMID: 27786588.