

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA
SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E
FARMACEUTICHE



Corso di laurea magistrale in Medicina e Chirurgia

TESI DI LAUREA
**PERFORMANCE DEI CRITERI DI
CLASSIFICAZIONE EULAR/ACR-2019 NEI
PAZIENTI CON DIAGNOSI DI LUPUS
MONOGENICO**

Relatore:

Prof. Stefano Volpi

Candidata:

Giulia Ginesi

Anno accademico 2021-2022

Indice:

1. Lupus Eritematoso Sistemico.....	4
2. Lupus Eritematoso Sistemico Pediatrico.....	4
3. Lupus Monogenico.....	7
3.1. Difetti di Efferocitosi	8
3.1.1. Deficit del Complemento	8
3.1.2. Deficit delle DNAsi extracellulari.....	9
3.1.3. Altri difetti nella fagocitosi	10
3.2. Interferonopatie di tipo I	10
3.2.1. Via di segnalazione dell'interferone di tipo I.....	11
3.2.2. TREX1	16
3.2.3. DNase II	17
3.2.4. SAMHD1	18
3.2.5. RNaseH2A, RNaseH2B, RNaseH2C.....	19
3.2.6. ADAR1	20
3.2.7. IFIH1 / MDA5.....	21
3.2.8. DDX58 / RIG-I.....	22
3.2.9. TMEM173 / STING (SAVI).....	22
3.2.10. ISG15 e USP18	24
3.2.11. OTUD1.....	25
3.2.12. ACP5 / TRAP (SPENCD).....	25
3.3. Perdita di tolleranza delle cellule B o T	26
3.3.1. PRKCD / PKC δ	26
3.3.2. TNFSF13B / BAFF	27
3.3.3. RAG1 e RAG2	28
3.3.4. FAS / FASL.....	29
3.3.5. RASopatie	30
3.3.6. IKZF1 / IKAROS	30
3.3.7. TNFAIP3 / A20 (RELopatie).....	31
3.3.8. ADA2 (DADA2).....	31
3.3.9. TLR7	31
3.4. Diagnosi	36
3.5. Terapia.....	38
4. Scopo dello studio	41
5. Pazienti e Metodi.....	43
5.1. Selezione dei pazienti.....	43
5.2. Applicazione dei criteri classificativi EULAR/ACR-2019 e SLICC-2012.....	45

5.3.	Analisi Statistica dei dati	49
6.	Risultati	50
6.1.	Suddivisione dei pazienti	50
6.2.	Analisi demografica	54
6.3.	Analisi genetica dei pazienti con diagnosi di Lupus Monogenico	59
6.4.	Confronto EULAR/ACR-2019 e SLICC-2012 nei pazienti con Lupus Monogenico.....	63
6.5.	Frequenza dei domini di EULAR/ACR-2019 nei gruppi di pazienti in studio	67
6.6.	Performance dei criteri di classificazione EULAR/ACR-2019.....	71
6.7.	Descrizione dei pazienti seguiti presso l'Istituto G. Gaslini	76
7.	Discussione	97
8.	Conclusioni	102
9.	Bibliografia	103

1. Lupus Eritematoso Sistemico

Il Lupus Eritematoso Sistemico (SLE, *Systemic Lupus Erythematosus*) è il prototipo delle malattie autoimmuni infiammatorie del tessuto connettivo. È una patologia complessa, caratterizzata da un decorso cronico, imprevedibile, con alternarsi di fasi di malattia attiva e fasi di remissione (1,2). Il sistema immunitario aggredisce le cellule e i tessuti sani arrecando un potenziale danno a tutti gli organi ed apparati, ne deriva, quindi, un quadro di disfunzione multisistemica. Molti fattori, fra cui la genetica, l'ambiente e le alterazioni immunitarie, entrano in gioco nello sviluppo di questa patologia (3). Le caratteristiche cliniche, l'eziopatogenesi, l'evoluzione e la prognosi differiscono tra gli individui a seconda dell'età e dell'etnia di appartenenza, generando un quadro estremamente eterogeneo dal punto di vista delle manifestazioni (4).

2. Lupus Eritematoso Sistemico Pediatrico

Considerando proprio il dato anagrafico è errato considerare bambini e adolescenti come "piccoli adulti". Il Lupus Eritematoso Sistemico ad insorgenza pediatrica (cSLE, *childhood-onset Systemic Lupus Erythematosus*) è, infatti, un'entità nosologica a sé stante che presenta caratteristiche cliniche e prognostiche peculiari e distintive rispetto al Lupus Eritematoso Sistemico dell'adulto (aSLE, *adult-onset Systemic Lupus Erythematosus*) e riveste il 15-20% di tutte le manifestazioni di SLE. Il limite superiore di età per definire cSLE è comunemente posto a 16 o 18 anni con età media alla diagnosi di 12-14 anni, quindi, durante l'adolescenza; meno comune è la diagnosi prima dei 5 anni di età. Viene sempre mantenuta la prevalenza del sesso femminile, anche se, rispetto ad aSLE, è inferiore (il rapporto F:M è 5:1 nel cSLE, mentre è di 9:1 in aSLE). L'aspetto più rilevante che contraddistingue cSLE da aSLE concerne la presentazione clinica: bambini e adolescenti manifestano una forma di malattia più grave, a decorso più aggressivo e ad attività sostenuta e prolungata nel tempo con un importante coinvolgimento renale, ematologico e nervoso. Rispetto all'adulto, quindi, la forma pediatrica determina un importante coinvolgimento d'organo associato anche a precoci alterazioni dei parametri di laboratorio, cui consegue un trattamento immunosoppressivo più incisivo. Il tasso di mortalità in cSLE rimane superiore ad aSLE nonostante i miglioramenti in ambito terapeutico, la più giovane età e l'assenza di preesistenti comorbidità, tuttavia, la sopravvivenza a 10 anni si assesta intorno al 90%.

Gli obiettivi chiave nella gestione di cSLE sono la prevenzione della progressione clinica, il controllo dei sintomi e delle sequele a lungo termine e la riduzione al minimo degli effetti collaterali e delle tossicità legate al trattamento. Il tutto è accompagnato da un costante sostegno psicologico e sociale al paziente e alla famiglia, garantito da un approccio multidisciplinare completo e specializzato (5–7).

Se le differenze cliniche e laboratoristiche tra cSLE e aSLE sono evidenti e ampiamente dimostrate, bisogna sottolineare come questa disomogeneità si verifichi anche all'interno dello stesso cSLE, tra i diversi gruppi di età. Suddividendo la popolazione pediatrica di pazienti affetti in 3 gruppi:

- pre-puberale (≤ 7 anni)
- peri-puberale (8-13 anni)
- adolescente (14-18 anni)

si può notare come siano presenti sostanziali diversità nelle manifestazioni. Rispetto ai bambini più piccoli, gli adolescenti soddisfano un maggior numero di criteri diagnostici, hanno un'elevata attività di malattia e coinvolgimento d'organo e mostrano il tipico pattern anticorpale (positività di ANA e anti-dsDNA), ematologico (leucopenia, trombocitopenia) e immunologico (ipocomplementemia) della forma "classica" di SLE.

Invece, nella fase pre-puberale le manifestazioni sono più atipiche, il titolo autoanticorpale è basso alla diagnosi, ma il decorso, con la crescita, si fa più aggressivo e la prognosi peggiora. Ne consegue che l'insieme di esordio precoce e assenza di autoanticorpi portino a pensare a quell'insieme di condizioni genetiche racchiuse sotto il termine di "disturbi monogenici SLE-like". Anche il genere ha un impatto negativo: i pazienti di sesso maschile presentano maggiori indici di danno e outcome peggiore, indipendentemente dal dato anagrafico. Sicuramente tutta questa eterogeneità clinica e laboratoristica supporta l'ipotesi secondo cui diversi meccanismi fisiopatologici sottendono alla disomogeneità fenotipica, che è evidente non solo tra paziente adulti e pediatrici, ma anche all'interno della stessa coorte di pazienti affetti da cSLE (8,9).

Le presentazioni atipiche (come ad esempio il predominante coinvolgimento polmonare o la linfoadenopatia di lunga data) e severe di malattia, spesso associate a inefficace controllo con i trattamenti convenzionali, i casi di aggregazione familiare e di consanguineità suggeriscono un'eziologia genetica del cSLE e implicano valutazioni più approfondite.

Partendo da questo presupposto, negli ultimi anni è aumentato l'interesse e la ricerca verso l'origine genetica e molecolare di queste forme di Lupus infantile, con lo scopo di rendere sempre più personalizzato il percorso diagnostico e terapeutico. Più di 30 mutazioni in singolo gene, con trasmissione recessiva e/o dominante, sono state identificate grazie all'utilizzo di nuove tecniche analitiche, come il sequenziamento delle regioni codificanti (esoni) dei geni di un individuo (WES= *Whole Exome Sequencing*). L'inserimento di WES nel management diagnostico di questi casi monogenici di cSLE permetterebbe una diagnosi precoce ed accurata, basata sull'eziologia, con anche la possibilità di identificare precocemente altri membri asintomatici della famiglia (10).

La modalità di ereditarietà del rischio genetico è attualmente sconosciuta, anche il contributo dato da varianti eterozigoti nei geni causanti Lupus Monogenico non è completamente chiarito. Tuttavia, uno studio Svedese su una coorte costituita da pazienti affetti e dai loro genitori biologici sani, ha identificato, attraverso il sequenziamento dell'intero genoma (WGS= *Whole Genome Sequencing*), delle rare varianti nei geni in causa per il Lupus Monogenico che danno contributi complessi al rischio genetico. Queste varianti sono trasmesse alla prole affetta da uno dei genitori e sembrano avere un impatto importante sul rischio genetico, rispetto a quanto fino ad ora conosciuto (11).

Sebbene la precisa eziopatogenesi di SLE rimanga non completamente definita, l'insieme di fattori ambientali e determinanti genetici predisponenti ha dimostrato avere un ruolo importante nell'eziologia del Lupus Pediatrico. Essendo un disturbo multifattoriale, anche molta dell'ereditarietà resta sconosciuta e <15% di questa può essere spiegata da varianti genetiche note (12). Nonostante questo, l'identificazione di difetti a singolo gene ha contribuito a comprendere meglio la variabilità clinica e ha portato a riconoscere una forma rara di cSLE, conosciuta come Lupus Monogenico. La consapevolezza che mutazioni in singoli geni possano determinare l'insorgenza di questa rara forma di SLE è supportata da 3 evidenze:

- 1) SLE può manifestarsi con aggregazione familiare;
- 2) Modelli murini monogenici presentano SLE come fenotipo (13,14);
- 3) Sono state descritte sindromi pediatriche monogeniche con caratteristiche simil-SLE;

Anche gli studi effettuati sui gemelli sono in linea con quanto detto: il tasso di concordanza nei gemelli monozigoti è del 24% contro il 2% dei dizigoti, sottolineando nuovamente il ruolo della suscettibilità genetica in SLE (15).

Per tutti i suddetti motivi, il Lupus Monogenico deve essere sempre sospettato e preso in considerazione nei pazienti con esordio pediatrico di Lupus Eritematoso Sistemico (10).

3. Lupus Monogenico

Il Lupus Monogenico è una forma di cSLE che si manifesta precocemente nella vita. Il quadro fenotipico è tipicamente rappresentato da bambini <5 anni, con un esordio di malattia severo: glomerulonefriti gravi, citopenie, disturbi neurologici, alterazioni mucocutanee importanti e resistenti ai trattamenti, anemia emolitica e autoanticorpi anti-dsDNA. L'anamnesi familiare evidenzia un'elevata incidenza di patologie autoimmuni e spesso anche un alto tasso di consanguineità nei legami di parentela (16,17).

Questi pazienti, pur rappresentando una piccola percentuale, pongono le basi per uno studio più approfondito delle vie patogenetiche. Il termine Lupus Monogenico, talvolta detto anche Mendeliano per via della sua ereditarietà, è stato coniato per sottolineare il forte legame esistente tra fenotipo e mutazioni in singolo gene. Questi geni causali possono essere raggruppati in 3 categorie funzionali:

- 1) Deficit di Efferocitosi: il deficit del complemento rappresenta la principale causa genetica di SLE e sottolinea l'importanza della clearance dei corpi apoptotici (efferocitosi) nella patogenesi del Lupus. Anche le carenze di DNase rientrano in questo gruppo, in quanto sono legate alla clearance degli acidi nucleici extracellulari.
- 2) Interferonopatie di tipo I: il ruolo della via di segnalazione dell'interferone è stato evidenziato in studi sulla Sindrome di Aicardi-Goutières (AGS). Questa condizione genetica è determinata da un difettoso metabolismo degli acidi nucleici e da una super attivazione dell'immunità innata. Diverse interferonopatie di tipo I hanno mostrato quadri simil-SLE.
- 3) Perdita di tolleranza, conseguente a mutazioni genetiche, dei linfociti B o T, che hanno un ruolo chiave nell'immunoregolazione: il deficit di PKC δ è stato il primo sottogruppo di alterazioni delle cellule B correlato a SLE monogenico, sottolineando il ruolo centrale dei linfociti B nella patogenesi.

Il Lupus Monogenico è quindi caratterizzato da autoanticorpi diretti contro antigeni nucleari non correttamente rimossi, da un aumento della produzione di interferone di tipo I e da anomalie dei linfociti B (18,19).

3.1. Difetti di Efferocitosi

Numerose molecole sono coinvolte nel riconoscimento e nella rimozione delle cellule apoptotiche, questo meccanismo è chiamato efferocitosi. Ogni giorno miliardi di cellule muoiono per apoptosi o per NETosi (un programma di morte cellulare messo in atto dai neutrofili, associato all'estrusione di reti fibrillari chiamate NET, ossia trappole extracellulari di neutrofili) (20). I corpi apoptotici e gli acidi nucleici extracellulari vengono fisiologicamente eliminati dai fagociti residenti nei tessuti periferici (macrofagi e cellule dendritiche) o reclutati localmente (21). Questo processo è fondamentale che avvenga correttamente per evitare l'innescò di una cascata infiammatoria conseguente al riconoscimento di ligandi endogeni non correttamente eliminati. I deficit del complemento e delle DNase1 e DNase1L3 definiscono un sottogruppo di Lupus Monogenico legato alla difettosa efferocitosi e al conseguente accumulo di materiale apoptotico e nucleare (19).

3.1.1. Deficit del Complemento

I difetti genetici nel sistema del complemento sono la prima e più frequente categoria descritta nel campo del Lupus Monogenico. Il complemento comprende più di 30 proteine che costituiscono componenti importanti sia dell'immunità innata che adattativa e fungono da opsonine, facilitando la clearance dei corpi apoptotici e dei complessi immunitari da parte dei fagociti. Questa funzione di rimozione degli immunocomplessi è essenziale per evitare un loro accumulo, che è altrimenti legato a infiammazione e danno d'organo (22,23).

Il complemento ha anche funzioni immunoregolatrici addizionali, per esempio C1q (via classica del complemento) è capace di ridurre la produzione di interferone di tipo I da parte delle cellule dendritiche plasmacitoidi (24) e ha recentemente dimostrato di regolare l'immunità adattativa modulando il metabolismo mitocondriale delle cellule T CD8, così da prevenire l'autoreattività e favorire il controllo delle infezioni virali (25).

Mutazioni genetiche delle componenti iniziali della via classica (C1q, C1r, C1s) predispongono fortemente all'insorgenza di SLE monogenico, con una penetranza del 90%. Le carenze di altre proteine complementari, sempre della via classica, quali C2 e C4, promuovono un'autoimmunità sistemica simil-lupus con un rischio del 10-20% nel caso di

deficit di C2 e del 75% nel caso di deficit di C4 (26). La forza dell'associazione tra deficit del complemento e manifestazione di SLE dipende dalla posizione della proteina mancante nella cascata (C1>C4>C2) (27).

La presentazione clinica conseguente a mutazioni nel sistema del complemento è caratterizzata da un esordio precoce di malattia, con una prevalenza femminile meno marcata rispetto alla controparte adulta. Il fenotipo è grave, in particolare a causa di ricorrenti infezioni mortali come le meningiti; i rash cutanei fotosensibili sono comuni in tutte le carenze di complemento, mentre l'artrite grave è per lo più correlata alla carenza di C2 e la nefrite lupica a quella di C4. La prevalenza degli anticorpi anti-nucleo (ANA) è solitamente alta, soltanto il 20% dei pazienti, invece, presenta anti-dsDNA. Al contrario, gli anticorpi anti-Ro/SSA sono positivi nell'80% degli individui con carenze di C1q e C4. Il basso CH50 con livelli sierici normali di C3 e C4 è evocativo per un deficit del complemento (19).

3.1.2. Deficit delle DNAsi extracellulari

Le desossiribonucleasi (DNAsi) sono un gruppo di enzimi che catalizzano la degradazione delle molecole di DNA così da prevenire il riconoscimento del DNA-self e la conseguente produzione di autoanticorpi.

Ad oggi, 4 diverse DNAsi sono state collegate al Lupus Monogenico: DNaseI, DNase1L3, DNaseII e TREX1 (=DNaseIII). DNaseI e DNase1L3 rientrano nel gruppo dei deficit di efferocitosi, mentre DNaseII e TREX1 sono maggiormente coinvolte nella via di segnalazione dell'interferone di tipo I. DNaseI è un'importante endonucleasi sierica che degrada il dsDNA extracellulare delle cellule morenti; DNase1L3 è omologa di DNaseI, contiene un residuo C-terminale carico positivamente e ha un ruolo nella clearance delle trappole extracellulari dei neutrofili (NET) (18). Essendo enzimi chiave nella digestione del materiale nucleico extracellulare, il loro ruolo è cruciale nel mantenimento dell'immunotolleranza. In caso di deficit di DNaseI/DNase1L3 il DNA circolante può legare gli autoanticorpi, formando immunocomplessi che causano danno d'organo. Gli stessi acidi nucleici possono essere anche riconosciuti da recettori Toll-like (TLR7 e TLR9) con conseguente produzione di interferone (28).

Il deficit di DNase1L3 è stato identificato in casi di SLE familiare con un profilo anticorpale positivo per ANA, anti-dsDNA e ANCA associato a vasculite orticarioide ipocomplementemica (29,30). Anche il quadro di nefrite lupica insieme a basso C3 e C4, positività ANA, anti-dsDNA e ANCA è evocativo per mutazioni in DNase1L3 (12).

Gli individui affetti da SLE con perdita di funzione di DNaseI hanno mostrato alti livelli di anticorpi anti-nucleosoma: in una piccola frazione di pazienti la carenza di DNaseI è causata da mutazioni che alterano la sequenza di codifica del gene, nella maggior parte dei casi, invece, entrano in gioco cause ancora poco definite che determinano una ridotta attività enzimatica (31,32). Tutti questi dati mettono in evidenza quanto sia cruciale il difetto della clearance dei detriti cellulari nella patogenesi del Lupus.

3.1.3. Altri difetti nella fagocitosi

La forma X-linked di malattia granulomatosa cronica (CGD) è dovuta a una mutazione in CYBB che codifica per una glicoproteina componente l'enzima NADPH ossidasi o NOX2, coinvolto nella produzione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS). È stato evidenziato un legame fra CYBB e SLE, secondario all'aumento di NETosi e alla liberazione di materiale intracellulare e autoantigeni al di fuori delle cellule. In modelli murini è stato dimostrato come la carenza di NOX2 determini un aggravamento dell'autoimmunità e un'esacerbazione del Lupus (33). I pazienti CGD con la forma X-linked presentano un rischio aumentato di manifestazioni cutanee come il Lupus discoide e una maggiore fotosensibilità, inoltre, hanno una forte suscettibilità per infezioni ricorrenti, soprattutto da microrganismi catalasi positivi (34,35). Raramente sono descritti episodi di artrite, glomerulonefrite e fenomeno di Raynaud, così come lo screening anticorpale risulta spesso negativo nonostante il fenotipo simil-SLE (34,36).

3.2. Interferonopatie di tipo I

Il termine "interferonopatie di tipo I" è stato utilizzato per la prima volta nel 2011 dal neurologo e genetista inglese Yanick Crow per indicare alcune malattie con componente neurologica e autoimmune, di cui aveva recentemente identificato la causa genetica (sindrome di Aicardi-Goutières) (37).

Una grande parte dei difetti a singolo gene che determinano il Lupus Monogenico sono classificati all'interno del vasto gruppo delle interferonopatie di tipo I che comprendono quadri clinici e molecolari tipici sia delle malattie autoimmuni che delle malattie autoinfiammatorie.

Il termine interferonopatie indica una iperstimolazione della via di segnalazione dell'interferone (IFN) di tipo I che viene misurata tramite l'aumentata espressione dei geni stimolati dall'interferone (*Interferon Stimulated Genes*, ISGs) (38).

Il dosaggio delle citochine interferoniche, infatti, non è ad oggi disponibile nella pratica medica di routine, a causa dei livelli circolanti estremamente bassi (39).

Rice et al. hanno dimostrato che la sovraregolazione dell'IFN di tipo I è correlata con l'aumento dell'espressione di un sottoinsieme di 6 geni stimolati dall'interferone (ISGs) (IFI27, IFI44L, IFIT1, ISG15, RSAD2 e SIGLEC1), definita "firma dell'interferone" (40). Questa "firma dell'interferone", è accettata come prova indiretta e attendibile di produzione eccessiva di IFN di tipo I ed è stata trovata più alta in campioni di sangue di pazienti affetti da Lupus (41); è utilizzata sia nella diagnosi che nel follow up delle interferonopatie ed è molto sensibile nel differenziare queste ultime dalle inflammasomopatie, così come potrebbe essere un ottimo strumento per la diagnosi differenziale delle varie forme di Lupus Monogenico (42,43).

3.2.1. Via di segnalazione dell'interferone di tipo I

Gli interferoni (IFN) sono citochine che rivestono un ruolo chiave nella difesa contro i virus e hanno una funzione regolatoria della risposta immunitaria innata e adattativa. Gli IFN di tipo I rappresentano la famiglia più vasta, comprendendo sia IFN α , e le sue 13 distinte sottospecie, che IFN β . L'incremento della via di segnalazione dell'IFN α rappresenta un segno distintivo di SLE (44).

Le infezioni virali sono un trigger scatenante la cascata degli interferoni: la presenza di un virus viene riconosciuta dalle cellule dell'organismo tramite una serie di recettori citoplasmatici ed endosomiali in grado di legarsi agli acidi nucleici del patogeno e determinare la produzione di specifiche citochine infiammatorie, gli IFN di tipo I. Questi ultimi vengono secreti nello spazio extracellulare e sono a loro volta in grado di legarsi al recettore IFN- α/β (IFNAR), presente su tutte le cellule nucleate, il quale attiva le Janus Chinasi (JAK) TYK2 e JAK1 e successivamente le proteine STAT1, STAT2 e STAT3 che innescano la trascrizione di diversi geni indotti dall'interferone (ISGs). Recenti studi hanno individuato altri meccanismi patogenetici in causa nell'attivazione di questa via come un'anomala risposta dell'organismo a frammenti di acidi nucleici e la presenza di difetti nella regolazione del segnale del recettore dell'IFN o delle molecole a valle; tutto questo si verifica nonostante numerosi meccanismi omeostatici (esempio: enzimi che digeriscono gli acidi nucleici e proteine inibitorie del recettore e dei mediatori a valle) cerchino di impedire lo sviluppo di reazioni infiammatorie e immunitarie in assenza di patogeni (45).

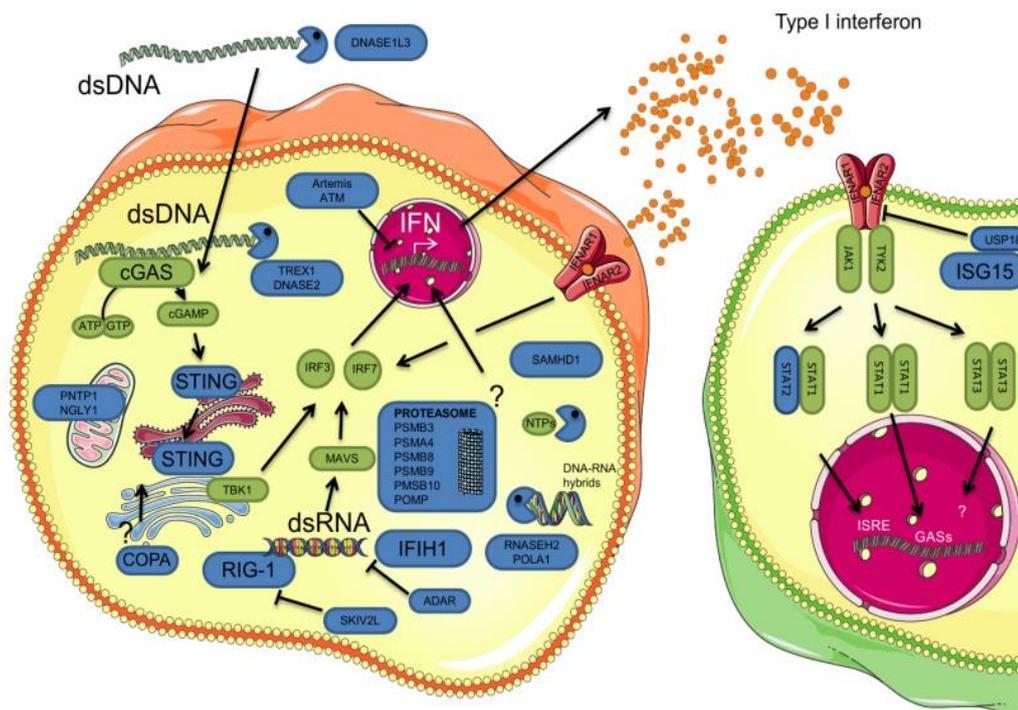


Figura 1: Schema del riconoscimento degli acidi nucleici a livello citoplasmatico, della secrezione dell'interferone di tipo I e attivazione autocrina e paracrina dei recettori IFNAR1-2, con conseguente attivazione della via di segnalazione dell'interferone. Quelle colorate in blu sono alcune delle proteine mutate nelle interferonopatie. cGAMP: cyclic di-GMP-AMP, cGAS: cyclic GMP-AMP synthase, ER: endothelial reticulum, ERGIC: endothelial reticulum-Golgi intermediate compartment, IFIH1: IFN-induced helicase C domain-containing protein 1 (anche definita MDA5), IFNAR: interferon- α receptor, ISG15: interferon-stimulated gene 15, MAVS: mitochondrial antiviral-signaling protein, RIG-I: retinoic acid-inducible gene 1, SAMHD1: deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAM domain and HD domain 1, STING: stimulator of interferon genes, TBK1: TANK-binding kinase 1, TREX1: DNA 3' repair exonuclease 1, USP18: ubiquitin-specific protease 18

La produzione di IFN di tipo I è indotta dal rilevamento degli acidi nucleici da parte dei recettori PRRs (*Pattern Recognition Receptors*), che possono essere localizzati nel citoplasma o negli endosomi delle cellule infette. I PRRs includono i recettori *Toll-like* (TLR), i recettori *RIG-I-like* (RLR), i recettori *NOD-like* (NLR) e una famiglia crescente di recettori del DNA citoplasmatico come AIM2, GMP ciclico-AMP sintasi (cGAS) e la proteina 16 γ -IFN-inducibile (IFI16). Il ruolo di tali sensori nella patogenesi delle interferonopatie di tipo I risulta ormai evidente (46).

Il dsDNA citoplasmatico interagisce con l'enzima cGAS che catalizza la reazione di sintesi del dinucleotide ciclico GMP-AMP (cGAMP) (47). cGAMP lega e attiva la proteina STING, che, una volta attivata, trasloca dal reticolo endoteliale (ER) ai compartimenti intermedi ER-Golgi (ERGIC) (48), dove il segnale si propaga attraverso la fosforilazione della chinasi 1 legante TANK (TBK1) e di una famiglia di proteine chiamate "fattori regolatori dell'IFN" (IRF): IRF3 trasloca nel nucleo e induce la trascrizione di IFN β (49), mentre IRF7 è responsabile dell'induzione di IFN α e dell'amplificazione della segnalazione autocrina mediata dagli IFN di tipo I (50) (*Figura 1*).

Il riconoscimento del dsRNA citoplasmatico da parte di RLRs come RIG-1 determina, invece, la trasmissione del segnale alla "proteina mitocondriale di segnalazione antivirale" (MAVS) che, a sua volta, attiva la via comune dei fattori IRF3 e IRF7 con amplificazione a valle degli interferoni (*Figura 1*).

Una volta attivata la via di segnalazione, le molecole di interferone di tipo I prodotte legano lo stesso recettore eterodimerico, che è espresso da tutte le cellule nucleate ed è costituito da due subunità, IFNAR1 e IFNAR2. Il legame tra l'interferone e una subunità del recettore induce la dimerizzazione di IFNAR1 e IFNAR2, la fosforilazione delle Janus Chinasi (JAK), TYK2 e JAK1, e l'attivazione dei membri della famiglia STAT1 con la formazione di tre complessi principali: l'omodimero pSTAT1, l'omodimero pSTAT3 e l'eterodimero pSTAT1/pSTAT2. Quest'ultimo insieme a IRF9 attiva il fattore di trascrizione IFN-stimulated gene factor 3 (ISGF3), che, legandosi alle sequenze dell'*IFN-stimulated response element* (ISRE), induce la trascrizione di numerosi geni antivirali stimolati dall'interferone (ISGs). L'omodimero pSTAT1 è responsabile della regolazione di sequenze attivate da IFN γ (GASs) per la trascrizione di geni pro-infiammatori. L'omodimero pSTAT3 induce, invece, una soppressione della risposta mediata dall'interferone di tipo I. È stato osservato, infatti, che cellule STAT3- presentano una maggiore espressione genica e una maggiore attività antivirale in risposta all'interferone (51) (*Figura 1*).

Le diverse funzioni effettrici dell'interferone di tipo I dipendono da:

- la diversa affinità del ligando alla subunità del recettore, che correla a sua volta con l'attivazione delle diverse molecole di segnalazione a valle;
- l'espressione del recettore da parte delle cellule bersaglio;
- l'espressione di IFN da parte dei tessuti: infatti, mentre sono rapidamente prodotti e secreti diversi tipi di IFN α nel caso di infezioni dei tessuti linfoidei, quando sono interessate le mucose la risposta antivirale è debole e lenta.

Sono queste alcune delle importanti modalità con cui viene modulata l'attività biologica della via dell'interferone di tipo I, nonostante la presenza di un unico recettore (52).

Una produzione basale di IFN di tipo I è fondamentale per mantenere una condizione di "pronta risposta". Ad oggi sono descritte due diverse funzioni della via dell'IFN di tipo I:

- l'attività antivirale;
- l'attività antiproliferativa.

Il braccio effettrici dell'attività antivirale coinvolge: le cellule dendritiche (DC), che, in seguito alla stimolazione da parte dell'IFN, maturano, migrano e aumentano la presentazione dell'antigene; le cellule natural killer (NK), che aumentano la loro attività citotossica e la secrezione di IFN γ ; i linfociti T, che aumentano l'espressione di MHC di classe I e, più in particolare, le cellule T CD4⁺ e CD8⁺, che proliferano e differenziano verso il fenotipo Th1; i linfociti B, che si differenziano in cellule secernenti immunoglobuline.

L'attività antiproliferativa, invece, è mediata dalla down-regolazione di c-myc, dall'attivazione delle vie di segnalazione di Crk e dall'induzione di chinasi ciclina-dipendenti (Cdk); il tutto provoca l'arresto in fase G1 del ciclo cellulare.

Mentre l'attività antivirale è mediata da tutti i tipi di IFN, anche a concentrazioni molto basse e nella maggior parte delle cellule, l'attività antiproliferativa è altamente cellulo-specifica e richiede un'elevata espressione di IFN e dei suoi recettori, oltre che un'adeguata affinità di legame fra questi. È comprensibile che, accertato l'elevato grado di conservazione della via dell'IFN di tipo I fra le specie, mutazioni germinali che ne compromettono le funzioni predispongano allo sviluppo di gravi malattie virali. Ne sono un esempio l'encefalite herpetica in pazienti con mutazioni di UNC93B, TL3, TRAF3, TRIF E TBK1 e una forma di influenza potenzialmente letale osservata in pazienti con mutazioni di IRF7 (53,54).

La maggior parte delle mutazioni geniche implicate nella patogenesi delle interferonopatie sono a carico di geni coinvolti nel metabolismo e nel riconoscimento degli acidi nucleici e nella trasduzione del segnale.

Vi sono, infatti, mutazioni a carico di enzimi che hanno il compito di evitare un accumulo di DNA, RNA e molecole ibride di DNA e RNA, tra cui la DNA 3'-repair exonuclease 1 (TREX1) e la ribonucleasi H2 (RNASEH2), che provvedono alla degradazione degli acidi nucleici (55), SAMHD1, che limita la disponibilità di deossinucleotidi citosolici (dNTP) (56), e l'adenosina deaminasi RNA-specifica 1 (ADAR1), che elabora il dsDNA endogeno, impedendone il riconoscimento da parte del recettore citosolico IFIH1 (57). In questi casi la patologia è causata da un'aumentata concentrazione di acidi nucleici rilevata dai sensori cellulari.

Sono state inoltre osservate mutazioni attivatorie dei recettori dell'acido nucleico IFIH1 e RIG-I (58), responsabili della sindrome di Aicardi-Goutières e della sindrome di Singleton-Merten, e mutazioni attivatorie di STING, alla base della sindrome SAVI (59). Nelle sopracitate sindromi la patologia è determinata da un'attivazione costitutiva dei recettori o delle molecole a valle responsabili dell'amplificazione del segnale.

Infine, alcune interferonopatie sono causate da mutazioni a carico di proteine che svolgono un'azione inibitoria nei confronti della risposta dell'interferone, col fine di prevenire la tossicità di un'eccessiva funzione delle molecole effettrici; ne sono un esempio il deficit di ISG15 e il deficit di USP18. USP18 è una proteasi ubiquitina-specifica, che, essendo stabilizzata da ISG15, impedisce il legame fra JAK1 e la subunità IFNAR2 del recettore dell'interferone. Se queste due proteine risultano mutate ne consegue un'incontrollata attivazione della via interferonica. Recentemente è stata osservata una nuova mutazione anch'essa responsabile di un difetto nella regolazione del segnale del recettore dell'interferone. Si tratta di una mutazione a carico di STAT2, proteina che, se alterata, non riesce a trasferire in modo adeguato USP18 a IFNAR2, impedendo, quindi, a USP18 di regolare negativamente la risposta di IFN I (60,61).

Trattandosi di patologie con un'ampia eterogeneità clinica, si ritiene che oggi le interferonopatie di tipo I debbano essere incluse nella diagnosi differenziale di pazienti pediatrici con patologie reumatologiche a presentazione atipica, soprattutto qualora manifestino quadri clinici caratterizzati dalla presenza di geloni, lipodistrofia, vasculopatia cutanea, artralgie e/o artrite, pneumopatia infiammatoria, ipertensione arteriosa polmonare e sintomi tipici di sindromi simil-influenzali, TORCH-like e SLE-like (62).

Riassumendo, l'eccessiva produzione di IFN tipo I può essere determinata da 3 differenti vie patogenetiche:

- Difetto delle nucleasi (TREX1, DNase II, SAMHD1, ADAR1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C) che porta all'accumulo di acidi nucleici endogeni;
- Attivazione costitutiva o maggiore sensibilità di un sensore immunitario (IFIH/MDA5 e DDX58/RIG-I) e di molecole adattatrici a valle dei sensori innati (TMEM173/STING);
- Difettoso feedback negativo della via dell'interferone (ISG15, USP18, OTUD1, ACP5/TRAP);

Altri sottoinsiemi, più rari, di interferonopatie di tipo I sono PRAAS/PSMB8 e XLRPD/POLA1.

Di seguito vengono elencate le mutazioni genetiche e i corrispettivi fenotipi clinici delle Interferonopatie di tipo I associate a Lupus Monogenico.

3.2.2. TREX1

TREX1, anche chiamata DNase III, è la principale endonucleasi dei mammiferi, risiede nel citosol e agisce sia sul DNA a singolo che a doppio filamento; taglia i nucleotidi spaiati e alterati partendo dall'estremità 3' del filamento e degrada il DNA derivante da retrovirus e retrotrasposoni. Le mutazioni *loss-of-function*, sia in eterozigosi che recessive, del gene di TREX1 correlano con un'attività endonucleasica deficitaria. Alcune mutazioni, come p.Asp200Asn (D200N) e p.Asp18Asn (D18N), sono collegate ad un fenotipo dominante. La differente modalità di ereditarietà influenza l'entità dell'effetto delle varianti causanti malattia sull'attività di degradazione svolta dalla DNase. In particolare, le mutazioni a ereditarietà dominante coinvolgono il sito catalitico e compromettono il legame del DNA patogeno, che deve essere eliminato, all'enzima.

Gli elevati livelli di acidi nucleici, non sufficientemente rimossi da TREX1 mutata, sono riconosciuti dal sensore citoplasmatico cGAS che attiva la via di segnalazione STING-mediata, con produzione degli interferoni di tipo I. Quando la stimolazione è eccessiva può innescarsi un meccanismo di autoimmunità.

Pazienti affetti da questa mutazione hanno un'espressività clinica variabile e, sorprendentemente, una bassa penetranza. Lesioni cutanee blu-rossastre, indotte dal freddo, alle estremità distali (dita di mani e piedi, punta del naso, punta delle orecchie) riferibili a Lupus gelone familiare (FCL), alti titoli di multipli autoanticorpi, ipergammaglobulinemia e vasculopatia retinica associata a leucodistrofia cerebrale (RVCL) sono caratteristiche tipiche del deficit di TREX1. In alcuni casi, oltre a queste caratteristiche cliniche, sono stati riportati casi di manifestazioni neurologiche ad esordio infantile: encefalopatia con calcificazioni dei gangli basali, lesioni della sostanza bianca e linfocitosi cerebrospinale, che rientrano nel quadro della Sindrome di Aicardi-Goutières (AGS). Il coinvolgimento neurologico progressivo porta a gravi disabilità intellettuali e fisiche nella stragrande maggioranza dei pazienti.

Le mutazioni di TREX1 sono state individuate in circa il 25% dei pazienti con AGS e fino al 2% dei pazienti con SLE. Tra i soggetti con questa alterazione circa il 60% è documentato avere almeno una delle seguenti caratteristiche del Lupus: anticorpi contro gli antigeni nucleari estraibili (ENA), ANA e anti-dsDNA, trombocitopenia, leucopenia, lesioni cutanee, ulcere orali e artrite. In particolare per quanto concerne le lesioni cutanee, il 18% dei casi di FCL evolvono in SLE. Rare varianti nel gene TREX1 sono state osservate anche in altre malattie autoimmuni, tra cui la Sindrome di Sjogren e la sclerosi sistemica (55,63).

3.2.3. DNase II

La DNase II è la più importante endonucleasi lisosomiale, svolge un ruolo fondamentale nella degradazione del DNA esogeno incorporato tramite endocitosi. Le mutazioni presenti nel gene DNase II sono associate ad una perdita di funzione nucleasica e ad un aumento della cascata interferonica.

Durante lo sviluppo fetale l'eritropoiesi avviene nel fegato ed è proprio la DNase2 ad occuparsi della degradazione lisosomiale dei nuclei degli eritroblasti, dopo che questi vengono fagocitati dalle cellule di Kupffer. Il deficit di DNase2, quindi, causa un accumulo dei nuclei all'interno delle cellule di Kupffer e un'attivazione della via dell'interferone di tipo I, che porta allo sviluppo di epatite infiammatoria e di anemia.

Il deficit di DNase2 nel topo risulta incompatibile con la vita; infatti in questi animali è stata osservata la morte in utero dovuta a epatite infiammatoria associata ad anemia (64).

Nell'uomo sono state riscontrate mutazioni bialleliche nel gene DNase II che codifica per l'omonima endonucleasi, con conseguente perdita di funzione di quest'ultima nella clearance di materiale nucleare. Il fenotipo clinico correlato a questa mutazione si manifesta con un esordio severo di anemia neonatale associata a epatite colestatica e pancitopenia che richiede numerose trasfusioni di sangue e piastrine. L'epatite tende a risolversi nelle prime settimane di vita, ma il danno epatico residua con epatosplenomegalia e quadri fibrotici, che in alcuni casi possono evolvere in cirrosi. La pancitopenia migliora con la crescita anche se trombocitopenia, neutropenia, ipogammaglobulinemia e anemia tendono a ripresentarsi nel corso della vita. Gli episodi di febbre ricorrente sono frequenti, così come il coinvolgimento renale che si presenta con proteinuria e glomerulonefrite membranoso-proliferativa alla biopsia renale. Dal punto di vista neurologico, l'imaging cerebrale mostra alcune lesioni subcorticali non specifiche della sostanza bianca, in assenza di segni neurologici evidenti, inoltre, alcuni pazienti presentano difficoltà di apprendimento per cui necessitano di un aiuto scolastico supplementare. A livello articolare possono manifestarsi casi di artrite deformante non erosiva, simile all'artropatia di Jaccoud tipica del lupus, e aspetti infiammatori/vasculitici a carico della cute. Infine, il titolo anticorpale ANA e anti-dsDNA può mostrarsi significativo in alcuni pazienti. Così come per i deficit delle altre DNase, anche in questo caso si evidenzia una predisposizione allo sviluppo di SLE: spesso alla diagnosi, essendo l'esordio precoce, non tutti i pazienti soddisfano i criteri del lupus, ma la presenza di depositi di immunocomplessi alla biopsia renale e la fluttuante elevazione degli anticorpi anti-DNA, suggeriscono una possibile evoluzione a SLE (65).

3.2.4. SAMHD1

SAMHD1 è una trifosfoidrolasi dGTP-dipendente costituita dal dominio SAM e dalla proteina 1 contenente il dominio HD: è responsabile della regolazione dei livelli intracellulari di deossinucleosidi trifosfati (dNTPs) che sono gli elementi costitutivi della sintesi del DNA. Fisiologicamente SAMHD1 promuove la stabilità cellulare, previene la trascrizione inversa dei retrovirus e svolge un ruolo nella risposta immunitaria antivirale; la sua carenza, invece, si traduce in un pool squilibrato di dNTPs, con conseguente perdita di replicazione e riparazione del DNA, danno al DNA e successiva apoptosi cellulare dovuta ad un guasto nel ciclo cellulare e ad un'aumentata senescenza delle cellule.

Questo incrementato danno al DNA e accumulo di dNTPs viene percepito come pericolo dall'immunità innata che, quindi, si attiva e scatena un'aumentata produzione di IFN di tipo I (66).

La mutazione in eterozigosi di SAMHD1, che causa la sostituzione di un'asparagina con un'isoleucina nell'amminoacido 201(I201N), è stata dimostrata in due pazienti, madre e figlio, entrambi affetti da un quadro severo di FCL con esordio precoce e severo di lesioni cutanee a mani, piedi, naso, orecchie, scatenate dal freddo e più tipiche della stagione invernale; durante il periodo estivo, si presentava un'elevata sensibilità alla luce solare con tendenza allo sviluppo di reazioni simili a scottature in seguito a minima esposizione al sole. Tutte le analisi del sangue erano in ordine, compreso l'ampio pannello di autoanticorpi, il complemento e lo screening per crioglobuline, agglutinine e porfiria. Da questo si può presupporre che la mutazione di SAMHD1 sia la causa patogenetica di questo particolare quadro clinico (67).

Un altro fenotipo clinico, peculiare della mutazione nel gene di SAMHD1, si è manifestato in una coppia di fratelli, che oltre al classico quadro neurologico e cutaneo di AGS, presentava una forma di artropatia deformante, cronica e progressiva con contratture delle articolazioni distali e ulcere orali ricorrenti. Questa "scoperta" ha ampliato lo spettro di manifestazioni AGS-correlate e ha sottolineato la necessità di prendere in considerazione mutazioni di SAMHD1 in questi pazienti (68).

Le varianti patogenetiche di SAMHD1 sono implicate sicuramente nella patogenesi di AGS, ma sono state riscontrate anche in pazienti affetti da SLE e FCL, determinando uno spettro fenotipico vario e, per certi aspetti, simile alla mutazione in TREX1 (16).

3.2.5. RNaseH2A, RNaseH2B, RNaseH2C

La ribonucleasi H2 (RNaseH2) è un enzima coinvolto nella sorveglianza e nella riparazione degli acidi nucleici, è espresso in tutte le cellule e si occupa di rimuovere i ribonucleotidi dai complessi ibridi di RNA/DNA o dai singoli filamenti di RNA. Tre geni differenti codificano per le 3 subunità dell'enzima che sono: RNaseH2A, RNaseH2B, RNaseH2C. Mutazioni in questi 3 geni determinano un deficit di funzione del complesso enzimatico, un accumulo di ribonucleotidi durante la replicazione e un danno cronico al DNA, cui consegue un'attivazione della via di segnalazione di p53 e un'aumentata produzione di IFN di tipo 1 (69).

Le mutazioni nei 3 geni codificanti per RNaseH2 sono state associate a quadri clinici di AGS e SLE: circa $\frac{1}{3}$ dei pazienti con varianti patogenetiche in questo complesso enzimatico e affetti da AGS presentano un quadro di positività ANA. Il sequenziamento di questi geni, in 600 soggetti con SLE, ha identificato 18 varianti patogenetiche rare in tutte e 3 le subunità dell'enzima. Un ulteriore esame di queste varianti ha mostrato che 17 su 18 provocano una perdita di stabilità enzimatica e una grave compromissione della funzionalità di RNaseH2, con un conseguente aumento del rischio di sviluppare Lupus. Clinicamente, questi pazienti presentano quadri di artrite, linfopenia e positività autoanticorpale; il coinvolgimento degli organi interni è meno comune, ma molto evidenti sono le manifestazioni cutanee e l'elevata fotosensibilità. A riguardo di questa spiccata sensibilità all'esposizione solare, si è evidenziato un *link* tra carenza di RNaseH2 e fotosensibilità che potrebbe concretamente giustificare l'ormai nota cooperazione tra fattori genetici e ambientali nel ruolo patogenetico della luce UV in SLE (70).

3.2.6. ADAR1

L'adenosina deaminasi 1 RNA-specifica, codificata dall'omonimo gene presente sul cromosoma 1, è un enzima ampiamente espresso che è coinvolto nel rimaneggiamento dell'RNA a doppio filamento. In particolare, questa deaminasi si occupa dell'editing da adenosina a inosina (A-to-I) del dsRNA, che è una modifica post-trascrizionale molto utile per prevenire il riconoscimento di RNA endogeno da parte dei sensori cellulari. ADAR1, è un importante regolatore negativo della via di segnalazione MDA5 mediata, con conseguente controllo dell'autoimmunità e della produzione di IFN tipo I e ISGs (71).

Mutazioni nel gene ADAR1 si sono dimostrate coinvolte sia in pazienti affetti da AGS che da SLE. Nove diverse varianti eterozigote sono state descritte in AGS (57); uno studio su 28 pazienti, con varianti patogenetiche nel gene, ha rivelato che 7 su 28 (25%) presentavano caratteristiche di malattie autoimmuni come SLE, ipotiroidismo, FCL, gastrite autoimmune e neuropatia periferica demielinizzante, sottolineando come questa forma mutata di deaminasi sia legata a condizioni di autoimmunità (72).

È interessante ricordare che la mutazione in ADAR1 è coinvolta, anche, in una rara patologia cutanea, nota come discromatosi simmetrica ereditaria (DSH) o acropigmentazione reticolata di Dohi, che si è dimostrata essere associata a forme cutanee di SLE.

Questa condizione clinica è caratterizzata dalla presenza di macule iper/ipopigmentate disposte a reticolo e distribuite simmetricamente su viso, tronco e estremità degli arti quali mani e piedi (73).

3.2.7. IFIH1 / MDA5

Il gene IFIH1 (*interferon induced with helicase C domain 1*), localizzato sul cromosoma 2, è costituito da 16 esoni e codifica la proteina MDA5 (*melanoma differentiation-associated protein 5*). IFIH appartiene alla famiglia RIG-I-like ed è coinvolto nella via di segnalazione dell'interferone di tipo I. Infatti, MDA5 è un recettore citoplasmatico che riconosce e lega l'RNA a doppio filamento (dsRNA) e promuove l'attivazione di MAVS, che a sua volta scatena la cascata interferonica. Questo meccanismo ha un ruolo essenziale nell'innescare di risposte antivirali, ma una sua iperattivazione, o una sua difettosa regolazione negativa, è anche alla base di molti quadri autoimmuni e infiammatori (58).

Mutazioni attivanti (*GoF*, *gain-of-function*) di IFIH1 possono determinare lo sviluppo di quadri precoci simil SLE e AGS, con un importante coinvolgimento muscoloscheletrico, che ricorda l'artropatia di Jaccoud (74).

Mutazioni attivanti in eterozigosi di IFIH1 sono correlate a fenotipi clinici severi di SLE, AGS, FCL e della Sindrome di Singleton–Merten. Quest'ultima è caratterizzata da calcificazione aortiche, ritardo nella dentizione con precoce caduta dei denti permanenti, osteopenia, acro-osteolisi, psoriasi e glaucoma (75).

In una coorte di 563 pazienti affetti da SLE, è stato dimostrato che il polimorfismo a singolo nucleotide p.Ala946Thr (rs1990760) di IFIH1 si associa a un aumento di anticorpi anti-dsDNA e ad un'espressione maggiore di ISGs. Questo determina un elevato rischio di sviluppare Lupus con un esordio precoce e severo. Tuttavia questa variante genetica non è solo responsabile di una maggiore suscettibilità per SLE, ma è anche correlata ad insorgenza di diabete mellito di tipo 1, sclerosi multipla e artrite reumatoide (76).

Il sequenziamento dell'intero esoma (WES) ha rivelato una mutazione de novo p.Arg779His di IFIH1 in una ragazza belga di 16 anni che manifestava una forma grave e precoce di SLE, deficit di IgA e lieve spasticità degli arti inferiori, senza manifestazioni neuroradiologiche associate. La stessa mutazione è stata recentemente identificata anche in pazienti con AGS.

Questa scoperta aggiunge una nuova mutazione genetica al Lupus Monogenico ed estende notevolmente lo spettro di malattie associate a IFIH1, che vanno dall'encefalopatia infiammatoria a forme di malattia autoimmune sistemica prototipica. Inoltre, questa marcata eterogeneità fenotipica, che si presenta nonostante l'identica mutazione come substrato, mette in luce il ruolo svolto dai fattori modificanti nelle patologie IFN-dipendenti causate da IFIH1 (77).

3.2.8. DDX58 / RIG-I

Il gene DDX58 codifica per un recettore dell'RNA virale a doppio (dsRNA) e a singolo (ssRNA) filamento noto come *retinoic-acid-inducible gene 1* (RIG-I). Questo recettore è membro della famiglia dei sensori citoplasmatici RIG-I like (RLR), di cui fa parte anche IFIH1/MDA5. Dopo il legame con l'RNA nel citoplasma, RIG-I passa ad una conformazione aperta, si porta in prossimità dei mitocondri ed interagisce con MAVS per indurre, tramite IRF3 e IRF7, la produzione di IFN di tipo I. DDX58 si attiva sicuramente in seguito a stimoli virali, ma può partecipare anche ad altri eventi biologici come proliferazione cellulare, apoptosi, senescenza e può essere coinvolto in risposte infiammatorie e autoimmuni, soprattutto in seguito ad una sua iperstimolazione (78).

È stato dimostrato che mutazioni attivatorie di DDX58 determinano una Sindrome di Singleton-Merten (SMS) atipica. Mentre la SMS classica ha, fra le caratteristiche principali, la presenza di anomalie dentarie, la forma atipica si distingue per la loro assenza; sono, invece, presenti anomalie scheletriche, calcificazioni aortiche e glaucoma. Attraverso la tecnica WES sono state identificate due varianti di DDX58: p.Glu373Ala e p.Cys268Phe correlate a queste forme tronche di SMS. Il fenotipo generale della malattia in questi pazienti è meno aggressivo e con una prognosi migliore; il motivo per cui queste mutazioni non causano, apparentemente, infiammazione o autoimmunità sistemica non è, ad oggi, ancora noto, anche se l'iperattivazione della via di segnalazione dell'IFN di tipo I è accertata e un meccanismo di regolazione negativo potrebbe giovare l'inibizione del segnale RLR-IFN (79).

3.2.9. TMEM173 / STING (SAVI)

Il gene TMEM173, situato sul cromosoma 5, codifica per STING, una proteina transmembrana dimerica situata sul reticolo endoplasmatico che svolge il ruolo essenziale di sensore dei dinucleotidi ciclici (CDNs) e del dsDNA citoplasmatico.

In condizioni normali, l'attivazione di STING da parte del suo ligando, cGAMP, determina la produzione di IFN di tipo I, attraverso messaggeri a valle come TBK1 e IRF-3 (80).

Mutazioni patogenetiche in eterozigosi dell'esone 5 di TMEM173 codificano per una forma costitutivamente attiva di STING. I dimeri che formano la proteina rafforzano la loro stabilità e da questo ne consegue una stimolazione della cascata interferonica indipendente dalla presenza dei ligandi citoplasmatici. Il fenotipo clinico correlato a questa attivazione costitutiva della via STING-IFN è una vasculopatia a esordio infantile (*STING-associated vasculopathy with onset in infancy o SAVI*). SAVI è una patologia autoimmune e autoinfiammatoria che rientra nel capitolo delle interferonopatie di tipo I con manifestazioni SLE-like. I pazienti con un quadro clinico più grave si presentano con un'inflammatione sistemica precoce caratterizzata da: interstiziopatia polmonare, inizialmente asintomatica, con successiva evoluzione in fibrosi polmonare, accessi febbrili ricorrenti, anemia cronica, disturbi della crescita e manifestazioni muco-cutanee. Queste ultime comprendono rash malare, placche eritematose, noduli, lesioni indotte dal freddo simil lupus gelone che possono anche evolvere in ulcere e amputazioni periferiche, aftosi orale, perforazione del setto nasale e fenomeno di Raynaud. Gli anticorpi anti-fosfolipidi sono presenti in 5 pazienti su 6 e un basso titolo ANA è stato rilevato nella metà dei bambini. Le caratteristiche sopra elencate imitano molto la clinica del lupus, tuttavia, questi pazienti difficilmente soddisfano i criteri diagnostici di SLE (59).

In uno studio è stata presa in considerazione una famiglia non consanguinea di discendenza europea con 4 membri affetti da condizioni autoimmuni e infiammatorie sistemiche, incluso il lupus. Negli individui affetti è stata dimostrata questa mutazione di TMEM173 con guadagno di funzione di STING. Un individuo è stato diagnosticato come cSLE all'esordio della sintomatologia, gli altri 3 hanno avuto un'insorgenza di malattia dopo i 12 anni. Questo dimostra come, fra l'ampio spettro di fenotipi legati a questa mutazione, rientrino quadri clinici simil SLE (81).

In modelli murini di SLE, l'anormale cascata di segnalazione STING-mediata nelle cellule dendritiche può alterare lo sviluppo follicolare delle cellule T CD4+, attivare le cellule B e le plasmacellule e promuovere la produzione di anticorpi anti-dsDNA, dimostrando come questi meccanismi siano implicati nella patogenesi di malattie autoimmuni (82).

L'espressione genica di cGAS si è confermata elevata nel 50% dei soggetti con lupus, anche cGAMP (prodotto dall'attività enzimatica di cGAS), ha mostrato lo stesso trend di aumento seppur in una porzione minore di pazienti. Questi dati ci permettono di confermare come questa cascata di segnalazione a monte e a valle di STING sia anormalmente iperespressa in alcuni pazienti con diagnosi di SLE (83).

3.2.10. ISG15 e USP18

ISG15 (*Interferon-stimulated gene 15*) è una proteina ubiquitina-simile, inducibile dall'interferone e codificata dall'omonimo gene presente sul cromosoma 1, che stabilizza i livelli della peptidasi 18 ubiquitina-specifica (*ubiquitin-specific peptidase 18 o USP18*). USP18 è un potente regolatore negativo della via di segnalazione dell'IFN α - β . In assenza di ISG15, USP18 è degradato dal proteasoma con conseguente via libera alla segnalazione attraverso il recettore IFNAR e maggiore attività antivirale per incremento di citochine interferoniche (61).

Mutazioni bialleliche ereditate recessivamente nei due geni, ISG15 e USP18, determinano una risposta potenziata da parte dell'IFN di tipo I, con conseguenze autoinfiammatorie, in quanto viene meno la regolazione negativa. Ne consegue un ampio spettro di manifestazioni neurologiche e immunologiche tra cui: calcificazioni dei gangli della base, AGS, sindromi pseudo-TORCH, crisi epilettiche e la suscettibilità mendeliana alle malattie micobatteriche. Quest'ultima patologia, MSMD, è una sindrome rara, legata a immunodeficienza, caratterizzata da elevata suscettibilità a infezioni micobatteriche poco virulente e dovuta ad un'insufficiente produzione di IFN γ ISG15-dipendente (61,84).

Livelli significativamente più elevati di ISG15 sono stati evidenziati in pazienti con diagnosi di SLE, soprattutto se era presente linfocitopenia prima del trattamento, suggerendo come questa proteina potrebbe rientrare fra i possibili biomarker del lupus, oltre che per altre interferonopatie. Inoltre, i livelli di ISG15 presentano una correlazione con il livello di attività della malattia, sottolineando quanto sia effettivamente coinvolto nella patogenesi di SLE (85).

3.2.11. OTUD1

Il gene OTUD1 codifica per una deubiquitinasi ampiamente espressa che svolge un ruolo nella regolazione del fattore di trascrizione IRF3. In particolare, OTUD1 rimuove le catene poli-ubiquitinate, collegate a K63 e presenti su IRF3, con il fine di impedire la sua traslocazione nucleare e con la conseguente soppressione della cascata interferonica.

I pazienti con mutazioni *loss-of-function* in OTUD1 hanno una ridotta attività deubiquitinasi, viene ad essere compromessa l'inibizione negativa e, di conseguenza, si presentano diverse patologie autoimmuni tra cui, comune, è la diagnosi di SLE (86).

3.2.12. ACP5 / TRAP (SPENCD)

Il gene ACP5 codifica per la fosfatasi acida tartrato-resistente (TRAP), un enzima espresso principalmente in cellule monocitiche tra cui osteoclasti, macrofagi e cellule dendritiche. TRAP regola i livelli di fosforilazione dell'osteopontina (OPN), che è una citochina necessaria per la produzione di IFN di tipo I da parte delle cellule dendritiche plasmacitoidi in seguito alla stimolazione TLR9. In particolare TRAP degrada e/o inibisce l'OPN catalizzando la sua defosforilazione. Quando l'espressione di questa fosfatasi è diminuita, OPN è attiva perché si trova nel suo stato fosforilato. In questa condizione stimola continuamente la via di segnalazione TLR9 che a cascata determina la traslocazione nucleare di IRF7 e NFkB, a cui consegue l'aumentata espressione di IFN di tipo I, IL-6 e TNF (87).

Mutazioni autosomiche recessive nel gene ACP5 provocano una carenza di TRAP che è correlata alla spondiloencondrodisplasia (SPENCD), una sindrome immuno-ossea caratterizzata sia da manifestazioni neurologiche che da autoimmunità. Le anomalie scheletriche come platispondilia, encondromatosi metafisaria e diafisaria, che spesso esitano in bassa statura, sono i segni clinici distintivi di SPENCD. Tuttavia, fra i quadri neurologici sono frequenti anche le calcificazioni cerebrali ai gangli della base, la spasticità, l'epilessia e i ritardi di crescita e sviluppo; fra le forme autoimmuni si possono presentare casi di porpora trombocitopenica, di anemia emolitica, di sindrome di Sjögren, di tiroidite e soprattutto, di particolare interesse, diversi quadri di SLE ad esordio infantile.

In diversi studi clinici, sono stati analizzati pazienti affetti da SPENCD, con mutazione causante deficit di TRAP, che presentavano anche caratteristiche cliniche tipiche del lupus come: trombocitopenia, nefrite lupica di grado IV alla biopsia renale, artrite/artralgia, pannello anticorpale positivo per ANA, anti-dsDNA, anti-fosfolipidi e ipocomplementemia.

Alcuni di questi pazienti soddisfacevano anche i criteri clinici diagnostici di SLE dell'*American College of Rheumatology* (ACR). Tutto questo supporta la tesi secondo cui varianti patogenetiche di ACP5, che compromettono la funzione della fosfatasi, aumentano la suscettibilità per Lupus sporadico/monogenico a esordio infantile, soprattutto in quei casi in cui le caratteristiche di autoimmunità sono associate a bassa statura e a disturbi scheletrici (87,88).

3.3. Perdita di tolleranza delle cellule B o T

Il segno distintivo di SLE è la presenza di una vasta gamma di autoanticorpi che sottendono la presenza di linfociti autoreattivi. L'eliminazione inefficace di queste cellule B o T "fuori controllo" potrebbe interrompere l'auto-tolleranza e innescare l'autoimmunità.

I linfociti B svolgono un ruolo chiave, più di altre tipologie cellulari del sistema immunitario innato e adattativo, nella patogenesi delle malattie autoimmuni. Durante il processo di sviluppo delle cellule B, il fallimento nella rimozione di linfociti autoreattivi, anche detto selezione negativa inadeguata, può portare alla perdita di tolleranza. I meccanismi autoimmuni potrebbero essere impediti se venissero correttamente rimossi tutti quei linfociti B che, attraverso il loro recettore (BCR), riconoscono autoantigeni self nelle varie fasi di checkpoint (89).

Di seguito vengono riportate le anomalie di segnalazione delle cellule B e T più studiate e conosciute, e anche attualmente ritenute alla base di forme monogeniche di SLE.

3.3.1. PRKCD / PKC δ

Il gene PRKCD codifica per la proteina chinasi C- δ (PKC δ) che è implicata nella regolazione dell'apoptosi, della sopravvivenza e della proliferazione dei linfociti. Essendo una chinasi con funzione pro-apoptotica, una sua ridotta espressione porta ad un accumulo di cellule B di transizione immature potenzialmente patogene (90).

I modelli murini, PRKCD *knockout* e con deficit di PKC δ , hanno mostrato una selezione negativa compromessa, con conseguente proliferazione incontrollata delle cellule B autoreattive nei tessuti periferici e manifestazioni cliniche simil-lupus quali: glomerulonefrite, linfadenopatia, splenomegalia e titoli autoanticorpali positivi (91).

Una mutazione in omozigosi di PRKCD è stata identificata in 3 fratelli con esordio infantile di cSLE, figli di genitori consanguinei. Tutti e 3 soddisfacevano i criteri ACR per il lupus e presentavano le seguenti caratteristiche cliniche: eruzioni cutanee, nefrite lupica, complemento normale, positività di ANA, ENA e anti-dsDNA. Linfadenopatia, epatomegalia e splenomegalia, segni suggestivi di malattia linfoproliferativa, sono stati evidenziati in 2 dei 3 fratelli. L'immunofenotipo rivelava una carenza di cellule B mature e memoria, mentre mostrava un'eccessiva espansione di B immature (92).

Successivamente, altri 4 bambini con manifestazioni simil-SLE ad esordio precoce sono stati descritti. Presentavano forme di lupus cutaneo, nefrite lupica, citopenie, alti titoli autoanticorpali, linfadenopatie ed epatosplenomegalia, sempre associate a forme mutate e deficitarie di PKC δ . Oltre a questi quadri clinici, tipiche di questa mutazione sono anche: l'alopecia, la suscettibilità, da lieve a grave, per infezioni sia batteriche che virali (come l'infezione cronica da EBV e CMV), vasculiti cerebrali e papillomatosi (93–95). Un altro caso ha presentato l'insorgenza di un'immunodeficienza primaria, dovuta a perdita di cellule B, sovrapposta ad un quadro di autoimmunità con glomerulonefrite membranosa, ANA, anti-dsDNA e anticorpi antifosfolipidi (96).

Tutti questi studi hanno messo in evidenza questa nuova mutazione patogenetica che deve essere inclusa nello screening genetico di routine nel sospetto di Lupus Monogenico.

3.3.2. TNFSF13B / BAFF

BAFF (*B-cell activating factor*) è una citochina appartenente alla superfamiglia dei TNF ed è codificata dal gene TNFSF13B, localizzato sul cromosoma 13. BAFF è prodotta principalmente da monociti e neutrofilii e svolge un ruolo cruciale nella sopravvivenza, maturazione, differenziazione e proliferazione dei linfociti B; è una proteina transmembrana, ma attraverso una scissione proteolitica si ottiene la sua forma solubile (sBAFF).

L'iperattività dei linfociti B è un elemento chiave nella patogenesi di SLE, pertanto i fattori, come BAFF, che promuovono sopravvivenza e proliferazione delle cellule B hanno rilevanza nell'insorgenza e nella progressione della malattia. Alcuni polimorfismi nel gene TNFSF13B sono stati correlati con una maggiore suscettibilità per diverse malattie autoimmuni tra cui SLE, artrite reumatoide, sclerosi multipla, sindrome di Sjögren e la porpora trombocitopenica.

I pazienti con lupus mostrano un'elevata espressione di BAFF che correla con l'attività di malattia, inoltre, la sua componente solubile sBAFF è associata a quadri di artrite, aftosi orale, disturbi neurologici, alterazioni ematologiche, nefrite lupica, microalbuminuria e aterosclerosi, che rientrano fra le manifestazioni tipiche di SLE. Da questo si può dedurre come BAFF sia un ottimo biomarcatore dell'attività di malattia nei pazienti con diagnosi di Lupus (97).

3.3.3. RAG1 e RAG2

RAG1 e RAG2 (*recombination-activating 1/2 genes*) sono degli enzimi cruciali nel meccanismo di ricombinazione V(D)J e nella variabilità dei recettori BCR e TCR. Mentre mutazioni recessive *loss-of-function* di RAG1/2 sono associate a immunodeficienze combinate severe con perdita di linfociti T e B (SCID), le varianti patogenetiche ereditate in eterozigosi correlano con l'autoimmunità.

Una mutazione in eterozigosi di RAG2 è stata scoperta in una paziente che presentava un classico fenotipo di Lupus multisistemico con interessamento mucocutaneo (sindrome secca e fenomeno di Raynaud), muscoloscheletrico (artrite e artralgie), sieroso (pleurite e pericardite), renale (nefrite lupica di classe V) e ematologico (leucopenia e linfopenia). Anche il profilo immunologico presentava segni SLE-like, come l'elevato titolo ANA e anti-dsDNA e l'ipocomplementemia.

Mutazioni in eterozigosi composta di RAG1 sono state identificate in una famiglia affetta da SCID che presentava anche forme di citopenia autoimmune e autoanticorpi multipli, compresi quelli anti-IFN α . Il meccanismo alla base della produzione di questi autoanticorpi non è chiaro, si pensa sia attribuibile ad un timo sottosviluppato per via della ridotta espressione di AIRE.

Nonostante siano necessari ulteriori approfondimenti in questo ambito, questi casi sottolineano come RAG1/2 siano coinvolti, non solo in quadri di immunodeficienza, ma anche in alcune patologie autoimmuni (98,99).

3.3.4. FAS / FASL

Il recettore di morte FAS (*Fas Cell Surface Death Receptor*) è una proteina espressa sulla membrana cellulare e fa parte della superfamiglia dei recettori del TNF (TNFRs), che sono caratterizzati dalla presenza di un dominio di morte intracellulare (DD, *death domain*).

L'interazione del recettore FAS con il suo ligando FASL attiva una cascata di segnalazione che coinvolge FADD (*Fas-Associated Death Domain protein*), la caspasi 8 e 10 e svolge un ruolo centrale nella morte cellulare programmata, grazie alla sua funzione pro-apoptotica. Le mutazioni autosomiche dominanti dei geni FAS e FASL provocano una diminuita espressione delle omonime proteine, cui consegue un deficit di rimozione delle cellule autoreattive e un trigger per lo sviluppo di autoimmunità (100).

Un difetto della via apoptotica FAS-FASL causa una sindrome linfoproliferativa con caratteristiche autoimmuni detta ALPS (*autoimmune lymphoproliferative syndrome*). Linfadenomegalia cronica non maligna, epatosplenomegalia, citopenie autoimmuni, presenza di vari autoanticorpi ed espansione di cellule CD3⁺, TCR α/β ⁺, CD4⁺, CD8⁻, T doppio negativi (DNT) sono le caratteristiche principali di questa sindrome. I pazienti con ALPS spesso presentano caratteristiche cliniche simil lupus e mutazioni in questi geni coinvolti nell'apoptosi sono state associate ad entrambe le malattie (101).

I polimorfismi nei geni FAS e FASL hanno dimostrato di aumentare la suscettibilità per SLE. In una coorte di 75 pazienti con diagnosi di lupus è stata identificata una delezione in eterozigosi di 84bp all'interno dell'esone 4 del gene FASL in un uomo di 64 anni. Le sue manifestazioni comprendevano rash malare, artrite, sierosite, nefrite lupica, leucopenia, linfadenopatia generalizzata e dal punto di vista immunologico un titolo anticorpale elevato sia per ANA che per anti-dsDNA. Questa è stata la prima segnalazione di apoptosi deficitaria FASL mediata, conseguente a mutazione del gene corrispondente, in un paziente affetto da SLE e suggerisce come queste alterazioni genetiche possano rientrare fra le cause non comuni di Lupus (102).

3.3.5. RASopatie

Le RASopatie costituiscono un'altra famiglia di patologie legate ai disturbi dell'apoptosi e sono causate da mutazioni dominanti in diversi geni che partecipano alla cascata di segnalazione RAS/MAPK quali: KRAS, NRAS, PTPN11, RAF, SHOC2 e SOS1. Si tratta di un gruppo di disordini del neurosviluppo che comprendono la Sindrome di Noonan (NS) e le sindromi Noonan-correlate (come la sindrome di Costello, la sindrome di Legius e la sindrome di LEOPARD). Bassa statura, malformazioni craniofacciali, collo palmato, malformazioni cardiache, ritardo cognitivo e aumentato rischio di cancro sono le caratteristiche cliniche comuni delle RASopatie, anche se poi ciascuna patologia presenta manifestazioni peculiari.

Fino ad oggi sono stati descritti 12 casi di soggetti affetti da NS o sindromi Noonan-correlate con coesistenti caratteristiche di lupus. Di questi 12 pazienti, 4 avevano mutazioni in SHOC2, 2 in KRAS e 1 PTPN11; i restanti 5, nonostante presentassero fenotipo clinico di RASopatia e SLE come gli altri 7, non sono stati diagnosticati dal punto di vista molecolare.

Nel complesso, la manifestazione più frequentemente segnalata associata a SLE è l'artrite, seguita da pericardite/pleurite, citopenia autoimmune ed eruzioni cutanee. Rispetto al classico fenotipo lupico, sono preponderanti i segni di RASopatia come la prevalenza maschile (F:M 1:2), il minor coinvolgimento della cute e il più alto tasso di sierosite (103–105).

3.3.6. IKZF1 / IKAROS

Il gene IKZF1 codifica per la proteina IKAROS, che è un fattore trascrizionale importante nel processo ematopoietico. Mutazioni in eterozigosi determinano un'emopoiesi anormale, un'immunodeficienza comune variabile (CVID) e caratteristiche di autoimmunità (106). Alcuni pazienti hanno manifestato fenotipi simil lupus e porpora trombocitopenica autoimmune, in particolare, studi di *genome-wide association* hanno dimostrato che la variante rs1456896 al 5' di UTR in IKZF1 è rilevante nella patogenesi di nefrite lupica (107).

3.3.7. TNFAIP3 / A20 (RELOpatie)

La proteina A20, codificata dal gene TNFAIP3 (*tumor necrosis factor alpha induced protein 3*), è un regolatore negativo chiave di NF- κ B (*TNF-nuclear factor- κ B*), dell'inflammasoma NLRP3 e di altre vie immunitarie di segnalazione. Le mutazioni *loss-of-function* con ereditarietà dominante di TNFAIP3 determinano una patologia autoinfiammatoria ad esordio precoce che assomiglia alla malattia di Behçet con aftosi e stomatite ricorrenti, ulcere genitali e gastrointestinali, detta aploinsufficienza di A20 (HA20).

I pazienti con mutazioni nei geni che regolano la via canonica di NF- κ B possono presentare anche quadri clinici di SLE o di altre malattie autoimmuni come l'artrite reumatoide, la psoriasi, il morbo di Crohn e il diabete mellito di tipo 1. Un paziente con mutazione p.Phe224Serfs*4 è stato diagnosticato come affetto da un quadro clinico di Lupus associato a un coinvolgimento del sistema nervoso centrale e a vasculite (108,109).

3.3.8. ADA2 (DADA2)

Il deficit di adenosina deaminasi di tipo 2 (DADA2) è una rara malattia genetica causata dall'assenza di un enzima essenziale per il corretto sviluppo del sistema immunitario, ossia l'adenosina deaminasi 2 (ADA2). I pazienti affetti da questa patologia manifestano un ampio spettro di disturbi tra cui: vasculite sistemica, eruzioni cutanee, ictus, poliarterite nodosa (PAN) ad esordio precoce, COVID e insufficienza midollare. A queste presentazioni, si aggiungono quadri simil SLE, come riportato in un recente studio clinico (110).

3.3.9. TLR7

Il recettore Toll-like 7 (TLR7) è un sensore di RNA virale che riconosce come ligandi la guanosina e il 2'-3'cGMP. In un recente studio, è stata identificata in una ragazza spagnola, affetta da Lupus sin dall'età di 7 anni, una variante genetica de novo, TLR7 p.Tyr264His, con eredità X-linked dominante. Questa mutazione determina un guadagno di funzione del recettore e una maggiore affinità per i suoi ligandi che sfocia in una sopravvivenza aberrante di cellule B attivate. Il fenotipo clinico comprende: trombocitopenia autoimmune refrattaria, elevato titolo ANA, ipocomplementemia, artralgie, episodi intermittenti di emicorea, lieve insufficienza mitralica, crisi ipertensive e coinvolgimento renale. L'analisi WES di ulteriori pazienti affetti da SLE ha identificato altre due varianti in TLR7 (BI2 F507L e CI1 R28G) correlate con la malattia ad esordio infantile. Questa scoperta evidenzia l'importanza di TLR7 e auto-ligandi contenenti guanosina nella patogenesi di Lupus (111).

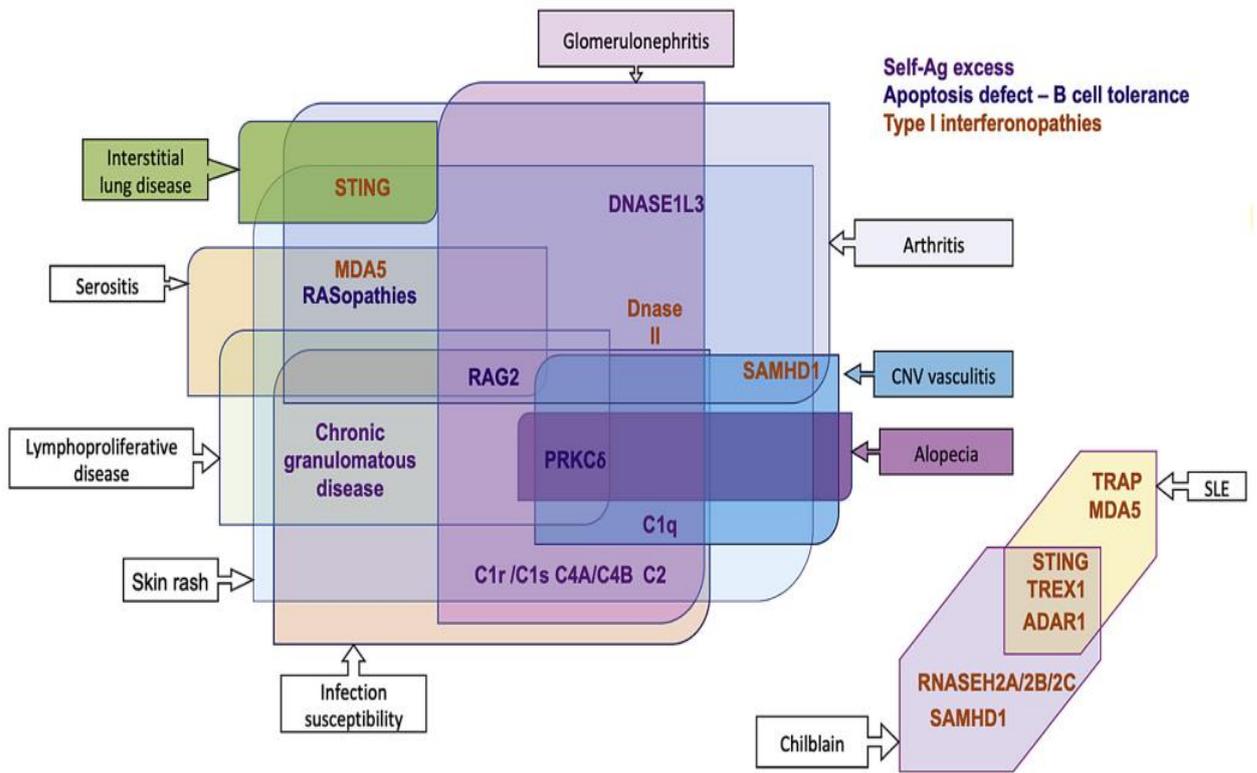


Figura 2: (19) Sintesi delle caratteristiche cliniche del Lupus Monogenico.

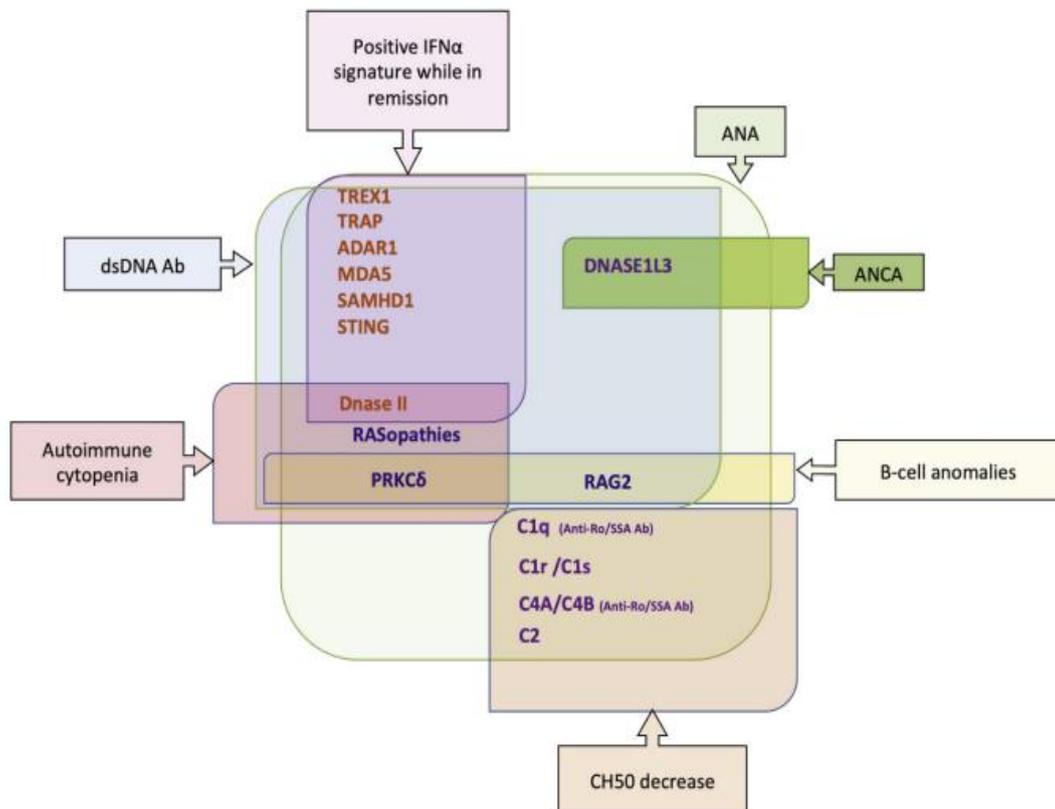


Figura 3: (19) Sintesi delle caratteristiche biologiche del Lupu Monogenico.

Tabella 1: (18) Geni correlati all'insorgenza di Lupus Monogenico e ad altre disregolazioni immunitarie monogeniche con caratteristiche di autoimmunità.

VIA DI SEGNALAZIONE	GENE	PROTEINA	EREDITARIETÀ	FENOTIPO CLINICO
Deficit del complemento	C1q	C1q	AR	SLE, AGS
	C1r/C1s	C1r/C1s	AD	
	C2	C2	AR	
	C4	C4	AR	
Deficit delle DNase extracellulari	DNaseI	DNaseI	AD	HUV, SLE
	DNase1L3	DNase1L3	AR	
Interferonopatie di tipo	DNaseII	DNaseII	AR	HUV, SLE
	TREX1	TREX1	AD/AR	AGS, SLE
	SAMHD1	SAMHD1	AD	AGS, SLE, FCL, CLL, artropatia deformante e ulcere orali ricorrenti
	RNAseH2A RNAseH2B RNAseH2C	RNAseH2A RNAseH2B RNAseH2C	AR	FCL, AGS, SLE

Interferonopatie di tipo I	ADAR1	ADAR1	AR	FCL, AGS, SLE
	IFIH1	MDA5	AD	SLE, AGS, FCL, Sindrome di Singleton-Merton
	DDX58	RIG-I	AD	SMS, glaucoma e anomalie scheletriche
	TMEM173	STING	AD	SAVI, SLE, FCL, SCID
	ISG15	ISG15	AR	Calcificazioni dei gangli della base, AGS, sindrome pseudo-TORCH, MSMD, SLE
	USP18	USP18		
	OTUD1	OTUD1	AR	SLE, malattie autoimmuni
ACP5	TRAP	AD/AR	SPENCD, SLE, malformazioni scheletriche	
Perdita di tolleranza delle cellule B o T	PRKCD	PKC δ	AR	SLE
	TNFSF13B	BAFF		
	RAG1	RAG1	AR	SLE, SCID

Perdita di tolleranza delle cellule B o T	RAG2	RAG2	AD	SLE, SCID
	FAS/FASL	FAS/FASL	AD	SLE, ALPS
	IKZF1	IKAROS	AD	SLE, ITP, CVID
	TNFAIP3	A20	AD	SLE, ALPS, BD-like
	ADA2	ADA2	AR	SLE, DADA2
	TLR7	TLR7	X-linked D	SLE
<u>RASopatie</u>	PTPN11 SOS1 RAF KRAS NRAS SHOC2	PTPN11 SOS1 RAF KRAS NRAS SHOC2	AD	NS, SLE

SLE: systemic lupus erythematosus, SMS: Singleton–Merten syndrome, HUV: hypocomplementemic urticarial vasculitis, AGS: Aicardi-Goutières syndrome, FCL: familial chilblain lupus, CLL: chronic lymphocytic leukemia, MSMD: mendelian susceptibility to mycobacterial disease, SPENCD: spondyloenchondrodysplasia, SAVI: STING-associated vasculopathy with onset in infancy, SCID: severe combined immune deficiency, ALPS: autoimmune lymphoproliferative syndrome, NS: Noonan-related syndrome, DADA2: deficiency of ADA2, BD: Behçet’s disease, ITP: immune thrombocytopenic purpura, CVID: common variant immunodeficiency disease, AR: autosomal recessive, AD: autosomal dominant, D: dominant.

3.4. Diagnosi

Il Lupus Monogenico si caratterizza per l'ampia eterogeneità di manifestazioni sia cliniche che di laboratorio, tanto che può essere "confuso" con altre malattie autoimmuni sistemiche, oppure, può sovrapporsi ad altri disturbi, come le interferonopatie monogeniche. Questa variabilità di presentazioni, ovviamente, inficia l'accuratezza diagnostica, sia nella pratica medica che nella ricerca scientifica.

Ad oggi, la disomogeneità delle presentazioni cliniche, associata alla mancanza di criteri convalidati e approvati per questa patologia, rende il Lupus Monogenico una grande sfida diagnostica, anche per i centri più specialistici. I criteri di classificazione disponibili per SLE devono essere ancora approvati e testati su ampie coorti di pazienti con forme monogeniche di cSLE, prima di poter essere applicati. Pertanto, il parere dell'esperto conserva un ruolo fondamentale nella diagnosi precoce di Lupus pediatrico.

Diverse famiglie di criteri classificativi si sono susseguite nel tempo e sono state utilizzate nell'inquadramento di SLE nel corso degli anni. I criteri dell'*American College of Rheumatology* (ACR) del 1982, e la loro revisione del 1997, sono stati i primi ad essere ampiamente utilizzati in tutto il mondo; prevedono 11 domini totali, senza distinzione tra sottodomini clinici ed immunologici, e per essere soddisfatti necessitano di uno score complessivo di $4/11$. Con il miglioramento delle conoscenze fisiopatologiche della malattia, nel 2012, *Systemic Lupus International Collaborating Clinics* (SLICC) elaborò un nuovo set di criteri che ebbe un largo utilizzo. Le principali innovazioni apportate dagli SLICC-2012 prevedono una migliore caratterizzazione delle manifestazioni cutanee, neurologiche, renali ed ematologiche, oltre che una distinzione tra clinica e sierologia, che permette di conferire un maggior peso al riscontro di autoanticorpi e ipocomplementemia. Infine, nel 2017, la *European League Against Rheumatism* (EULAR) e l'ACR diedero il via ad una collaborazione per la stesura di nuovi criteri di classificazione, che si concluse con la pubblicazione degli EULAR/ACR-2019, molto più sensibili e specifici dei precedenti. Un riscontro positivo di ANA 1:80 è il requisito cardine di ingresso, seguito da 7 domini clinici (costituzionale, mucocutaneo, muscoloscheletrico, neurologico, sieroso, renale, ematologico) e 3 immunologici (antifosfolipidi, complemento, anti-dsDNA/ autoanticorpi specifici). Un punteggio finale di almeno 10 è considerato il limite necessario per la classificazione SLE.

La revisione degli esistenti criteri diagnostici sarà necessaria per la classificazione del Lupus Monogenico, dopo che verranno adeguatamente chiarite tutte le vie molecolari causali e saranno riconosciute e delineate le manifestazioni cliniche peculiari di ciascuna alterazione genetica.

È importante sottolineare che questi criteri classificativi non hanno lo scopo di imporre decisioni diagnostiche o terapeutiche, non dovrebbero mai essere utilizzati per escludere i pazienti, che non li soddisfano pienamente, dal ricevere terapie specifiche e appropriate. La diagnosi di SLE e, in particolare, quella di Lupus Monogenico rimane competenza di un medico specializzato e adeguatamente formato per valutare il singolo paziente con un approccio personalizzato e individualizzato (112–114).

Sicuramente, insieme al parere del clinico esperto, trattandosi di disordini genetici, la diagnosi definitiva dovrebbe essere confermata con il sequenziamento genico. Nella maggior parte dei centri vengono utilizzati pannelli diagnostici basati su tecniche di sequenziamento di nuova generazione (NGS, *Next Generation Sequencing*), contenenti i principali geni noti responsabili di malattie autoinfiammatorie e autoimmuni. In centri selezionati, invece, è possibile ricorrere al sequenziamento dell'intero esoma (WES) (10).

3.5. Terapia

Il trattamento del Lupus Monogenico risulta alquanto complesso, sia per la grande variabilità di presentazioni cliniche sia per la resistenza alle terapie convenzionali. I pazienti affetti da questa patologia, difatti, rispondono poco ai farmaci comunemente utilizzati in ambito reumatologico. Traggono solo un parziale beneficio dalla somministrazione di corticosteroidi, a meno che non si somministrino dosaggi molto elevati, come nel caso delle fasi acute di malattia. Tra i DMARDs (*Disease modifying antirheumatic drugs*), Metotrexato, Azatioprina e i principali biologici, fra cui Etanercept, Anakinra, Infliximab, si sono dimostrati inefficaci nella maggior parte dei casi. Unica eccezione riguarda Tocilizumab, che sembra aver apportato beneficio nei casi di neuropatia da deficit di SAMHD1 (115), e Rituximab, utile nei casi associati allo sviluppo di rilevante autoimmunità anticorpale. Micofenolato mofetile è stato utilizzato in casi caratterizzati dalla presenza di nefrite e pneumopatia associati a mutazione di MDA5, sia nel trattamento di SLE che di dermatomiosite e altre malattie autoinfiammatorie (116,117). Tra i farmaci antimalarici, Idrossiclorochina e Mepacrina, essendo in grado di modulare le fasi iniziali della cascata di produzione di interferone di tipo I attraverso l'inibizione di TLR7 e TLR9 e la modulazione dell'attività di cGAS, possono avere un ruolo nel trattamento delle interferonopatie, soprattutto se somministrati in combinazione con altri farmaci (118).

Con l'avvento delle tecniche di *Next Generation Sequencing* (NGS), la comprensione delle cause genetiche di cSLE sta migliorando ad un ritmo veloce. Questa maggior conoscenza dell'eziopatogenesi, non solo permette una più corretta stratificazione dei pazienti, ma anche una più accurata e razionale pianificazione di trattamenti terapeutici personalizzati. Inoltre, l'identificazione dei geni causali apre la strada a un più ampio spettro di bersagli terapeutici per un nuovo approccio farmacologico a questa malattia.

Considerando il ruolo centrale della via di segnalazione dell'interferone di tipo I nella patogenesi del Lupus Monogenico, le interferonopatie mendeliane potrebbero beneficiare proprio dell'inibizione dell'IFN di tipo I. A tal proposito, gli inibitori delle JAK chinasi sono promettenti in quanto bloccano i mediatori a valle del recettore (IFNAR) e sono piccole molecole somministrabili per bocca. Il loro effetto è quello di interrompere la via di segnalazione e fermare il segnale interferonico. Attualmente sono disponibili in commercio svariate molecole, ognuna caratterizzata da una specifica selettività per le diverse proteine appartenenti alla famiglia delle Janus Chinasi.

Baricitinib e Ruxolitinib sono entrambi inibitori di JAK1/2 e hanno mostrato risultati preliminari importanti e interessanti per la loro sicurezza ed efficacia in SAVI, anche se la firma interferonica non è stata completamente annullata con il loro utilizzo. Essendo le Janus Chinasi implicate in numerose altre vie di segnalazione, gli effetti indesiderati di questa classe di farmaci possono essere svariati. I principali eventi avversi descritti sono rappresentati da infezioni delle vie respiratorie superiori, gastroenterite, infezione da Poliomavirus, VZV e dislipidemia. Per questo motivo è necessario ricorrere a dosaggi tali da non inibire completamente l'attività delle citochine bersaglio. I livelli sierici raggiunti con la posologia raccomandata permettono, comunque, un blocco dell'attività superiore al 50% per alcune ore al giorno che si è dimostrato efficace nel controllo della sintomatologia (119,120).

Anifrolumab è un anticorpo monoclonale completamente umanizzato che neutralizza il recettore di IFN α ed è risultato efficace nel Lupus Monogenico, soprattutto in presenza di elevate firme dell'IFN. È un buon candidato per il trattamento delle forme sottese da interferonopatie di tipo I, ma bisogna prestare attenzione al suo principale effetto collaterale che è rappresentato dalla slatentizzazione delle infezioni da Herpes Zoster (121).

Infine, gli *Human Endogenous Retroviruses* (HERV) dovrebbero essere parzialmente responsabili dell'aumento degli acidi nucleici intracitoplasmatici nelle forme di AGS con difetti enzimatici di TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1. È stato recentemente dimostrato in uno studio su 8 pazienti affetti da queste mutazioni, che gli inibitori della trascrittasi inversa Zidovudina, Lamivudina e Abacavir, ossia i farmaci antiretrovirali, già utilizzati per i pazienti con virus dell'immunodeficienza umana (HIV), possono rappresentare una concreta opzione terapeutica contro i retrovirus endogeni, poiché diminuiscono i nucleotidi citoplasmatici derivanti dai retroelementi e, come conseguenza, determinano una riduzione della firma dell'IFN (122).

Le terapie a bersaglio molecolare (*target therapy*) contro le cellule B e il trapianto di midollo osseo rappresentano opzioni interessanti nel Lupus Monogenico correlato alla perdita di tolleranza dei linfociti B. Rituximab e Ofatumumab hanno dimostrato efficacia nel trattamento di pazienti affetti da deficit di PKC δ (123).

I difetti di efferocitosi sono la situazione più difficile da trattare e rappresentano una sfida terapeutica importante per il clinico. Nessun farmaco, ad oggi, si è dimostrato efficace nel promuovere l'efferocitosi e la rimozione di acidi nucleici extracellulari. L'unica strada percorribile, soprattutto in caso di gravi carenze di C1q, è il trapianto di midollo osseo (124).

In conclusione, il Lupus Monogenico è una patologia nuova, solo recentemente riconosciuta come entità nosologica a sé stante, con una specifica eziopatogenesi e presentazione clinica, che, tuttavia, necessita ancora di ricerca scientifica per essere più approfonditamente delineata. Comprendere meglio le cause genetiche e le alterazioni molecolari sottostanti è il presupposto cardine di un esaustivo iter diagnostico e terapeutico, che consentirebbe una precoce identificazione della patologia e la messa a punto di nuove terapie target, mirate alla cura della malattia. A tutto questo, conseguirebbe anche un minor sviluppo di complicanze a lungo termine, un follow up personalizzato e, non da ultimo, un tempestivo supporto psicologico e sociale al bambino e alla famiglia (19).

4. Scopo dello studio

Lo scopo del presente studio è stato quello di valutare la performance dei più recenti e innovativi criteri di classificazione per SLE dell'*European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology 2019* (EULAR/ACR-2019) nei pazienti affetti da Lupus Monogenico e successivamente confrontarne le prestazioni ottenute con quelle derivanti dall'applicazione dei più datati, ma comunque attuali, criteri *Systemic Lupus International Collaborating Clinics 2012* (SLICC-2012).

Essendo il Lupus Monogenico un'entità nosologica ancora in via di definizione e oggetto di attiva ricerca scientifica, questo studio ha offerto anche la possibilità di riunire un consistente numero di pazienti appartenenti a differenti gruppi etnici ed esposti a fattori ambientali diversi. Potrebbe, quindi, costituire un interessante punto di partenza per un'eventuale analisi approfondita delle molteplici ed eterogenee manifestazioni cliniche che contraddistinguono questa patologia.

Come riportato precedentemente, più di 30 geni sono stati scoperti essere gli agenti causali di questa rara forma di SLE ad esordio infantile precoce, tuttavia, ad oggi, il Lupus Monogenico rimane un termine puramente descrittivo, che fa fatica ad essere associato ad un iter diagnostico e terapeutico personalizzato e, al contempo, standardizzato. Ne consegue che il rischio di peggioramento della prognosi del bambino è elevato, così come è alto il tasso di complicanze tardive che possono compromettere lo sviluppo, l'accrescimento e l'inserimento sociale del piccolo paziente.

Sicuramente la presenza di criteri clinici classificativi, convalidati ed approvati anche per questa forma di Lupus, potrebbe aiutare lo specialista ad orientarsi tra l'eterogeneità fenotipica caratteristica di questa patologia e potrebbe essere un utile ausilio all'inquadramento di questi pazienti, soprattutto qualora questi criteri vengano associati alla sempre più avanzata analisi genetica e molecolare.

All'attuale conoscenza dei fatti, nessuno dei criteri di classificazione approvati e disponibili per SLE nell'adulto è stato esaminato nei più piccoli pazienti con diagnosi di Lupus Monogenico. Solo recentemente, gli EULAR/ACR-2019 sono stati testati e si sono dimostrati efficaci, con sensibilità significativa, nella classificazione dei pazienti con cSLE sporadico, indipendentemente dall'etnia.

Consapevoli della mancanza di dati inerenti la performance di EULAR/ACR-2019 nei pazienti con Lupus Monogenico, è nata l'idea del presente studio, con la finalità di stabilire se questa rara patologia, al momento orfana di criteri di classificazione, potesse usufruire in maniera efficiente, con la giusta sensibilità e specificità, dei criteri già esistenti e validati per le forme più comuni di SLE, oppure, necessitasse della stesura di nuovi set classificativi specifici.

5. Pazienti e Metodi

5.1. Selezione dei pazienti

Il presente progetto è il risultato di uno studio di coorte retrospettivo multicentrico che vede la collaborazione di quattro centri internazionali di ricerca, specializzati nell'ambito della Reumatologia Pediatrica: il *Pediatric Rheumatology, King Faisal Specialist Hospital and Research Center* di Riyadh e il *Pediatric Rheumatology, East Jeddah Hospital* di Jeddah in Arabia Saudita, il *Pediatric Rheumatology, Sultan Qaboos* di Muscat in Oman e il nostro centro *IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Pediatric Rheumatology, Centre for Autoinflammatory Diseases and Immunodeficiencies, DINO GMI, University of Genoa* di Genova in Italia.

La prima fase dello studio è stata dedicata alla raccolta dati di tutti i pazienti che hanno ricevuto una precedente diagnosi genetica di Lupus Monogenico e che costituiscono il gruppo sperimentale oggetto di analisi del nostro lavoro. A questi, va aggiunta la collezione dati dei pazienti appartenenti al gruppo di controllo che, invece, sono stati inclusi nell'indagine per avere un termine di paragone utile al confronto dei risultati ottenuti dall'analisi statistica e per consentire l'elaborazione di deduzioni più affidabili ed attendibili.

I pazienti con Lupus Monogenico, comprovato geneticamente, sono stati reclutati sulla base del rispetto dei criteri SLICC-2012 o dell'opinione di medici specialisti esperti.

Tabella 2: Criteri di inclusione ed esclusione per l'arruolamento dei pazienti con diagnosi genetica di Lupus Monogenico nel gruppo sperimentale.

Criteri di INCLUSIONE	Criteri di ESCLUSIONE
Pazienti ≤ 14 anni al momento dell'insorgenza delle manifestazioni cliniche	LES familiare senza test genetici comprovati o disponibili
Disponibilità di titolo anticorpi antinucleo (ANA), sia esso positivo che negativo	Pazienti con dati clinici insufficienti

L'ANA positivo è stato definito con la presenza di un titolo $\geq 1:80$

In totale i pazienti con Lupus Monogenico arruolati nello studio sono stati 49, di cui 27 presentano mutazioni geniche della DNase1L3, 8 di C1q, 2 di C3, 2 di DNaseII e 1 per ciascuno dei seguenti geni: C8b, PIK3CD, PNP, CYBB, IRF2BP2, ISG15/MLPH, IL-2RB, TALDO/PTEN, STAT1 e NRAS.

Dei 49 pazienti totali, 6 sono seguiti presso il nostro centro, Istituto Giannina Gaslini, e di questi 4 presentano mutazioni in DNASE1L3, 1 in DNaseII e 1 in NRAS. Sono giunti alla nostra attenzione in seguito ad episodi atipici e ricorrenti di cSLE, successivamente meglio inquadrati, oltre che dall'attenta osservazione clinica, attraverso l'analisi genetica.

Il gruppo di controllo consiste in un totale di 104 pazienti di cui 55 hanno ricevuto diagnosi di cSLE sporadico e 49 non rientrano nella categoria SLE, ma presentano diagnosi di artrite idiopatica giovanile sistemica (*Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis*, SJIA) e dermatomiosite giovanile (*Juvenile Dermatomyositis*, JDM). In particolare, fra questi 49 pazienti non-SLE, 32 sono affetti da SJIA e 17 da JDM. Le diagnosi di cSLE sporadico, SJIA e JDM si sono basate rispettivamente sui criteri SLICC-2012, ILAR e Bohan e Peter. La selezione dei controlli non-lupus è stata condotta basandosi sulle loro somiglianze fenotipiche con SLE. I pazienti con una diagnosi diversa da cSLE, SJIA o JDM sono stati esclusi dai gruppi di controllo.

Nel complesso sono stati arruolati un totale di 153 pazienti, con caratteristiche etniche, demografiche e socio-economiche differenti, ma accomunati da un decorso clinico e un iter diagnostico per molti aspetti simile.

Lo studio è stato condotto in conformità con la Dichiarazione Helsinki (2000) e l'approvazione etica è stata ottenuta da tutti i centri partecipanti attraverso il proprio comitato etico interno di ricerca istituzionale.

Tutti i dati raccolti sono il risultato di una valutazione medica di routine e sono stati inseriti in forma anonima nel rispetto e nella protezione della riservatezza personale.

Il consenso informato per tutte le indagini svolte nella pratica clinica, compresa l'esecuzione di eventuali test genetici, è stato ottenuto dai genitori alla prima visita e ad ogni procedura clinico-diagnostica.

5.2. Applicazione dei criteri classificativi EULAR/ACR-2019 e SLICC-2012

Una volta selezionati e suddivisi i pazienti nel gruppo sperimentale o di controllo sulla base della diagnosi, sono stati applicati ad entrambi i gruppi i criteri di classificazione EULAR/ACR-2019 e SLICC-2012.

Per rendere più semplice ed esaustiva la raccolta delle informazioni relative all'applicazione dei criteri classificativi, è stata stilata una singola tabella che ciascun centro ha provveduto a compilare con l'inserimento dei dati ottenuti dalle cartelle cliniche dei propri pazienti. Grazie a questa organizzazione del lavoro si è potuto ottenere, nonostante la distanza geografica dei centri che hanno preso parte a questo studio, un unico database comune con racchiuse tutte le informazioni necessarie per l'esecuzione della successiva analisi statistica.

Inoltre, per avere il dato clinico standardizzato, ove possibile, è stato utilizzato un codice numerico, con apposita leggenda, che ha consentito di trasformare l'informazione descrittiva in una variabile numerica di più facile comprensione e valutazione.

È stato, quindi, chiesto ai medici responsabili della gestione dei singoli pazienti di completare un'unica tabella, privata di qualsiasi dato personale identificativo, appositamente preparata e composta da diverse sezioni:

- una sezione demografica comprendente il sesso del paziente e l'età alla diagnosi;
- una sezione diagnostica dove è stata riportata la suddivisione sulla base del gruppo di appartenenza (lupus monogenico, cSLE sporadico o non-lupus) e dove per il lupus monogenico è stata precisata la mutazione genica riscontrata;
- una sezione clinica dove sono stati riportati i domini clinici ed ematologici indagati nei criteri classificativi (costituzionale, mucocutaneo, muscoloscheletrico, renale, sieroso, neuropsichiatrico ed ematologico);
- una sezione immunologica dove è stato riportato il titolo ANA e dove sono stati analizzati i domini immunologici richiesti nei criteri (anti-dsDNA, anti-Smith, anticorpi antifosfolipidi, ipocomplementemia C3 e C4 oppure C3 o C4);
- un'ultima sezione in cui è stato messo in evidenza se il criterio classificativo SLICC-2012 e EULAR/ACR-2019 è risultato soddisfatto o no e per EULAR/ACR-2019 è stato specificato anche lo score numerico ottenuto dalla somma dei punteggi dei singoli sottodomini presenti nel set.

Per poter verificare quanto ciascun paziente aderisse ai due criteri di classificazione in esame è stato necessario accedere alle informazioni cliniche, laboratoristiche, sierologiche e di imaging contenute nelle cartelle cliniche e successivamente individuare quali e quante manifestazioni di malattia, presentate dal bambino nel corso della storia anamnestica, erano enunciate nei domini dei criteri.

Sia per SLICC-2012 che per EULAR/ACR-2019 il manifestarsi di un dominio in almeno un'occasione della storia clinica del paziente è stato considerato sufficiente per ritenerlo verificato. Inoltre, i domini e i punteggi sono stati valutati e assegnati secondo la definizione fornita da ciascun criterio.

Il criterio di classificazione SLICC-2012 è stato ritenuto soddisfatto quando si sono manifestati nel paziente almeno 4 su 17 domini enunciati, di cui almeno 1 clinico e 1 immunologico, oppure, quando è stata documentata, tramite biopsia renale, la presenza di nefrite lupica (come unico criterio clinico) associata al riscontro di anticorpi ANA o anti-dsDNA positivi (*Figura 4*).

Il criterio di classificazione EULAR/ACR-2019 ha richiesto come clausola d'ingresso un titolo di anticorpi antinucleo (ANA) di almeno 1:80 sulle cellule HEp-2 o un test ANA equivalente positivo con titolo $\geq 1:80$, almeno una volta nella storia clinica del malato. In caso contrario il paziente non si è considerato affetto da SLE e il criterio non è stato applicato.

Nei casi in cui la clausola d'ingresso è stata rispettata, si è provveduto alla valutazione dei 22 sottodomini che costituiscono il set, a loro volta raggruppati in 7 domini clinici e 3 domini immunologici.

Attraverso un sistema a punti, che va da un minimo di 2 a un massimo di 10, si è dato un peso variabile a ciascuno dei 22 sottodomini e si è calcolato lo score totale di ciascun paziente, considerando per ognuno dei domini solo il sottodominio con il punteggio più elevato.

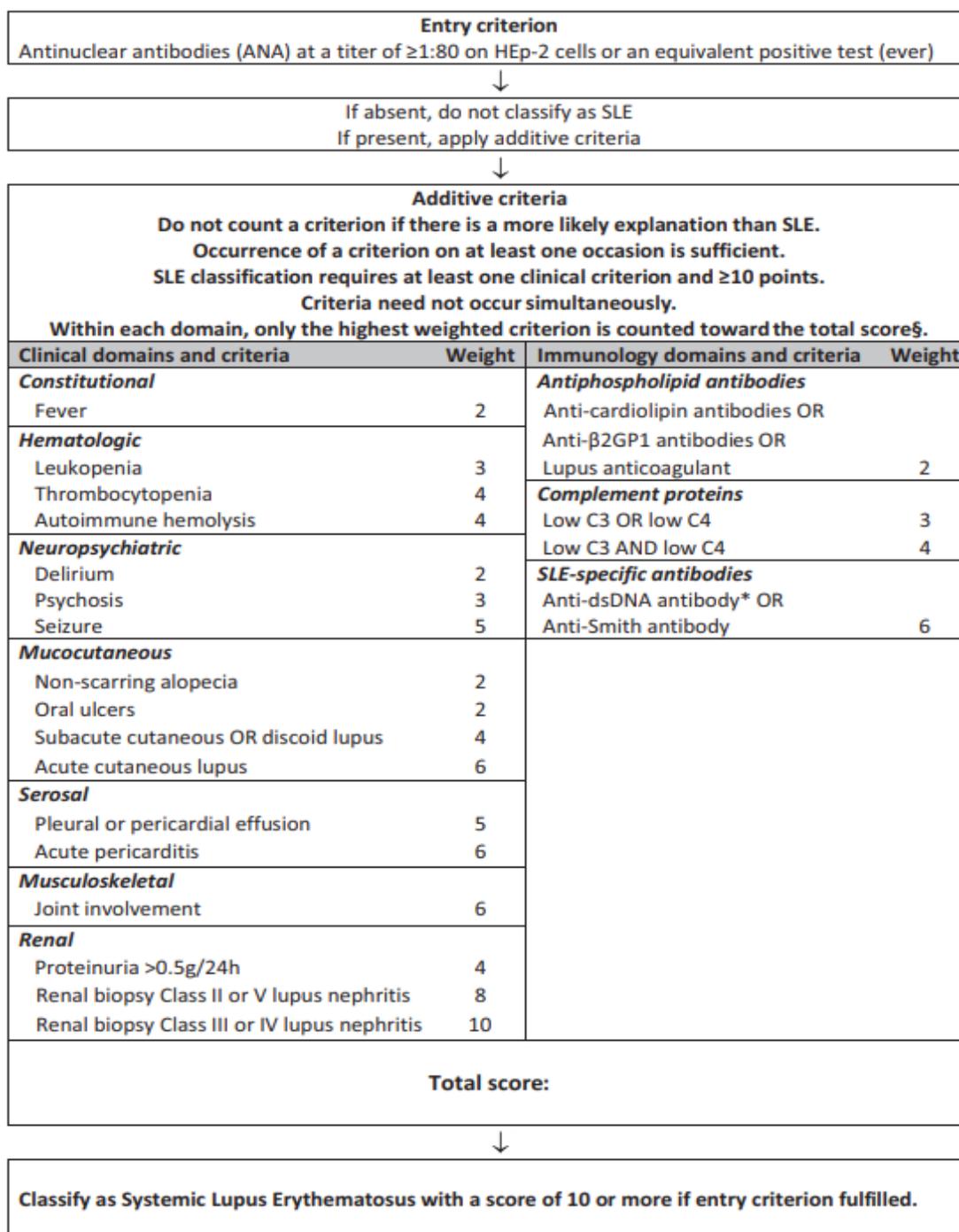
EULAR/ACR-2019 è stato ritenuto soddisfatto quando il paziente in esame ha rispettato la clausola d'ingresso (positività ANA), ha presentato almeno un dominio clinico e ha accumulato un punteggio totale ≥ 10 (*Figura 5*).

Figura 4: (125) Domini clinici e immunologici enunciati nel criterio di classificazione SLICC-2012 per SLE.

Clinical Criteria
Acute cutaneous lupus including: lupus malar rash (do not count if malar discoid), bullous lupus, toxic epidermal necrolysis variant of SLE, maculopapular lupus rash, photosensitive lupus rash, (in the absence of dermatomyositis), or subacute cutaneous lupus, nonindurated psoriaform and/or annular polycyclic lesions that resolve without scarring, although occasionally with postinflammatory dyspigmentation or telangiectasias)
Chronic cutaneous lupus including: classical discoid rash, localized (above the neck), generalized (above and below the neck), hypertrophic, (verrucous) lupus, lupus panniculitis (profundus), mucosal lupus, lupus erythematosus tumidus, chilblains lupus, discoid lupus/lichen planus overlap
Oral ulcers: Palate, buccal, tongue, or nasal ulcers (in the absence of other causes, such as vasculitis, Behcet's disease, infection (herpes viruses), inflammatory bowel disease, reactive arthritis, acidic foods)
Nonscarring alopecia: diffuse thinning or hair fragility with visible broken hairs (in the absence of other causes such as alopecia areata, drugs, iron deficiency and androgenic alopecia)
Synovitis involving two or more joints: characterized by swelling or effusion or tenderness in 2 or more joints and thirty minutes or more of morning stiffness.
Serositis: typical pleurisy for > 1 day or pleural effusions or pleural rub or typical pericardial pain (pain with recumbency improved by sitting forward) for > 1 day or pericardial effusion or pericardial rub or pericarditis by EKG (in the absence of other causes, such as infection, uremia, and Dressler's pericarditis)
Renal: Urine protein:creatinine ratio (or 24 hr urine protein) representing 500 mg of protein/24 hr or red blood cell casts
Neurologic: seizures, psychosis, mononeuritis multiplex (in the absence of other known causes such as primary vasculitis), myelitis, peripheral or cranial neuropathy (in the absence of other known causes such as primary vasculitis, infection, and diabetes mellitus), acute confusional state (in the absence of other causes, including toxic-metabolic, uremia, drugs)
Hemolytic anemia
Leukopenia: < 4000/mm ³ at least once (in the absence of other known causes such as Felty's, drugs, portal hypertension) OR
Lymphopenia: < 1000/mm ³ at least once (in the absence of other known causes such as corticosteroids, drugs and infection)
Thrombocytopenia: <100,000/mm ³ at least once (in the absence of other known causes such as drugs, portal hypertension, TTP)
Immunologic Criteria
ANA level above laboratory reference range
Anti-dsDNA antibody level above laboratory reference range (or > 2 fold the laboratory reference range if tested by ELISA)
Anti-Smith
Antiphospholipid antibody: any of the following: lupus anticoagulant, false-positive rapid plasma regain (RPR), medium or high titer, anticardiolipin antibody level (IgG, IgM or IgA), anti-β ₂ glycoprotein I (IgG, IgM or IgA)
Low complement: low C3, low C4, low CH50
Direct Coombs' test (in the absence of hemolytic anemia)

^aPatients can be classified as having SLE if they satisfy four of the clinical and immunological criteria, including at least one clinical criterion and one immunologic criterion, OR if they have biopsy-proven nephritis compatible with SLE in the presence of ANAs or anti-dsDNA antibodies. Reproduced from Petri M *et al.* Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 64:2677-86. Copyright 2012. With permission from John Wiley & Sons [258]. TTP: thrombocytopenic purpura; anti-Smith: anti-Smith antibodies.

Figura 5: (114) Domini clinici e immunologici enunciati nel criterio di classificazione EULAR/ACR-2019 per SLE.



5.3. Analisi Statistica dei dati

Le analisi statistiche di questo studio sono state eseguite utilizzando il pacchetto software SAS (*Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA*) nella versione 9.4.

Le statistiche descrittive per le variabili continue sono state riportate come media \pm deviazione standard (SD), mentre le variabili categoriche sono state presentate come frequenze e percentuali.

La mediana e il range interquartile (IQR) sono stati utilizzati solo quando necessario, come ad esempio nella rappresentazione dell'età mediana al momento della diagnosi di malattia.

Le variabili continue sono state confrontate fra loro applicando il test T di Student per campioni indipendenti e attraverso l'analisi della varianza (ANOVA), oppure, a seconda dei casi, anche utilizzando il test non parametrico (*Mann Whitney U/Kruskal Wallis*).

Le variabili categoriche sono, invece, state messe a confronto mediante l'applicazione del test Chi-quadrato.

Il test esatto di Fisher è stato utilizzato quando sono state esaminate le variabili a bassa incidenza.

Infine, sono stati calcolati i valori predittivi positivi e negativi, la sensibilità e la specificità.

Il livello di significatività è stato fissato al valore $p < 0,05$.

6. Risultati

6.1. Suddivisione dei pazienti

In questo studio sono stati arruolati, inizialmente, un totale di 158 pazienti, un paziente del gruppo Lupus Monogenico e quattro del gruppo di controllo sono stati rispettivamente esclusi dalla valutazione per assenza di dati anamnestici sufficienti alla successiva applicazione dei criteri di classificazione e per diagnosi non soddisfacente i criteri di inclusione.

In definitiva, un totale di 153 pazienti si è reso disponibile per l'analisi.

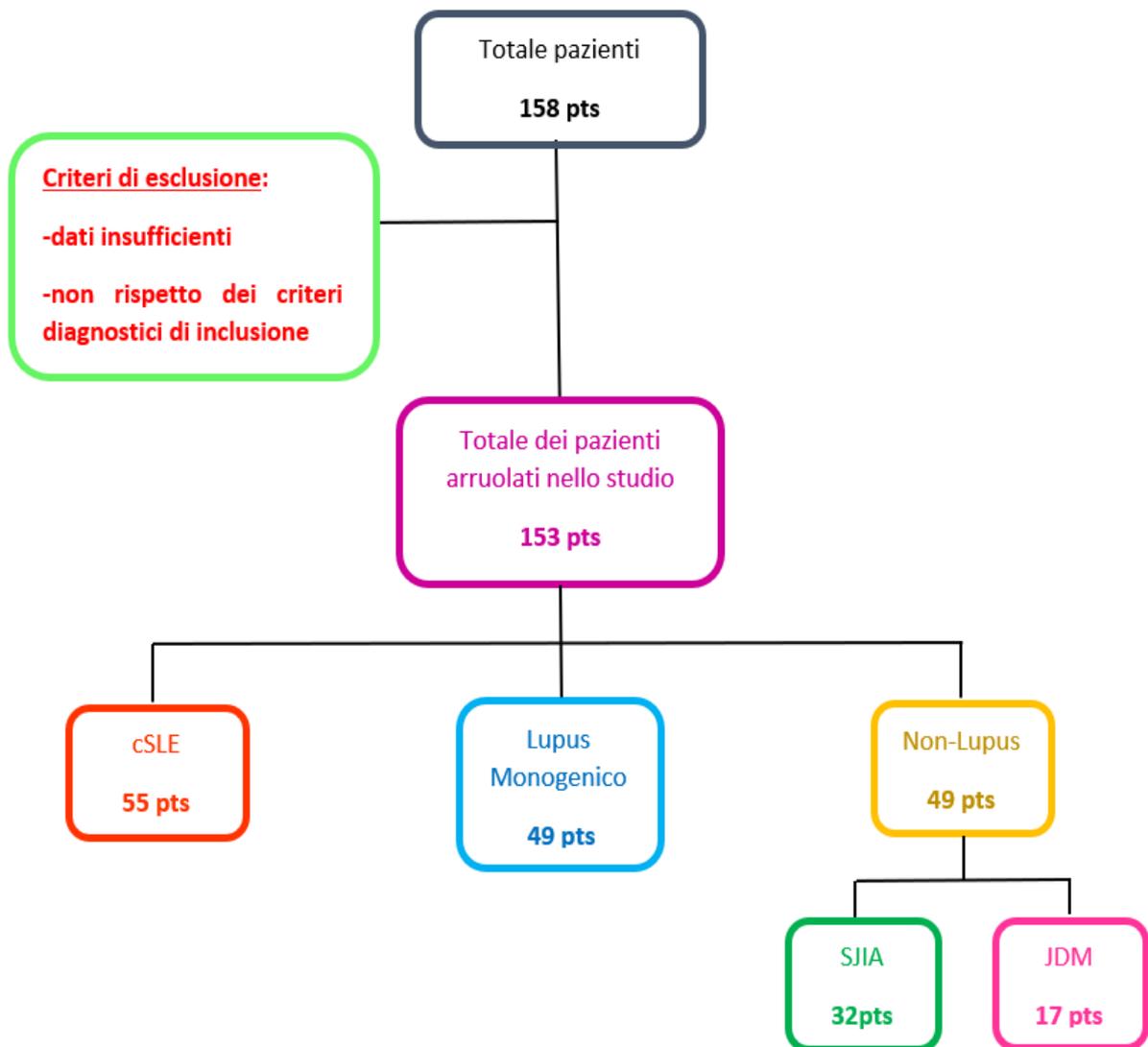


Figura 6: Suddivisione dei pazienti partecipanti allo studio.

I 153 pazienti definitivamente inclusi nello studio sono stati successivamente suddivisi in un gruppo sperimentale, costituito da tutti i soggetti con una diagnosi di Lupus Monogenico, e in un gruppo di controllo, formato, invece, dai pazienti con diagnosi di Lupus pediatrico sporadico (cSLE) o affetti da altre patologie reumatologiche pediatriche con fenotipo clinico simil-SLE.

Tabella 3: Suddivisione diagnostica dei pazienti arruolati nello studio. I dati ottenuti dall'analisi sono rappresentati come numero assoluto e tra parentesi come valore percentuale.

	Monogenic lupus	Sporadic lupus	Non-lupus	Total
<u>Number of patients (%)</u>	49 (32.0)	55 (35.9)	49 (32.0)	153 (100)

In particolare le categorie diagnostiche individuate e analizzate sono state le seguenti:

- 49 pazienti hanno ricevuto diagnosi di Lupus Monogenico comprovata attraverso l'esecuzione di test genetici di ultima generazione che hanno dimostrato la presenza di varianti genetiche in causa per questa rara forma di Lupus ad insorgenza infantile. Questi soggetti costituiscono il 32% della coorte totale e rappresentano il gruppo sperimentale.
- 55 pazienti sono stati arruolati con diagnosi di Lupus pediatrico sporadico (cSLE), dunque, senza un quadro clinico che inducesse il sospetto di forme monogeniche e senza una dimostrata presenza di mutazioni alla base, ma comunque con onset in giovane età. Questo sottogruppo costituisce il 35,9% dei soggetti analizzati ed è la componente più rappresentata.

- 49 pazienti appartengono al sottogruppo non-lupus, ossia soggetti non affetti da SLE, ma con diagnosi di malattie reumatiche che, con il loro quadro clinico, possono mimare fenotipi lupici. In particolare, si tratta di due patologie, l'artrite idiopatica sistemica giovanile (SJIA) e la dermatomiosite giovanile (JDM), che spesso devono essere considerate nella diagnostica differenziale dei pazienti affetti da SLE. Numericamente parlando, 32 sono i pazienti con SJIA e 17 quelli con JDM, nell'insieme rappresentano il 32% del totale degli individui arruolati.

Il gruppo di controllo, quindi, comprendente i 55 soggetti affetti da cSLE, i 32 da SJIA e i 17 da JDM, totalizza un numero complessivo di 104 pazienti e rappresenta il 68% della coorte analizzata in questo studio.

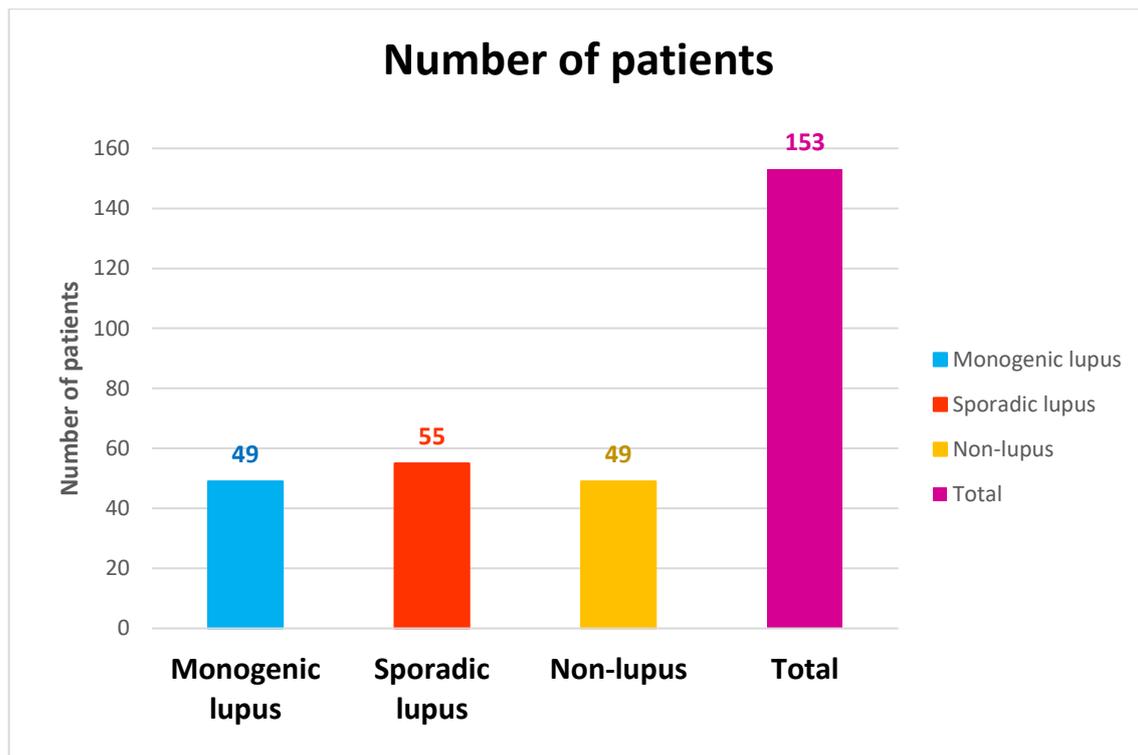


Grafico 1: Numero di pazienti. In ascissa la suddivisione diagnostica dei gruppi in studio, in ordinata il numero totale di pazienti per ciascuna categoria diagnostica, rappresentato come valore assoluto.

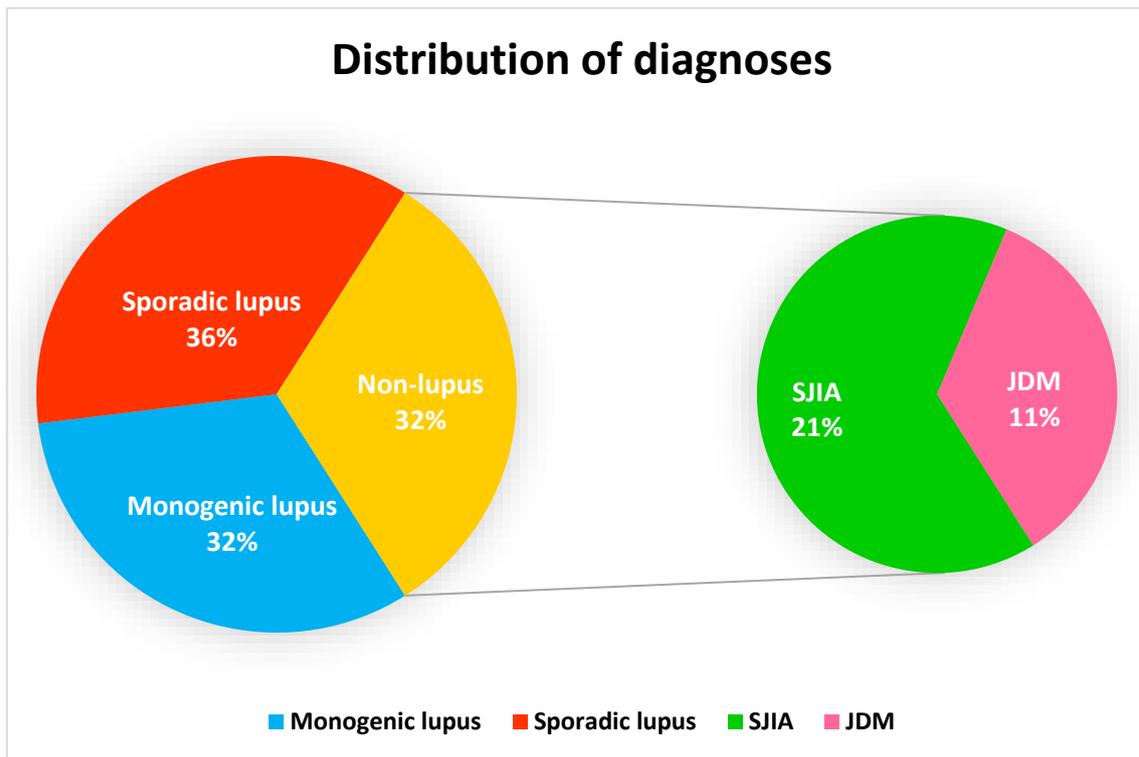


Grafico 2: Distribuzione percentuale delle categorie diagnostiche in studio. I dati numerici raffigurati in questo grafico a torta sono espressi come valore percentuale (%).

6.2. Analisi demografica

Per quanto riguarda l'analisi demografica, sono stati presi in considerazione e investigati il genere e l'età alla diagnosi di ciascuno dei gruppi di pazienti in studio e del totale della coorte arruolata.

Nella distribuzione di genere il sesso femminile è risultato essere predominante in tutte le categorie da noi investigate.

In particolare, parlando in termini di numeri assoluti, nel gruppo sperimentale Lupus Monogenico 22 sono i soggetti di sesso maschile e 27 quelli di sesso femminile; fra i pazienti con cSLE 12 sono maschi e 43 sono femmine. Si può subito notare come la prevalenza femminile, benché evidente in entrambi i gruppi, sia schiacciante per quanto concerne le forme sporadiche di SLE, mentre sia più marginale per la controparte monogenica. Questa è una delle peculiarità che contraddistinguono il Lupus Monogenico, ossia quella di presentare una distribuzione di genere che, nonostante veda sempre il sesso femminile prevalere, non colleziona risultati così elevati come, invece, accade nei casi di SLE pediatrico, e ancor più adulto, senza una base genetica comprovata.

Tra i pazienti del gruppo controllo con forme reumatologiche non-lupus, 19 sono i soggetti di sesso maschile e 30 quelli di sesso femminile. Anche in questo caso la predominanza femminile è più evidente se messa a confronto con il gruppo sperimentale. Analizzando nel dettaglio le due sottopopolazioni, nei pazienti con diagnosi di artrite idiopatica sistemica giovanile 14 sono maschi e 18 femmine, mentre fra i bambini con dermatomiosite giovanile 5 sono maschi e 12 le femmine.

Sul totale dei pazienti analizzati, la prevalenza femminile è circa il doppio di quella maschile collezionando un numero complessivo di 100 femmine contro i 53 individui maschi.

Si tratta sicuramente di patologie che sono solite manifestarsi con una predominanza femminile, come possono confermare i dati presenti in letteratura, ne consegue che le valutazioni condotte sul nostro campione di pazienti rispettano questa linea di tendenza.

Tabella 4: Distribuzione per genere delle categorie diagnostiche in studio e del totale dei pazienti arruolati.
I dati numerici rappresentati in questa tabella sono riportati come valori assoluti.

	Monogenic lupus	Sporadic lupus	Non-lupus	Total
<u>Female</u>	27	43	30	100
<u>Male</u>	22	12	19	53

	SJIA	JDM
<u>Female</u>	18	12
<u>Male</u>	14	5

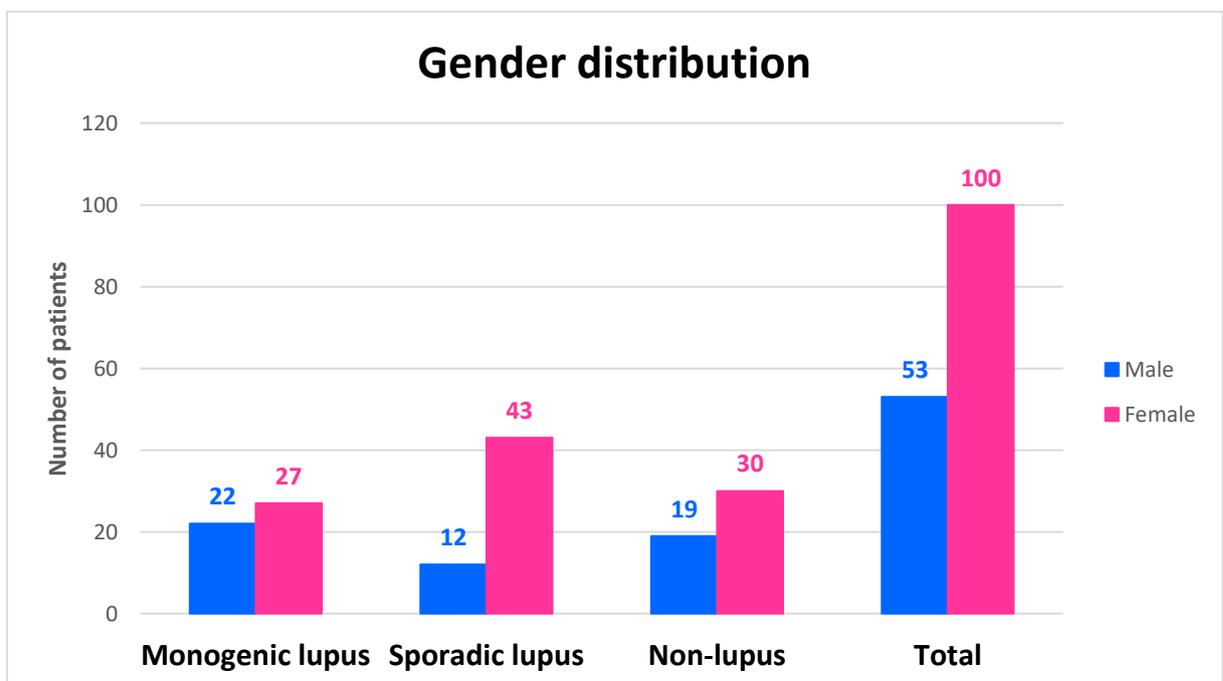


Grafico 3: Distribuzione per genere delle categorie diagnostiche in studio e del totale dei pazienti arruolati. In ascissa sono raffigurate le categorie analizzate, in ordinata è riportato il numero di pazienti rappresentato come valore numerico assoluto.

La distribuzione per genere è stata analizzata anche attraverso l'applicazione del rapporto femmine su maschi (F:M), per rendere più immediato il confronto tra i gruppi in studio. Nel gruppo sperimentale Lupus Monogenico essendo la predominanza femminile più marginale il rapporto F:M è risultato più alto rispetto ai gruppi controllo.

Tabella 5: Distribuzione per genere delle categorie diagnostiche in studio e del totale dei pazienti arruolati. I dati numerici riassunti in questa tabella sono riportati come rapporto fra le due variabili in analisi, ossia il sesso femminile e il sesso maschile.

	Monogenic lupus	Sporadic lupus	Non-lupus	Total
<u>Gender ratio (M:F)</u>	1:1.2	1:3.6	1:1.6	1:1.9

M: Male, F: Female

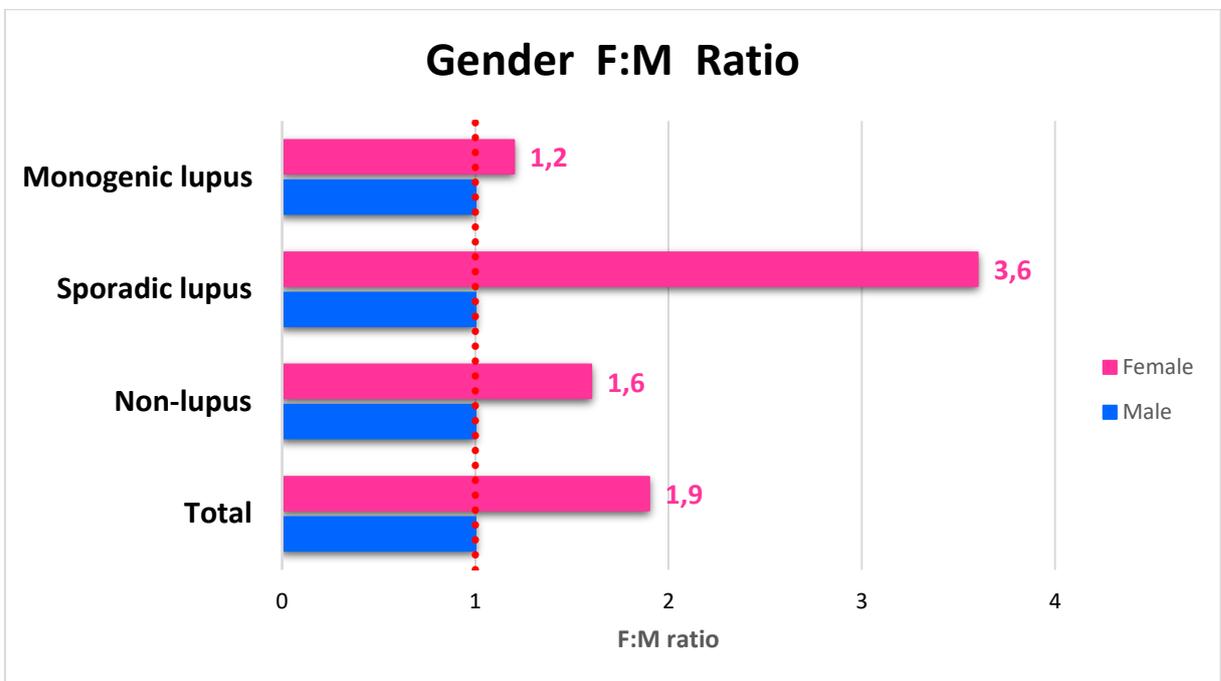


Grafico 4: Distribuzione per genere delle categorie diagnostiche in studio e del totale dei pazienti arruolati. I dati numerici raffigurati in questo grafico sono riportati come rapporto fra le due variabili in analisi, ossia il sesso femminile e il sesso maschile. In ascissa è rappresentato il rapporto femmine su maschi, in ordinata i gruppi di pazienti esaminati. M: Male, F: Female

Nella sezione demografica è stata indagata anche l'età alla diagnosi, effettuando sempre un confronto dei risultati ottenuti tra i vari gruppi in studio e applicando la stessa operazione sul totale dei pazienti arruolati, per avere un'idea di come si comporta la coorte nel suo insieme.

Dai dati analizzati si è potuto notare che i piccoli pazienti affetti da Lupus Monogenico hanno ricevuto una diagnosi in più giovane età, soprattutto se messi a confronto con i soggetti diagnosticati come Lupus sporadico (6 anni versus 10 anni). Questo risultato è inevitabilmente correlato alla storia di questa patologia, in quanto il Lupus Monogenico ha la peculiare caratteristica di presentarsi con un esordio di malattia oltre che severo, anche estremamente precoce, proprio perché geneticamente determinato.

In questo studio non è stata indagata direttamente l'età di esordio delle prime manifestazioni cliniche, bensì è stata posta l'attenzione sull'età al momento della diagnosi. Queste due variabili non necessariamente coincidono, anzi, nella maggior parte dei casi (non tutti) la diagnosi è successiva alla presentazione di malattia, per cui, l'età ad essa correlata risulta essere maggiore.

Si può facilmente dedurre che più una patologia si manifesta precocemente più prontamente viene posta all'attenzione dello specialista e, quindi, è possibile che l'inquadramento diagnostico sia ottenuto ad un'età minore. Questo potrebbe in linea teorica "giustificare" la diagnosi in più tenera età dei bambini con Lupus Monogenico rispetto a quelli con Lupus sporadico, che presentando i sintomi più tardivamente ricevono solo successivamente la diagnosi di malattia.

Numericamente parlando, tutti i dati riguardanti l'età alla diagnosi sono stati rappresentati attraverso il calcolo del valore mediano, affiancato da un intervallo di dispersione definito range interquartile (IQR) e sono riassunti nella *Tabella 6* e nel *Grafico 5*.

Per il gruppo sperimentale dei bambini affetti da Lupus Monogenico l'età mediana alla diagnosi è di 6 anni con un IQR che oscilla tra i 3 e i 10.8 anni.

Nel caso dei soggetti con cSLE l'età mediana alla diagnosi è 10 anni con un range interquartile che varia dai 7 ai 12 anni.

I pazienti diagnosticati come artrite idiopatica giovanile e dermatomiosite, quindi non affetti da SLE, hanno mostrato un'età mediana alla diagnosi ancora più precoce, ossia 5 anni, con un IQR variabile tra i 3 e gli 8.5 anni.

Infine, l'età mediana al momento della diagnosi sul totale dei pazienti esaminati è risultata essere 7 anni con un intervallo di dispersione fluttuante tra i 4 e gli 11 anni.

Tabella 6: Età mediana alla diagnosi delle categorie diagnostiche in studio e del totale dei pazienti arruolati. I dati numerici riassunti in questa tabella rappresentano gli anni in cui è avvenuta la diagnosi e sono espressi come valore mediano affiancato, tra parentesi, da un range di dispersione interquartile.

	Monogenic lupus	Sporadic lupus	Non-lupus	Total
<u>Age at diagnosis</u> <i>median years (IQR)</i>	6.0 (3.0-10.8)	10.0 (7.0-12.0)	5.0 (3.0-8.5)	7.0 (4.0-11.0)

IQR: range interquartile

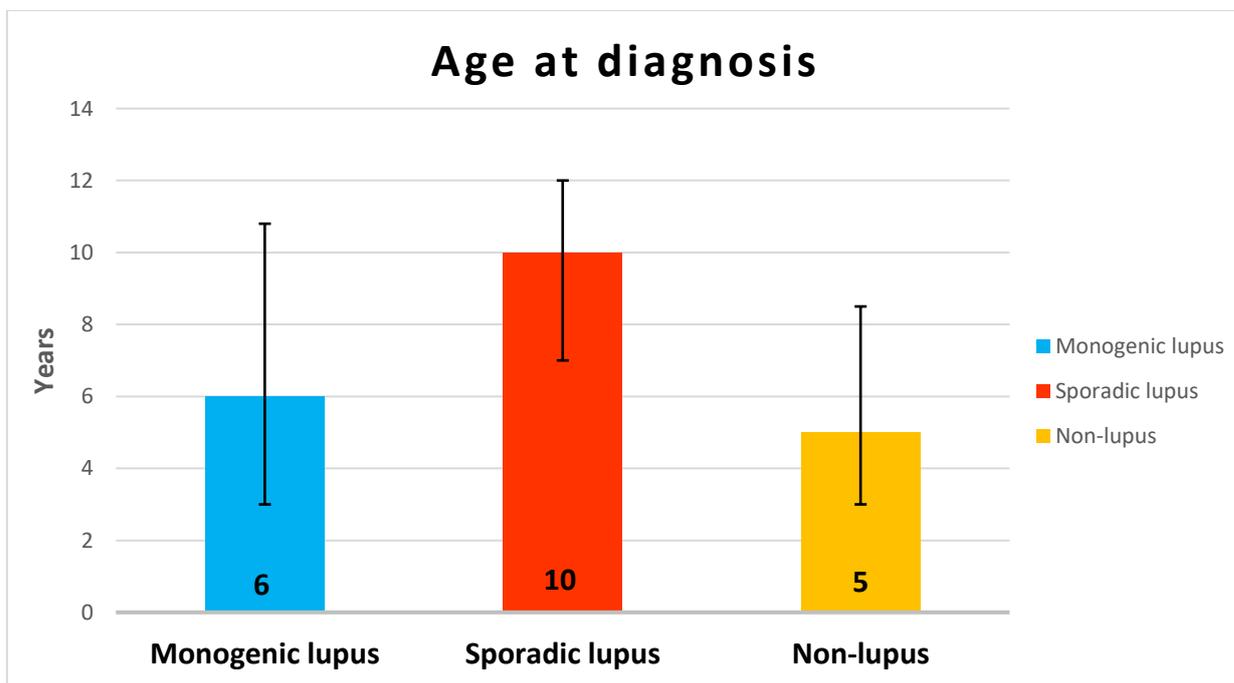


Grafico 5: Età mediana alla diagnosi delle categorie diagnostiche in studio e del totale dei pazienti arruolati. I dati numerici riassunti in questo grafico rappresentano gli anni in cui è avvenuta la diagnosi e sono espressi come valore mediano affiancato da un range di dispersione interquartile (IQR). In ascissa sono raffigurati i gruppi analizzati, in ordinata gli anni al momento della diagnosi. L'IQR è riprodotto mediante l'utilizzo di una linea continua che ben evidenzia l'intervallo di oscillazione dell'età.

6.3. Analisi genetica dei pazienti con diagnosi di Lupus Monogenico

Il gruppo sperimentale in studio è stato indagato dal punto di vista genetico, in quanto ciascuno di questi pazienti, per poter essere arruolato, come criterio di inclusione, doveva aver ricevuto una precedente diagnosi genetica che attestasse la presenza di mutazioni in causa per il Lupus Monogenico. Queste informazioni sono state ottenute attraverso l'applicazione di test genetici di ultima generazione come il sequenziamento dell'intero esoma (WES), dell'intero genoma (WGS), oppure, attraverso pannelli NGS.

Ciascun centro di riferimento, per ogni paziente in carico, ha provveduto a riportare nel database comune il gene coinvolto dalla mutazione, l'effetto della mutazione sulla funzione della proteina codificata, il pattern di ereditarietà, la precisa variante genica mutata e il locus dell'alterazione.

Infine, una volta collezionati tutti i dati, è stato calcolato il numero complessivo di pazienti che hanno dimostrato presentare la mutazione nello stesso gene.

Si è potuto così individuare, nella nostra coorte di pazienti, il gene più volte in causa nella determinazione di queste rare e precoci forme monogeniche di Lupus.

La *Tabella 7* di seguito riportata, mostra lo spettro delle mutazioni dei 49 pazienti con Lupus Monogenico. Le alterazioni geniche più frequentemente in causa sono risultate essere i deficit di DNAsi, in particolare la DNase1L3 ha collezionato il punteggio più elevato in assoluto totalizzando un numero complessivo di 27 pazienti. A seguire si sono posizionate le carenze del complemento, principalmente dovute alla variante C1q, che si è dimostrata mutata in un totale di 8 pazienti. Questi due geni, DNase1L3 e C1q, sono indiscutibilmente i più colpiti da mutazioni nella nostra selezione di bambini affetti da Lupus Monogenico.

Tra i restanti geni individuati, hanno ottenuto, seppur inferiormente alle precedenti, una buona prevalenza, la DNaseII e il deficit del complemento riguardante C3. Ciascuno di questi geni ha totalizzato 2 pazienti, posizionandosi al terzo posto nella "classifica" generale.

Infine, 10 diversi geni quali C8b, PIK3CD, PNP, CYBB, IRF2BP2, ISG15/MLPH, IL-2RB, TALDO/PTEN, STAT1, NRAS, si sono mostrati come varianti uniche, ossia 1 solo paziente per ciascuno di questi geni ha presentato la mutazione. Si tratta, infatti, di varianti rare di malattia che sono compatibili anche con altre patologie monogeniche come le interferonopatie di tipo I e le PIDs (malattie da immunodeficienza primaria).

Tabella 7: Spettro delle mutazioni geniche riscontrate nei pazienti con diagnosi di Lupus Monogenico. I dati numerici riportati nella seguente tabella sono espressi come valore assoluto.

Gene	Mechanism	Inheritance	Gene variants	No. of patients
<u>DNase1L3</u>	Loss of function	Recessive	Homozygous c.289_290delCA in <i>DNASE1L3</i> compound heterozygous: deletion of exon 5 + c.290_291delCA in <i>DNASE1L3</i> Homozygous 1-bp deletion in <i>DNASE1L3</i> (NM_004944.2): c.643delT (p.Trp215GlyfsX2) Homozygous deletion in <i>DNASE1L3</i> (NM_001256560:exon2:c.152G>A:p.R1H)	27
<u>C1q</u>	Loss of function	Recessive	Homozygous C1q variant: NM_015991:exon3:c.378dupG:p.M126fs Homozygous C1q variant: NM_015991: exon3:c.470G>A:p.G157D	8
<u>C3</u>	Loss of function	Recessive	Missense homozygous C3 variant: NM_000064: exon:c.3710T>C:p.L1237P Homozygous C3 variant:exon:c.1003+1G>A	2
<u>C8b</u>	Loss of function	Recessive	Heterozygous variant of C8B: C8B:NM_000066:exon7:c.874T>C:p.F292L	1
<u>DNase II</u>	Loss of function	Recessive	Homozygous <i>DNase II</i> variant: NM_001375:exon2:c.902C>T (p.S301P) Homozygous <i>DNaseII</i> p.D121V	2
<u>PIK3CD</u>	Gain of function	Recessive	Heterozygous <i>PIK3CD</i> variant: NM_005026:exon24:c.3061G>A:p.E1021K	1
<u>PNP</u>	Loss of function	Recessive	Homozygous <i>PNP</i> variant: PNP:NM_000270:exon3:c.265G>A:p.E89K	1
<u>CYBB</u>	Loss of function	X-linked recessive	Hemizygous for L406X (T1217A) mutation in <i>CYBB</i> gene	1
<u>IRF2BP2</u>	Loss of function	Recessive	Homozygous <i>IRF2BP2</i> variant: NM_001077397: exon1:c.584C>T:p.S195L	1
<u>ISG15</u> <u>MLPH</u>	Loss of function	Recessive	Homozygous splicing site <i>ISG15</i> mutation (c.4-1G>A) Homozygous <i>MLPH</i> variant: NM_001281473:exon7:c.866delC:p.S289fs	1
<u>IL-2RB</u>	Loss of function	Recessive	Compound heterozygous <i>IL-2RB</i> variant: NM_000878:exon9:c.819-13C>G NM_000878:exon3:c.89-6C>T NM_000878:c.704-44C>G	1
<u>TALDO</u> <u>PTEN</u>	Loss of function	Recessive	Homozygous variant in <i>TALDO1</i> gene (NM_006755: exon 6: c.793C del: p. Q265f) Heterozygous variant in <i>PTEN</i> gene (NM_000314: exon 6: c.518G>C: p. R173P)	1
<u>STAT 1</u>	Gain of function	Recessive	Missense heterozygous <i>STAT I</i> variant: NM_007315:exon21:c.1873+13T>C	1
<u>NRAS</u>	Gain of function	Dominant Somatic	Somatic <i>NRAS</i> c.38A>G p.G13D	1

DNase1L3= deoxyribonuclease I-like3, *SCID*= severe combined immunodeficiency, *PNP*= purine nucleoside phosphorylase, *DNase II*= deoxyribonuclease II, *CGD*= chronic granulomatous disease, *CVID*= common variable immunodeficiency. *ISG15*= Interferon-stimulated gene 15, *IL-2RB*= interleukin-2 receptor β chain. *TALDO*= transaldolase, *PTEN* = Phosphatase and tensin homolog, *STAT1*= Signal transducer and activator of transcription 1

Dalla *Tabella 7* si può notare come il pattern di ereditarietà sia prevalentemente autosomico recessivo, eccetto la mutazione in *CYBB* che, pur essendo sempre ereditata recessivamente, vede una modalità di trasmissione X-linked e *NRAS* che, invece, è autosomica dominante.

In merito all'effetto della mutazione sulla proteina da codificare, la maggior parte delle varianti genetiche determina una perdita di funzionalità (*loss-of-function*), risultando in un deficit dell'attività proteica finale. Solo le alterazioni della sequenza genica di *PIK3CD*, *STAT1* e *NRAS* risultano in un'acquisizione patologica di funzione (*gain-of-function*) che, non essendo fisiologica e controllata, determina la malattia.

Nella colonna "*Gene variants*" della *Tabella 7*, sono riassunte e accorpate tutte le precise mutazioni geniche riscontrate nelle indagini genetiche condotte su ciascun paziente e riportate nelle cartelle cliniche di ognuno di essi.

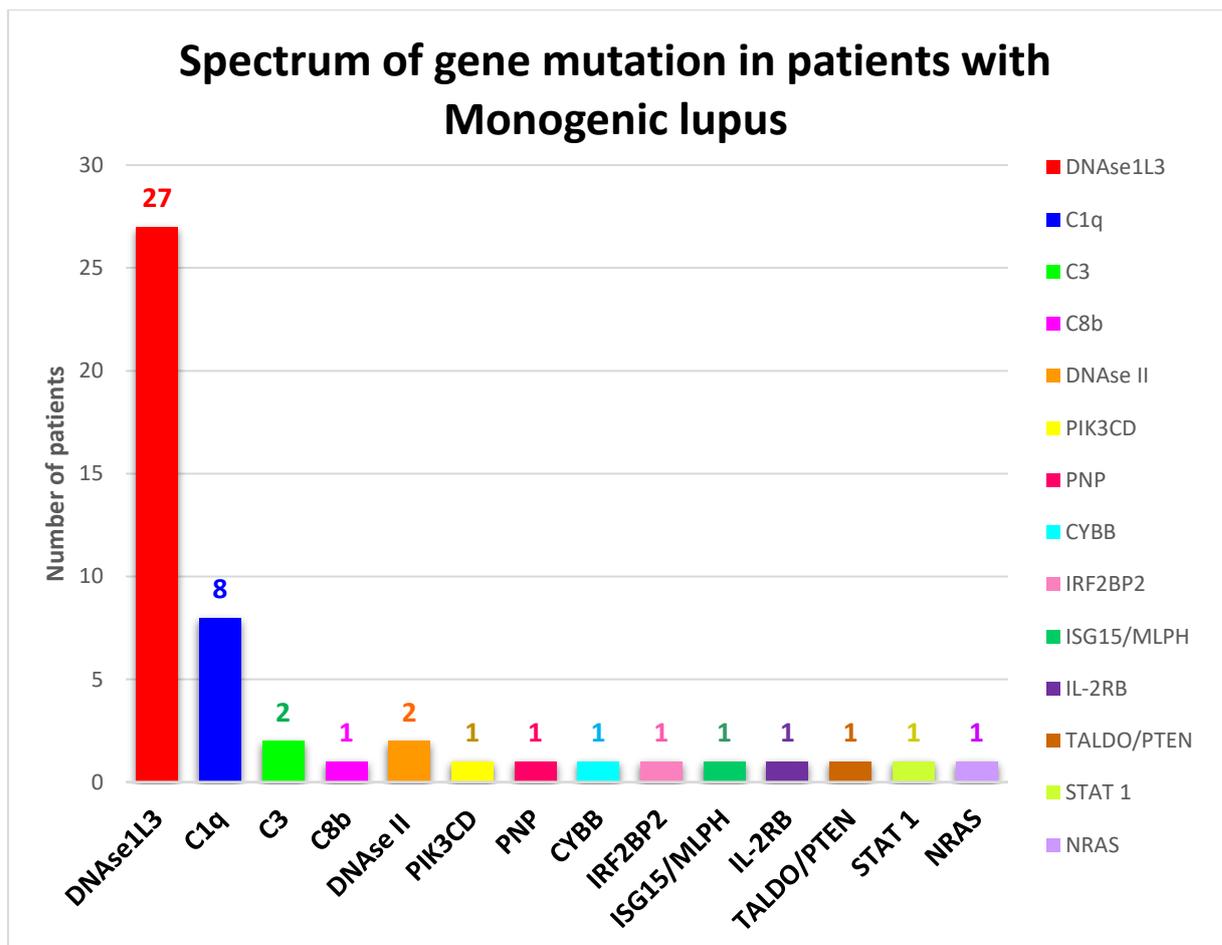


Grafico 6: Spettro delle mutazioni geniche riscontrate nei pazienti con diagnosi di *Lupus Monogenico*. In ascissa sono raffigurati tutti i geni mutati, in ordinata il numero dei pazienti espresso come valore assoluto.

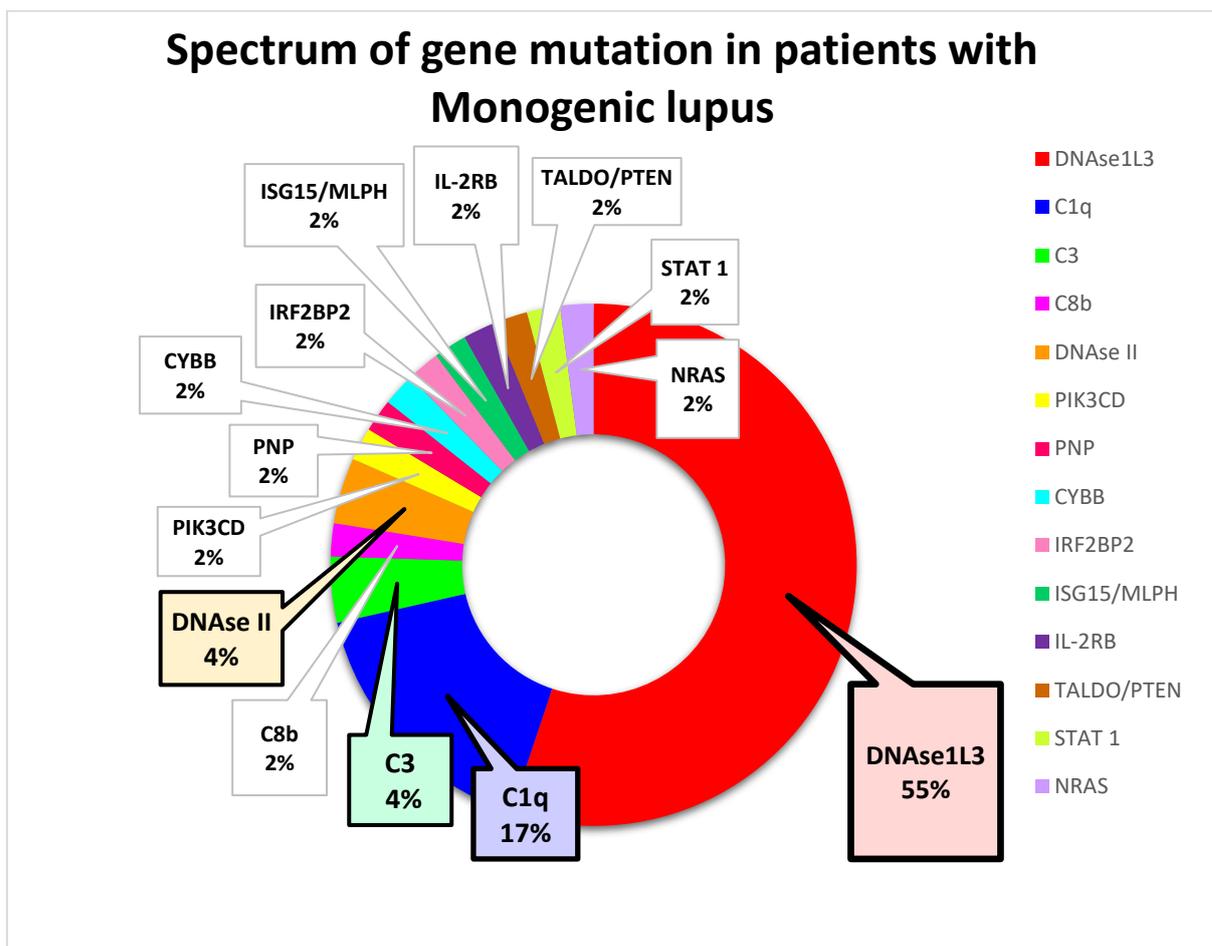


Grafico 7: Spettro delle mutazioni geniche riscontrate nei pazienti con diagnosi di Lupus Monogenico. I dati numerici raffigurati in questo grafico a torta sono espressi come valore percentuale (%).

Nei soprastanti *Grafici 6 e 7* sono riportati, in forma grafica, i dati numerici riassunti in *Tabella 7*. Come si può facilmente notare, la mutazione nel gene DNase1L3, con il suo 55%, risulta essere la fetta più rappresentata fra le alterazioni genetiche riscontrate nei nostri piccoli pazienti in studio. Segue il 17% di mutazioni a carico di C1q e il 4% a carico di DNaseII e C3. La restante parte dei geni si sono dimostrati mutati in una minoranza di soggetti analizzati, costituendo, ciascuno, solo il 2% del totale.

6.4. Confronto EULAR/ACR-2019 e SLICC-2012 nei pazienti con Lupus Monogenico

Al gruppo sperimentale di soggetti diagnosticati come Lupus Monogenico, così come al gruppo controllo, sono stati applicati entrambi i criteri classificativi in analisi, EULAR/ACR-2019 e SLICC-2012, per ottenere un confronto diretto di tutti i domini che li costituiscono.

Concentrando l'attenzione sui pazienti con la forma monogenica di Lupus, è interessante notare, in *Tabella 8*, come la frequenza dei vari domini clinici enunciati nei due set classificativi sia in realtà molto simile, se non sovrapponibile. Nello specifico, è questo il caso dei domini mucocutaneo, muscoloscheletrico, renale e sieroso che totalizzano lo stesso numero di pazienti sia per l'uno che per l'altro criterio. In particolare, 27 sono i pazienti che soddisfano il dominio mucocutaneo sia in EULAR/ACR-2019 che in SLICC-2012, 28 quelli per il muscoloscheletrico e renale, mentre un numero più esiguo, ossia 7, quelli per il dominio delle manifestazioni sierose.

Unica vera eccezione riguarda il dominio neuropsichiatrico che vede una divergenza più marcata nell'applicazione dei due set classificativi in analisi. Infatti, questo dominio è soddisfatto con una frequenza doppia negli SLICC-2012, che totalizzano 6 pazienti, piuttosto che in EULAR/ACR-2019 che ne identifica soltanto 3. Questo può ritenersi dovuto principalmente ad un più completo ed esaustivo elenco di manifestazioni della sfera neurologica e psichiatrica nei criteri SLICC-2012, che consente a un maggior numero di pazienti di potervi rientrare.

Per quanto riguarda gli ultimi due domini rimasti, ossia quello ematologico e immunologico, la differenza fra i due criteri è minima. EULAR/ACR-2019 è soddisfatto da 26 pazienti per la sfera delle manifestazioni ematologiche e da 46 individui per quella immunologica. SLICC-2012, invece, colleziona un numero di soggetti lievemente superiore in entrambi i domini, 28 nell'ambito ematologico e 49 in quello immunologico.

Tabella 8: Frequenza dei domini clinici dei criteri classificativi EULAR/ACR2019 e SLICC-2012 nei pazienti con diagnosi di Lupus Monogenico. I dati numerici riassunti in questa tabella sono riportati come valore assoluto e, tra parentesi, come valore percentuale (%).

Domains	EULAR/ACR-2019	SLICC-2012
<u>Constitutional</u> <i>number (%)</i>	26 (53.1)	NA
<u>Mucocutaneous</u> <i>number (%)</i>	27 (55.1)	27 (55.1)
<u>Musculoskeletal</u> <i>number (%)</i>	28 (57.1)	28 (57.1)
<u>Renal</u> <i>number (%)</i>	28 (57.1)	28 (57.1)
<u>Serositis</u> <i>number (%)</i>	7 (14.3)	7 (14.3)
<u>Neuropsychiatric</u> <i>number (%)</i>	3 (6.1)	6 (12.2)
<u>Hematologic</u> <i>number (%)</i>	26 (53.1)	28 (57.1)
<u>Immunologic</u> <i>number (%)</i>	46 (93.9)	49 (100)

EULAR/ACR= European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology, SLICC= Systemic Lupus International Collaborating Clinics. NA= not applicable.

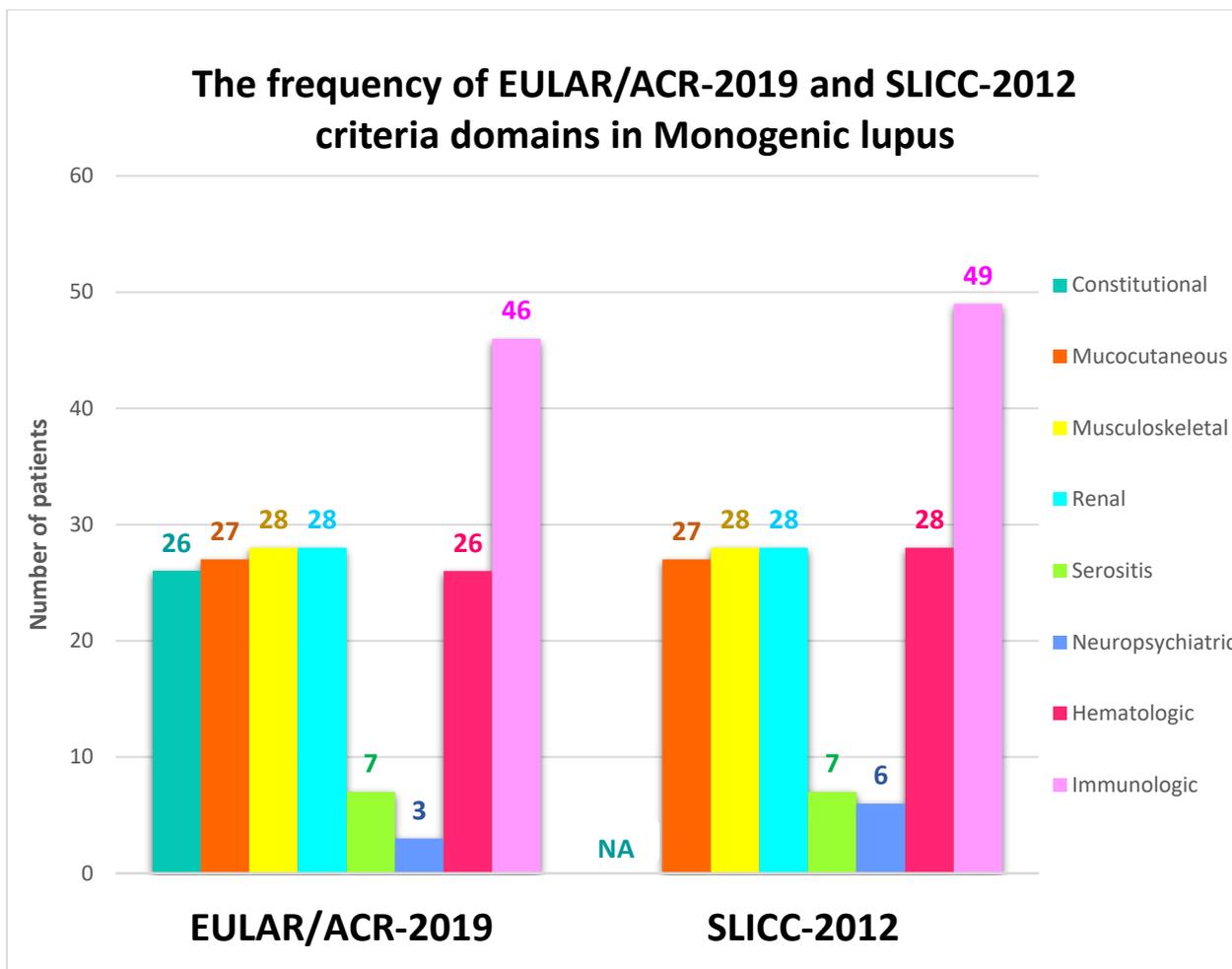


Grafico 8: Frequenza dei domini clinici dei criteri classificativi EULAR/ACR2019 e SLICC-2012 nei pazienti con diagnosi di Lupus Monogenico. In ascissa sono raffigurati i domini di ogni criterio in analisi, in ordinata il numero di pazienti totalizzato da ciascuno di essi, rappresentato come valore assoluto. NA: not applicable

Per quanto riguarda l'ambito dei sintomi costituzionali, è importante precisare che, nel caso del criterio di classificazione SLICC-2012, non è stato possibile effettuare il conteggio totale dei pazienti in grado di soddisfarlo a causa dell'assenza di tale dominio nella stesura del set classificativo. Per questo motivo in *Tabella 8* e nel *Grafico 8* la casella corrispondente a questo dato è stata riempita con la sigla NA (*not applicable*), in riferimento al fatto che il calcolo di questo specifico dominio non è stato applicato al gruppo di pazienti in analisi.

Quello che si può dedurre dalla valutazione di questi criteri nei pazienti affetti da Lupus Monogenico è che il dominio in assoluto più verificato, sia in EULAR/ACR-2019 che in SLICC-2012, è senza dubbio quello immunologico in quanto colleziona rispettivamente un 93.9% (46 su 49) e un 100% (49 su 49) di pazienti che lo soddisfano. Questi dati dimostrano che il nostro gruppo sperimentale manifesta nella sua storia clinica di malattia un'elevata incidenza di disregolazioni immunitarie, rilevate anche attraverso l'applicazione di questi sistemi classificativi oggetto di esame nel nostro studio.

La controparte meno rappresentata è, invece, costituita dal dominio sieroso che è stato soddisfatto dal 14.3% (7 su 49) degli individui in entrambi i criteri e, soprattutto, da quello neuropsichiatrico che è stato verificato da un misero 6.1% (3 su 49) negli EULAR/ACR-2019 e da un 12.2% (6 su 49) negli SLICC-2012. Questo significa che i bambini con forme monogeniche di Lupus da noi arruolati hanno nella loro anamnesi patologica una carente storia di sintomi neurologici e psichiatrici e anche uno scarso coinvolgimento delle sierose.

Tutti i restanti domini, in ambedue i set classificativi, ossia il mucocutaneo, il muscoloscheletrico, il renale e l'ematologico, sono stati soddisfatti in un range complessivo che oscilla tra il 53.1% (26 su 49) e il 57.1% (28 su 49) dei pazienti. Dimostrando di essere mediamente presenti in 1 bambino su 2 tra quelli che hanno ricevuto diagnosi di Lupus Monogenico.

Infine, si può sostenere che EULAR/ACR-2019 e SLICC-2012, nella loro applicazione al gruppo sperimentale, hanno permesso di identificare, in maniera quasi del tutto sovrapponibile, le manifestazioni cliniche enunciate nei loro domini qualora si fossero presentate almeno una volta nella storia anamnestica di ciascun paziente.

6.5. Frequenza dei domini di EULAR/ACR-2019 nei gruppi di pazienti in studio

I criteri di classificazione EULAR/ACR-2019 sono stati applicati a tutti i bambini in studio, sia al gruppo sperimentale con forme monogeniche di Lupus, sia al gruppo di controllo costituito dai pazienti con Lupus infantile sporadico e con patologie reumatologiche non rientranti nella categoria SLE (SJIA e JDM). Questo ha permesso di porre a confronto i vari domini del criterio di classificazione più recentemente pubblicato e di estendere le considerazioni, in merito alla sua performance, a tutta la coorte di pazienti arruolati.

Per ciascun dominio di EULAR/ACR-2019 e per ognuna delle categorie diagnostiche è stato calcolato il numero complessivo di pazienti che lo hanno soddisfatto e tutti i dati raccolti sono stati riassunti nella *Tabella 9* e nel *Grafico 9*, di seguito riportati.

Analizzando i risultati ottenuti dalla valutazione dei 49 soggetti con Lupus Monogenico, i domini che hanno mostrato una maggiore frequenza sono stati quello immunologico e quello riguardante la positività degli anticorpi antinucleo (ANA). In particolare, il dominio inerente i sintomi immunologici è stato soddisfatto da 46 pazienti, che corrispondono al 93.9% del totale, mentre la positività del titolo ANA ha totalizzato un numero ancora maggiore di individui, ossia 47, rappresentanti il 95.9%. Questi dati hanno confermato l'alta frequenza di alterazioni sierologiche e autoimmunitarie tra i nostri piccoli bambini con diagnosi genetica di SLE. Altri tre domini sono stati soddisfatti da più del 55% dei partecipanti e stiamo parlando nello specifico del mucocutaneo (27 pazienti= 55.1%), del muscoloscheletrico (28 pazienti= 57.1%) e del renale (28 pazienti= 57.1%).

I 55 pazienti con diagnosi di Lupus pediatrico sporadico hanno collezionato punteggi estremamente elevati nella sfera immunologica e anticorpale. Rispettivamente, 54 soggetti, dunque il 98.2%, hanno manifestato sintomi immunologici nel corso della loro storia clinica e, addirittura il 100% degli individui esaminati, ha presentato almeno una volta nella vita un titolo ANA positivo (>1:80). Un altro dominio frequentemente soddisfatto in questo gruppo di cSLE è stato quello riguardante le manifestazioni ematologiche, che ha totalizzato 43 pazienti (78.2%).

Nella categoria diagnostica dei non-lupus, quindi nei 49 bambini con diagnosi di artrite idiopatica giovanile o dermatomiosite, i domini che hanno ottenuto una frequenza maggiore sono stati quello inerente i sintomi costituzionali (33 pazienti=67.3%) e quello delle manifestazioni muscoloscheletriche (32 pazienti= 65.3%).

Tabella 9: Frequenza dei domini clinici del criterio di classificazione EULAR/ACR 2019 nei tre gruppi di pazienti in studio. I dati numerici riassunti in questa tabella sono riportati come valore assoluto e, tra parentesi, come valore percentuale (%). L'ultima colonna rappresenta il p value, anche detto livello di significatività osservato, calcolato per ciascun dominio analizzato.

Domains	Monogenic lupus	Sporadic lupus	Non-lupus	P value
<u>Constitutional</u> number (%)	26 (53.1)	30 (54.4)	33 (67.3)	0.3
<u>Mucocutaneous</u> number (%)	27 (55.1)	24 (43.6)	20 (40.8)	0.9
<u>Musculoskeletal</u> number (%)	28 (57.1)	23 (41.8)	32 (65.3)	0.005
<u>Renal</u> number (%)	28 (57.1)	22 (40.0)	0 (0.0)	<.0001
<u>Serositis,</u> number (%)	7 (14.3)	12 (21.8)	7 (14.3)	0.2
<u>Neuropsychiatric</u> number (%)	3 (6.1)	11 (20.0)	1 (2.0)	0.04
<u>Hematologic</u> number (%)	26 (53.1)	43 (78.2)	4 (8.2)	<.0001
<u>Immunologic</u> number (%)	46 (93.9)	54 (98.2)	0 (0.0)	<.0001
<u>ANA</u> number (%)	47 (95.9)	55 (100.0)	24 (48.9)	<.0001

EULAR/ACR= European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology,
ANA=antinuclear antibody.

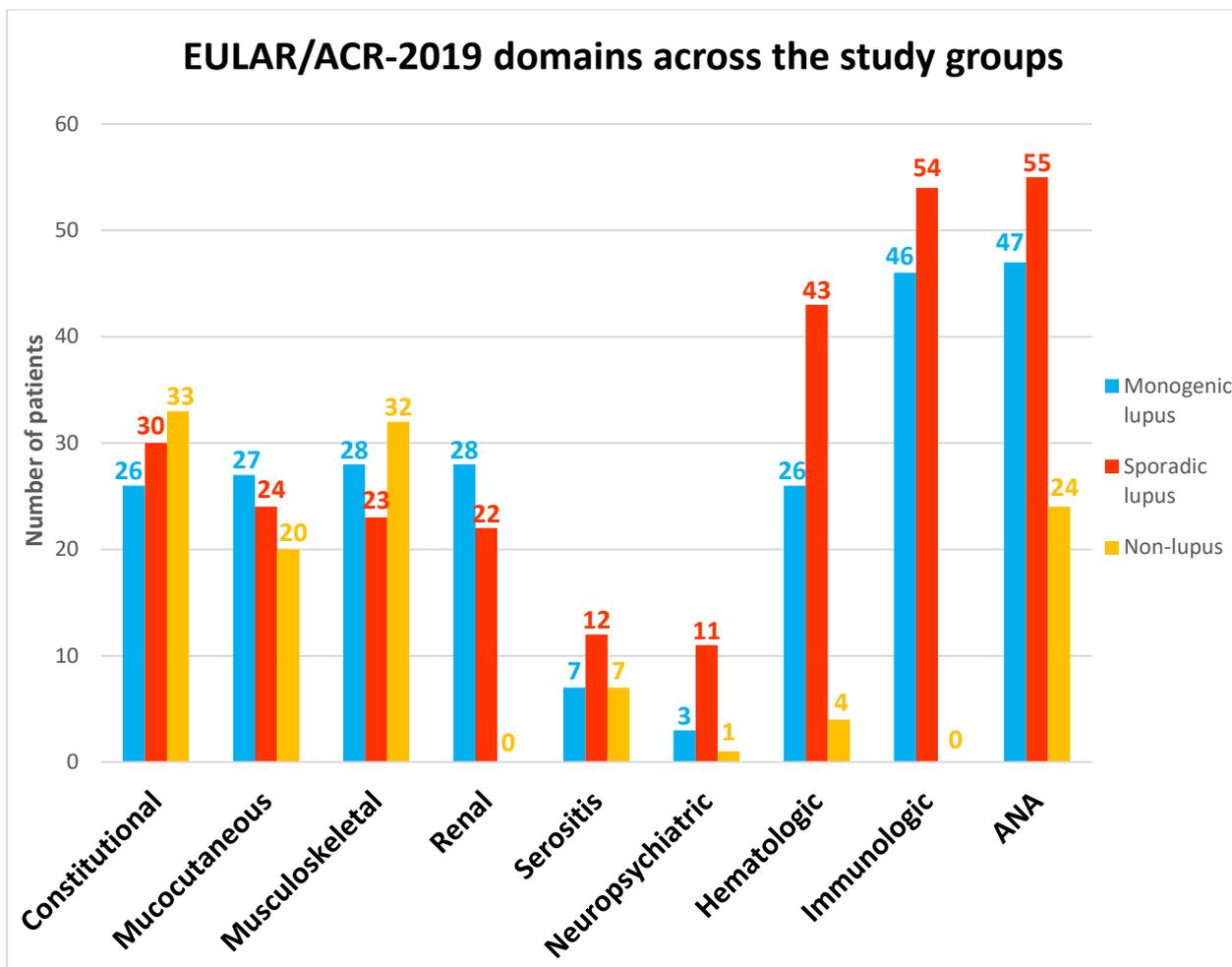


Grafico 9: Frequenza dei domini clinici del criterio di classificazione EULAR/ACR 2019 nei tre gruppi di pazienti in studio. In ascissa sono raffigurati tutti i domini clinici del criterio, in ordinata il numero complessivo di pazienti che li soddisfano, suddivisi per categoria diagnostica. I dati numerici riportati sono espressi come valore assoluto.

Mettendo a confronto le frequenze dei domini EULAR/ACR-2019 nei 3 gruppi in studio, si possono fare diverse considerazioni.

La prima e più evidente differenza che emerge riguarda i domini immunologici, ANA ed ematologici che differiscono significativamente tra la categoria diagnostica dei non-lupus e i pazienti con Lupus Monogenico e cSLE. Infatti, i bambini con SJIA e JDM raramente presentano queste alterazioni nella loro storia clinica, ne consegue che gli ANA sono risultati positivi solo in un 48.9%, le manifestazioni ematologiche richieste nel criterio si sono verificate solo in un 8.2% degli individui, mentre nessuno dei pazienti esaminati ha soddisfatto il dominio immunologico. Tuttavia, questo gruppo ha collezionato, come già detto, i punteggi maggiori nei sintomi costituzionali e muscoloscheletrici.

I pazienti con Lupus Monogenico hanno ottenuto, rispetto ai gruppi controllo, i punteggi più elevati nei domini mucocutaneo e renale, sottolineando come queste due sfere di manifestazioni cliniche siano molto gravi e frequenti nella storia anamnestica di questi piccoli bambini.

In generale, nell'intera coorte di individui esaminati i domini con la minor frequenza riscontrata si sono dimostrati essere quello sieroso e, soprattutto, quello neuropsichiatrico. Pur collezionando sempre punteggi minimi rispetto all'andamento globale, il gruppo di pazienti affetti da lupus sporadico è stato quello che ha dimostrato di soddisfarli maggiormente. 12 pazienti cSLE, quindi il 21.8%, ha soddisfatto il dominio sieroso e 11 (20%) quello neuropsichiatrico, contro rispettivamente i numeri assolutamente inferiori collezionati dagli altri due gruppi in studio.

Questo confronto ci ha permesso di effettuare una panoramica sulla frequenza dei vari domini di EULAR/ACR-2019 in pazienti con una storia clinica e un decorso di malattia molto diverso. È stato, quindi, un buon metro di giudizio per poter valutare il livello di performance di questo nuovo set classificativo e poter elaborare considerazioni più solide e attendibili.

6.6. Performance dei criteri di classificazione EULAR/ACR-2019

La valutazione delle prestazioni di EULAR/ACR-2019 nei pazienti con diagnosi genetica di Lupus Monogenico è l'obiettivo cardine di questo studio. È stato, quindi, calcolato quanto ciascun gruppo di pazienti in analisi è stato in grado di soddisfare questo criterio e la stessa operazione è stata ripetuta con SLICC-2012. In questo modo si è potuta valutare la performance dei due criteri e successivamente estrapolare il grado di sensibilità e specificità di EULAR/ACR-2019 nella classificazione delle forme monogeniche di SLE.

Dei 49 pazienti con Lupus Monogenico 44, dunque l'89.8%, hanno soddisfatto EULAR/ACR-2019 e lo score medio totalizzato, in seguito alla somma dei punteggi massimi di ogni dominio, è stato di 22.3, con una deviazione standard di ± 8.9 punti. Considerando, invece, il livello di soddisfazione inerente l'applicazione di SLICC-2012, 46 pazienti, rappresentati il 93.9%, hanno verificato i domini necessari. Fra i 5 soggetti che non sono riusciti a rispettare EULAR/ACR-2019, 3 bambini presentano la mutazione genetica in DNase1L3, 2 di loro erano ANA negativi, ossia con un titolo anticorpale inferiore ad 1:80, per cui non hanno rispettato il criterio d'ingresso cardine del set classificativo, anche se teoricamente, tralasciando questo vincolo di ingresso, avrebbero collezionato uno score rispettivamente di 12 e 13, che sarebbe stato sufficiente ai fini della valutazione finale. Il terzo paziente, invece, pur presentando positività ANA, ha totalizzato un punteggio complessivo minore di 10, che è il valore soglia minimo necessario alla soddisfazione del criterio. Anche gli ulteriori 2 individui rimasti, uno con deficit di C1q e l'altro con una variante mutata in IL-2RB, hanno ottenuto punteggi troppo bassi per raggiungere uno score complessivo superiore a 10, anche se il loro titolo anticorpale sarebbe stato sufficientemente elevato. Bisogna sottolineare che di questi 5 pazienti non rispettanti EULAR/ACR-2019, 4 non hanno soddisfatto nemmeno SLICC-2012.

Esaminando i 55 pazienti con diagnosi di Lupus sporadico, 54 hanno soddisfatto EULAR/ACR-2019 con una media degli score finali di 22.5 e una deviazione standard di ± 9.2 punti. Invece, per quanto riguarda SLICC-2012, 50 sono stati i bambini che lo hanno rispettato. Convertendo i dati numerici appena riportati in valore percentuale, si può ancora più facilmente notare che i livelli di soddisfazione ottenuti sono stati molto elevati, rispettivamente il 98.2% e il 90.9%.

I pazienti affetti da patologie non-lupus che hanno superato i valori soglia minimi necessari per la verifica di ciascun set classificativo sono stati una quantità molto più esigua, soprattutto se messi a paragone con gli altri 2 gruppi in studio. Tuttavia, questo risultato era già prevedibile in partenza, poiché i due criteri in analisi sono stati progettati per essere applicati a pazienti con diagnosi di SLE, dunque le manifestazioni cliniche in essi elencate sono più difficilmente riscontrabili nelle altre categorie diagnostiche. Numericamente parlando, i bambini che hanno soddisfatto EULAR/ACR-2019 sono stati 6 (12.2%) e hanno totalizzato uno score medio di 8.5 con una deviazione standard di ± 5.2 punti, dunque oscillante intorno al valore minimo sufficiente dei 10 punti. Gli SLICC-2012 sono stati rispettati solo da 3 pazienti, ossia da un 6.1% dei 49 totali. Tutti i pazienti che hanno soddisfatto EULAR/ACR-2019 e SLICC-2012 sono diagnosticati SJIA, nessuno degli affetti da JDM ha rispettato i criteri.

Sommando i risultati, ottenuti singolarmente dalle sottopopolazioni cSLE e non-lupus, 60 soggetti hanno soddisfatto EULAR/ACR-2019 e 53 SLICC-2012, rappresentando rispettivamente il 57.7% e il 50.9% dei 104 pazienti controllo complessivi.

Infine, dall'analisi di tutti questi dati si è potuto calcolare il livello di sensibilità e specificità del criterio di classificazione oggetto di studio, EULAR/ACR-2019, nel gruppo sperimentale. Di conseguenza, è stato possibile dare una stima attendibile riguardo le sue performance ogni qualvolta venisse applicato ai più piccoli pazienti affetti dalla rara forma monogenica di Lupus pediatrico. Il livello di sensibilità riscontrato si è dimostrato essere del 95.6% con un intervallo di confidenza al 95% (IC95%) tra 0.8 e 0.9, mentre il livello di specificità si è assestato al 75% con IC95% di 0.5-0.9. Come si attendeva, la specificità ha collezionato un valore inferiore alla sensibilità, sottolineando come questo set classificativo sia più sensibile che specifico.

Tutti i dati inerenti i livelli di soddisfazione di ciascun criterio e gli score totalizzati in EULAR/ACR-2019 sono riassunti nelle *Tabelle 10, 11 e 12* di seguito riportate e sono raffigurati nei *Grafici 10, 11 e 12*.

Tabella 10: Livello di soddisfazione del criterio EULAR/ACR-2019 nei 3 gruppi di pazienti in studio e nell'insieme del gruppo controllo. I dati numerici riassunti in questa tabella sono riportati come valori assoluti e, tra parentesi, come valore percentuale.

	Monogenic lupus	Sporadic lupus	Non-lupus	Control group
<u>Fulfilled EULAR/ACR-2019 criteria</u> number (%)	44 (89.8)	54 (98.2)	6 (12.2)	60 (57.7)

EULAR/ACR= European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology

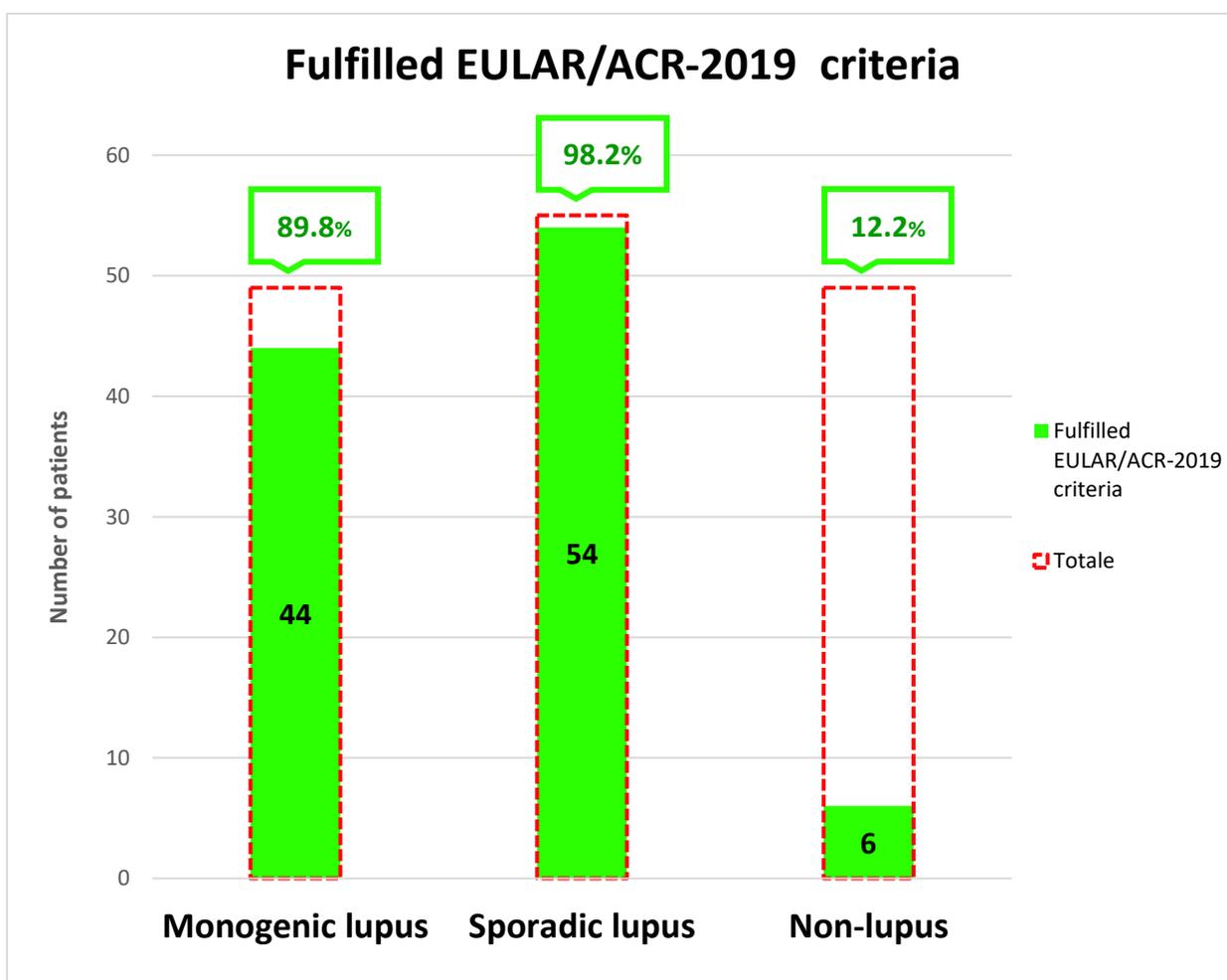


Grafico 10: Livello di soddisfazione del criterio EULAR/ACR-2019 nei 3 gruppi di pazienti in studio. In ascissa sono raffigurate le 3 categorie diagnostiche oggetto di analisi, in ordinata il numero di pazienti rappresentato come valore assoluto. Al di sopra di ciascun istogramma è evidenziato nell'etichetta il dato percentuale corrispondente al valore assoluto di ciascun istogramma verde.

Tabella 11: Media finale degli score totalizzati dai gruppi in studio in seguito all'applicazione del criterio EULAR/ACR-2019. I dati riassunti in questa tabella sono espressi come valore assoluto medio, affiancato dalla propria deviazione standard.

	Monogenic lupus	Sporadic lupus	Non-lupus
<u>EULAR/ACR-2019 score</u> <i>mean ± SD</i>	22.3 ± 8.9	22.5 ± 9.2	8.5 ± 5.2

EULAR/ACR= European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology. SD= standard deviation.

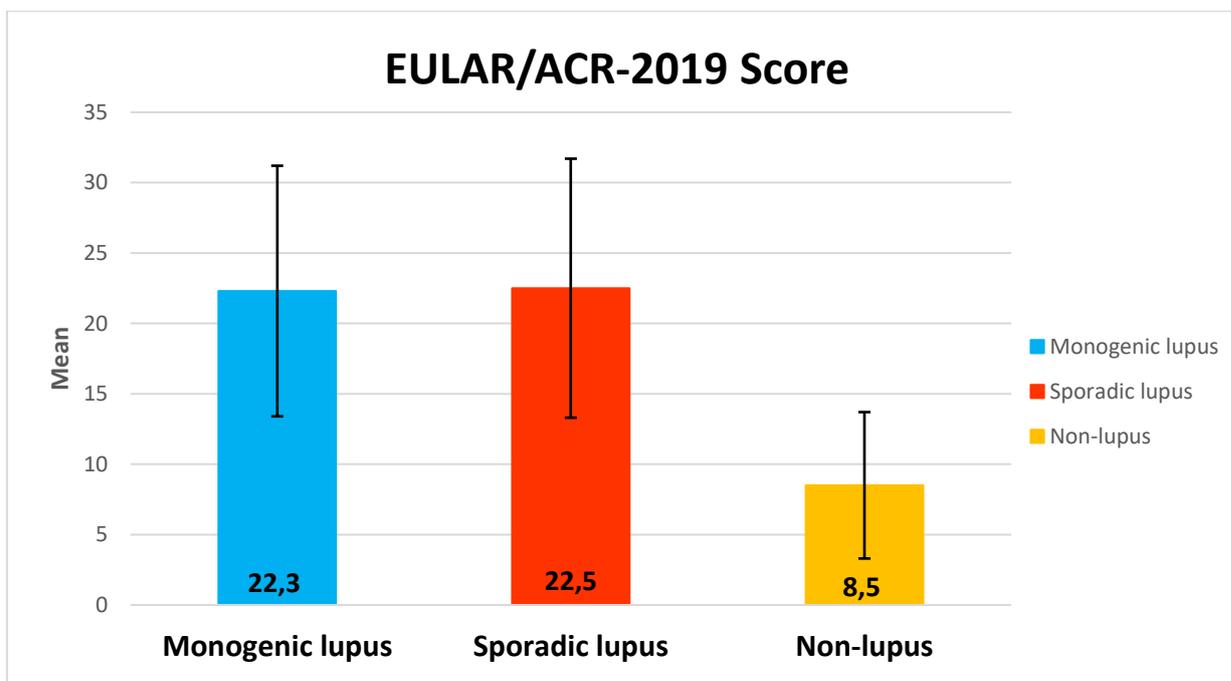


Grafico 11: Media finale degli score totalizzati dai gruppi in studio in seguito all'applicazione del criterio EULAR/ACR-2019. In ascissa sono riportate le categorie diagnostiche analizzate, in ordinata lo score rappresentato come valore assoluto medio. Ciascuna barra nera indica la deviazione standard.

Tabella 12: Livello di soddisfazione del criterio SLICC-2012 nei 3 gruppi di pazienti in studio e nell'insieme del gruppo controllo. I dati numerici riassunti in questa tabella sono riportati come valori assoluti e, tra parentesi, come valore percentuale.

	Monogenic lupus	Sporadic lupus	Non-lupus	Control group
<u>Fulfilled SLICC-2012 criteria</u> number (%)	46 (93.9)	50 (90.9)	3 (6.1)	53 (50.9)

SLICC= Systemic Lupus International Collaborating Clinics.

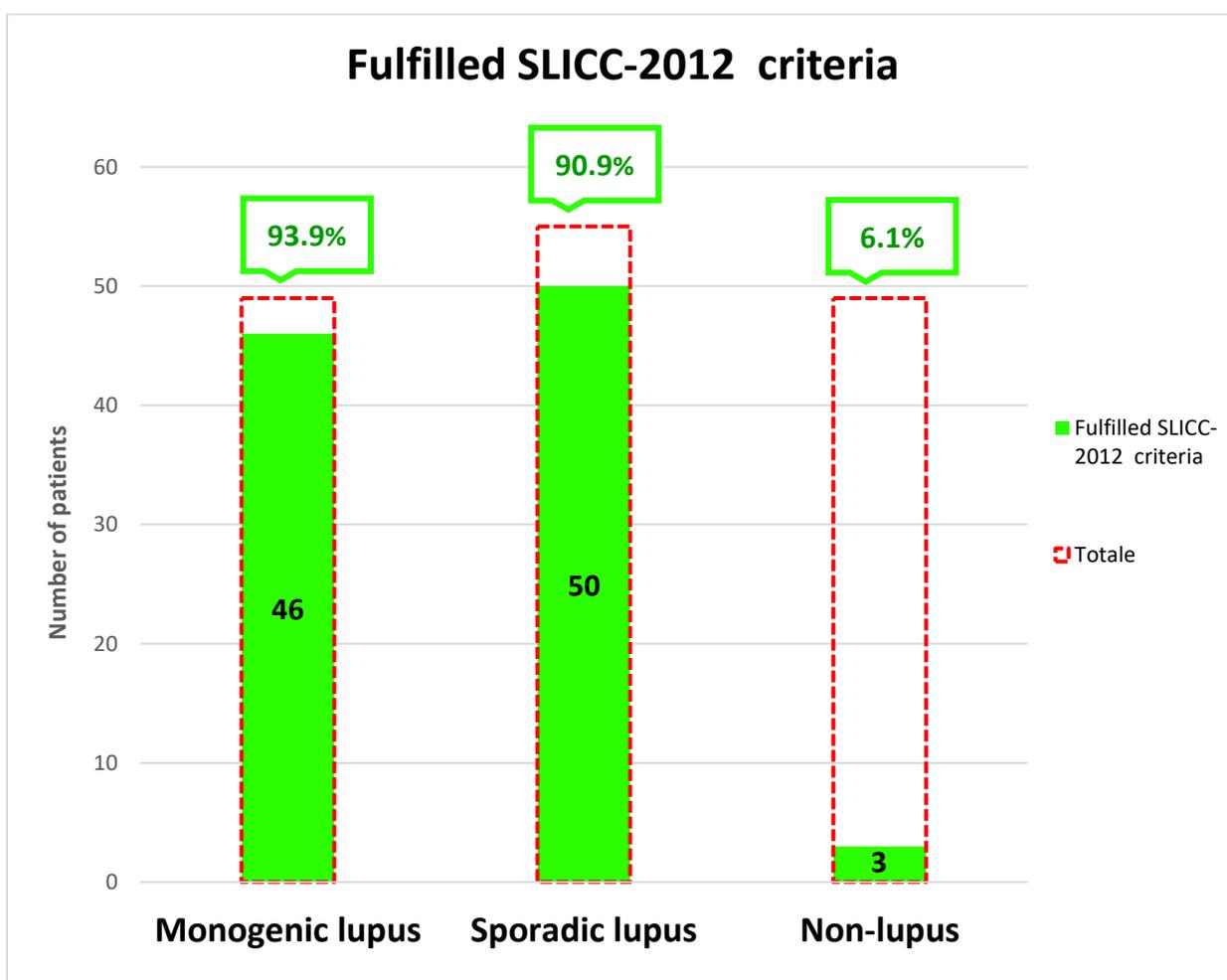


Grafico 12: Livello di soddisfazione del criterio SLICC-2012 nei 3 gruppi di pazienti in studio. In ascissa sono raffigurate le 3 categorie diagnostiche oggetto di analisi, in ordinata il numero di pazienti rappresentato come valore assoluto. Al di sopra di ciascun istogramma è evidenziato nell'etichetta il dato percentuale corrispondente al valore assoluto di ciascun istogramma verde.

6.7. Descrizione dei pazienti seguiti presso l'Istituto G. Gaslini

Paziente 1

Il paziente 1 è il primo di due fratelli, nato da genitori sani, non consanguinei, a termine di una gravidanza fisiologica, il cui periodo neonatale e la prima infanzia sono stati silenti dal punto di vista anamnestico. Fatta eccezione per sporadici episodi di vomito che non mostravano particolare correlazione con cibi o situazioni specifiche, alcuni episodi di orticaria e artralgie agli arti inferiori, il bambino ha goduto di buona salute fino all'età di 7 anni, quando è stato per la prima volta ricoverato presso il pronto soccorso locale a causa di un episodio di febbre e vomito particolarmente intenso e diverso dai precedenti. Successivamente il bambino ha sviluppato una sintomatologia complessa e variegata costituita da: iperpiressia, vomito, anuria, segni di disidratazione, linfadenopatia laterocervicale sinistra, epatosplenomegalia, lesioni eritemato-maculose a livello degli arti superiori e inferiori e lesioni necrotizzanti a livello del terzo dito, della pianta e del dorso del piede destro. Gli esami del sangue hanno mostrato un quadro di anemia non emolitica, ipertrigliceridemia, ipocomplementemia, incremento significativo della creatinina sierica, proteina C reattiva (PCR) alta e anticorpi antinucleo (ANA) positivi con un titolo di 1:320 a pattern omogeneo. All'analisi delle urine sono stati rilevati globuli rossi dismorfici, cilindri cellulari e un quadro di importante proteinuria. È stata fatta una diagnosi di insufficienza acuta pre-renale ed è stato ottenuto un miglioramento della funzionalità tramite reidratazione parenterale.

Lo screening infettivologico è risultato negativo per tutti i principali agenti microbici investigati e la funzionalità tiroidea si è dimostrata nella norma. La TC del torace e dell'addome ha individuato degli infiltrati polmonari associati ad un quadro di linfadenopatia mediastinica, para-aortica, retroperitoneale e mesenterica con anche un modesto ingrossamento di fegato e milza. È stata, inoltre, eseguita una biopsia linfonodale che ha evidenziato un'iperplasia linforeticolare con infiltrati linfoplasmacitoidi attivi e successivamente un aspirato midollare che ha escluso tumori maligni, ma ha individuato un'ipoplasia dei precursori dei globuli rossi.

Il bambino è stato trattato con Prednisone 1 mg/kg/die con una buona risposta clinica iniziale, ma successiva ricaduta di febbre e dolore addominale ad un mese di distanza, quando poi è giunto all'attenzione degli specialisti del nostro centro.

La ricorrenza di febbre, eruzioni orticarioidi e aumento degli indici di flogosi ha sollevato il sospetto di una malattia autoinfiammatoria.

Anakinra, un inibitore dell'interleuchina 1 (IL-1), è stato avviato, ma dopo pochi giorni dalla prima somministrazione il paziente ha sviluppato un'importante eruzione cutanea eritemato-pomfoide per cui i genitori hanno richiesto la sospensione della terapia. Il bambino è stato, quindi, dimesso con Prednisone per bocca da ridurre gradualmente fino alla dose minima efficace.

Durante i mesi successivi si sono verificate diverse riaccensioni di malattia caratterizzate principalmente da episodi di poliartrite, rash orticarioide, alopecia, microematuria e sindrome nefrosica. È stata, dunque, eseguita una biopsia renale che ha messo in evidenza un quadro di glomerulonefrite necrotizzante diffusa associata a mezzelune e autoanticorpi anticitoplasma dei neutrofili positivi (p-ANCA/MPO) (*Figura 7*). In seguito a questo riscontro, sono stati avviati boli intravenosi di Metilprednisolone e Ciclofosfamide per via endovenosa, ma la proteinuria e l'ematuria continuavano a persistere. Il controllo dell'infiammazione sistemica e della malattia renale non è stato raggiunto nemmeno con l'aggiunta del Micofenolato mofetile.

Nel corso degli anni successivi, il bambino ha sviluppato un ritardo di crescita e gravi quadri di anemia non emolitica che hanno richiesto trasfusioni ripetute di emazie e trattamento con eritropoietina (EPO).

Si è optato per l'esecuzione di una seconda biopsia renale, nella speranza di fare luce su questa patologia renale ingravescente, che ha documentato un quadro di glomerulonefrite diffusa necrotizzante accompagnata da proliferazione extra-capillare e fibrosi tubulo-interstiziale p-ANCA/MPO e c-ANCA positiva, con un titolo ANA sempre di 1:320. È stata, dunque, posta diagnosi di grave nefrite lupica di grado IV e i boli steroidei sono stati ripetuti in più occasioni. Tuttavia, nonostante diversi tentativi di terapia immunosoppressiva con Rituximab, Tacrolimus e Azatioprina, la malattia non ha accennato ad arrestarsi ed è addirittura progredita.

In seguito ad un riscontro peggiorativo della sintomatologia respiratoria, si è deciso di proporre una TC di controllo che ha rivelato plurime aree focali a localizzazione basale e apicale con il tipico reperto di opacità a vetro smerigliato (*ground-glass*). La spirometria ha, invece, posto diagnosi di un deficit ventilatorio di tipo restrittivo puro, associato ad una lieve riduzione della capacità di diffusione polmonare per il monossido di carbonio (DLCO).

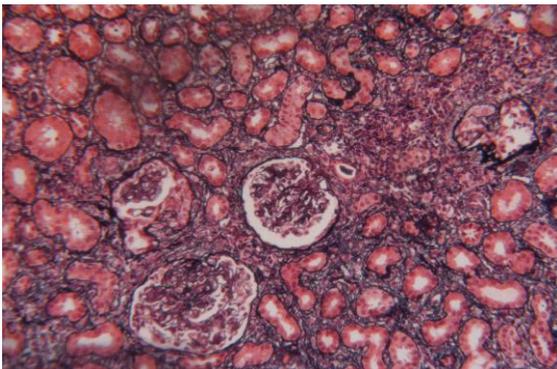
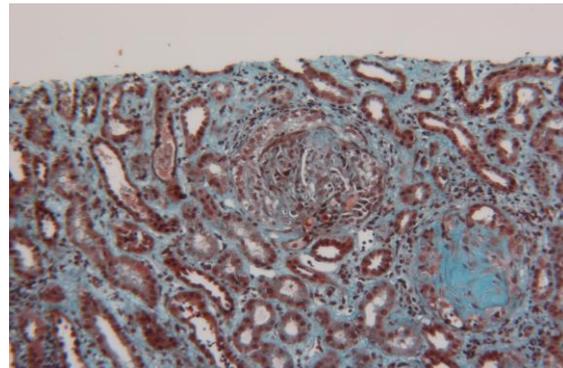
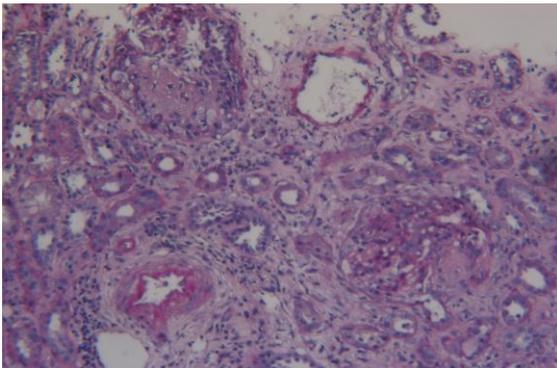
Alla luce di queste indagini diagnostiche, il quadro polmonare è stato etichettato come un'interstiziopatia accompagnata da una lieve riduzione della diffusione dei gas respiratori.

L'insieme di tutte queste complesse caratteristiche cliniche erano altamente indicative di una forma monogenica di lupus eritematoso sistemico, per cui si è resa necessaria la richiesta di test genetici specifici. Il DNA del paziente è stato analizzato utilizzando il pannello di screening basato sul sequenziamento di nuova generazione (NGS) e ha rivelato la presenza di una mutazione frame-shift in omozigosi (c.289_290delCA) del gene che codifica per l'enzima DNase1L3. Inoltre, attraverso l'analisi della firma interferonica su sangue periferico, è stato dimostrato un aumento dell'espressione genica regolata dall'interferone di tipo I. In seguito a questo inquadramento genetico avvenuto all'età di 13 anni, si è deciso di iniziare la terapia con il farmaco Ruxolitinib, inibitore della Janus chinasi, 2.5mg/2 volte al giorno, che ha portato alla remissione dei sintomi sistemici e dei marcatori di infiammazione, ma non della malattia renale.

Infatti, il coinvolgimento renale è progredito e il ragazzo ha sviluppato una malattia renale allo stadio terminale (ESRD) che ha costretto al trattamento dialitico. Un anno dopo l'inizio della dialisi, all'età di 16 anni, il paziente è stato sottoposto a trapianto renale da donatore deceduto, Ruxolitinib è stato interrotto due giorni prima del trapianto di rene ed è stata intrapresa terapia immunosoppressiva standard con Prednisone, Micofenolato e Tacrolimus. Sette giorni dopo il trapianto renale si è verificata una riattivazione acuta di malattia con rash orticarioide, febbre e rialzo degli indici di flogosi che è stata prontamente controllata attraverso l'incremento della dose di steroide, senza fortunatamente ulteriori riacutizzazioni durante lo scalo dei dosaggi. Nei tre anni successivi si è raggiunto un eccellente controllo dei sintomi sia sistemici che renali, in particolare, proprio a seguito del trapianto di rene, si è osservata una persistente normalizzazione dei marker infiammatori e dell'emoglobina, insieme ad una marcata ripresa della crescita staturale e ponderale. Attualmente il ragazzo è in terapia con Ruxolitinib che consente di mantenere un buon controllo di malattia ed è seguito presso il nostro centro per periodici controlli di follow up.

Per quanto riguarda il nostro studio, i dati anamnestici che si sono dimostrati rilevanti nell'applicazione dei criteri di classificazione EULAR/ACR-2019 e SLICC-2012 sono stati: il titolo ANA 1:320, gli episodi febbrili, l'alopecia, la poliartrite, la proteinuria nel range nefrosico, la nefrite lupica di classe IV alla biopsia renale, il riscontro di anticorpi anti-cardiolipina e l'ipocomplementemia.

Il paziente 1 ha soddisfatto sia EULAR/ACR-2019, con uno score complessivo di 26 punti, che SLICC-2012, verificando 6 domini su 17.



Pauci-immune
necrotizing
glomerulonephritis

Figura 7: Aspetto bioptico della glomerulonefrite pauci-immune necrotizzante diffusa.
Si evidenzia la presenza di mezzelune, autoanticorpi anticitoplasma dei neutrofili (p-ANCA/MPO e c-ANCA), proliferazione extra-capillare e fibrosi.

Paziente 2

La paziente 2 è una bambina che all'età di 4 anni ha sviluppato febbre, rash malare, edema al volto, eruzioni eritematose e orticarioidi, artrite non erosiva e anemia emolitica. Agli esami ematochimici presentava Hb 7.5 g/dl e test di Coombs diretto positivo a conferma del quadro anemico emolitico, VES 83 mm/h e PCR 0.79 mg/dl a delineare un aumento degli indici di flogosi, C3 56 mg/dl e C4 4 mg/dl che definiscono un quadro di ipocomplementemia, ANA positivi con titolo di 1:640 e riscontro di anti-dsDNA. La funzionalità epatica era nella norma, mentre si mostrava sul versante renale un quadro di marcato deterioramento della funzionalità con ematuria e proteinuria.

Visto il ripetersi di questi episodi e il recidivare della sintomatologia, veniva posta diagnosi di SLE pediatrico. Nel sospetto di una forma familiare è stato eseguito un pannello genetico per le forme monogeniche di lupus che ha identificato due varianti in eterozigosi composta del gene DNase1L3: delezione dell'esone 5 e variante missenso c.290_291delCA p.Thr97LLefs*2. Inoltre, su sangue periferico è stata anche eseguita l'indagine per la firma interferonica che però è risultata negativa. All'età di 9 anni la bambina ha, dunque, ricevuto la diagnosi di lupus Monogenico.

Nel corso degli anni è continuato il peggioramento della funzionalità renale, dell'ematuria e della proteinuria per cui si è resa necessaria l'infusione di tre boli endovenosi di Metilprednisolone e la somministrazione di Ciclofosfamide a dosaggi incrementali. Successivamente, è stato aggiunto alla terapia di fondo anche il Micofenolato mofetile.

Nonostante questa terapia immunosoppressiva aggressiva, la funzionalità renale è peggiorata ulteriormente e all'età di 12 anni, la ragazza ha sviluppato un'insufficienza renale acuta con creatinina elevata (10 mg/dl), azotemia (310 mg/dl), iperkaliemia (6.2 mEq/l), acidosi metabolica (bicarbonati 13.2 mmol/l) ipocomplementemia, macroematuria e proteinuria nel range nefrosico.

Si è, quindi, deciso di eseguire una biopsia renale che ha dimostrato un quadro di nefrite lupica di classe IIIC.

La terapia con Metilprednisolone per via endovenosa e Ciclofosfamide, pur essendo a dosaggi immunosoppressivi elevati, non ha evitato la progressione a insufficienza renale terminale (ESRD) che ha costretto il posizionamento di un catetere venoso centrale e l'inizio del trattamento emodialitico in regime ospedaliero per 3 volte alla settimana.

La ragazza è stata inserita in lista di attesa per il trapianto di rene, che ha ricevuto all'età di 13 anni, senza complicanze periprocedurali, da donatore deceduto. In seguito al trapianto è stata avviata la terapia immunosoppressiva standard con Micofenolato mofetile, Prednisone e Tacrolimus.

Fortunatamente, le condizioni cliniche della paziente post trapianto si sono mantenute stabili, senza successive ricadute e complicanze a lungo termine. La funzionalità renale e l'emoglobina si sono normalizzate, così come i marcatori infiammatori sono rimasti persistentemente negativi. Attualmente la ragazza ha 15 anni, sono trascorsi 2 anni dal trapianto e le condizioni cliniche si sono mantenute buone ai follow up periodici successivi.

Ai fini del nostro studio, i dati anamnestici che hanno avuto un peso nell'applicazione dei criteri classificativi sono stati: gli episodi febbrili, l'anemia emolitica autoimmune, il rash malare e maculopapulare inquadrabile come forma mucocutanea acuta di lupus, il coinvolgimento articolare, la proteinuria nel range nefrosico, il riscontro bioptico di nefrite lupica di classe IIIC, l'ipocomplementemia C3 e C4, l'elevato titolo ANA e il riscontro di anti-dsDNA.

La paziente 2 ha soddisfatto sia EULAR/ACR-2019, con uno score complessivo di 38 punti, sia SLICC-2012 verificando 8 domini su 17.

Paziente 3

Il paziente 3 è un bambino che ha goduto di buona salute fino all'età di 5 anni, quando ha sviluppato una sindrome nefrosica che ha richiesto un trattamento con corticosteroidi ad alto dosaggio, senza però ottenere alcun beneficio.

In seguito a questo primo episodio, nei due anni successivi, la funzionalità renale ha subito un deterioramento progressivo che ha visto necessaria l'esecuzione di una biopsia renale. Il bambino aveva 7 anni quando grazie all'esame istologico del campione bioptico è stata posta diagnosi di glomerulonefrite membranosa di classe II. Dal punto di vista terapeutico, il piccolo paziente è diventato steroide-dipendente e i trattamenti con Ciclosporina, Micofenolato mofetile, Clorambucile si sono dimostrati inefficaci.

A 13 anni il ragazzo ha sviluppato un quadro di insufficienza renale cronica, in quanto la sua patologia renale non accennava ad arrestarsi nonostante la terapia, i suoi livelli di creatinina hanno raggiunto valori di 5.6 mg/dl e la proteinuria è stata anche di 4.5 g/die.

All'età di 15 anni, visto il progredire della sintomatologia, si è reso necessario l'inizio della dialisi peritoneale.

Due anni più tardi è stato sottoposto a trapianto renale, ma sette giorni dopo aver ricevuto il rene trapiantato, il ragazzo ha manifestato una ricaduta di sintomatologia con una proteinuria in range nefrosico. Per fare luce su questo episodio, si è deciso di eseguire una biopsia sul rene ricevuto dal donatore e quello che si è evidenziato è stata una recidiva di glomerulonefrite che all'immunofluorescenza mostrava diffusi depositi di IgG2 e assenza di IgG4, reperto bioptico tipico di una glomerulonefrite membranosa primaria. Si è, quindi, deciso di avviare terapia con doppia infusione di Rituximab che ha visto una discesa della proteinuria a 1.2 g/die.

Tuttavia, questo miglioramento si è rivelato solo apparente, infatti, qualche mese più tardi, il paziente ha sviluppato una proteinuria di 13 g/die e una creatinina di 0.8 mg/dl nonostante addizionale somministrazione di Rituximab.

L'anno successivo il ragazzo ha contratto l'infezione da HCV che è stata trattata con Sofosbuvir e Daclatasvir. Sempre nello stesso anno si sono avviati boli di steroide, plasmaferesi e immunoglobuline per via endovenosa nella speranza di controllare la sintomatologia e porre in remissione la malattia.

In realtà tutti questi tentavi terapeutici si sono dimostrati inefficaci in quanto il ragazzo ha iniziato a sviluppare episodi febbrili nonostante tutte le analisi microbiologiche eseguite mostravano esito negativo.

All'età di 19 anni, visto il progressivo peggioramento della funzionalità renale è stato iniziato il trattamento emodialitico. Dal punto di vista delle manifestazioni sistemiche il paziente è stato più volte ricoverato per episodi di febbre ricorrente, di gastroenterite complicata da ascite, di dolori addominali, diarrea, pericardite e pleurite. Le analisi condotte sui campioni fecali, così come la gastroscopia, la colonscopia e i test per la malattia celiaca non hanno evidenziato nessuna alterazione che potesse giustificare il quadro clinico. Gli esami ematochimici hanno riscontrato una positività del titolo ANA (1:160), mentre gli anticorpi anti-dsDNA sono sempre stati negativi.

Per via del continuo deterioramento renale è stata eseguita dapprima l'embolizzazione dell'arteria renale e successivamente la nefrectomia, nel sospetto di una sindrome da intolleranza al rene trapiantato non funzionante (*Graft Intolerance Syndrome*).

Il mese successivo, il ragazzo ha sviluppato febbre, dolore addominale e ascite il tutto complicato da un quadro di severa peritonite che ha richiesto un tempestivo trattamento con Meropenem, Linezolid, Amikacina e Caspofungina. Le analisi microbiologiche e il titolo ANA, entrambi condotti sul liquido peritoneale, erano negativi. Con la terapia antibiotica si è ottenuto un miglioramento della sintomatologia, nonostante la PCR è rimasta alta (20-50 mg/l) ed è residua una leggera ascite. A livello polmonare l'imaging ha mostrato un infiltrato posteriore basale sinistro con lieve effusione pleurica, mentre l'ecografia addominale ha evidenziato un'epatosplenomegalia. La conta delle cellule su sangue ha riscontrato un'ipereosinofilia (2000-3000/ul), gli esami ematochimici, invece, un consumo del complemento, nonostante non ci sia mai stato un quadro di franca ipocomplementemia.

La diagnosi di SLE è stata sospettata per via del quadro istopatologico renale, delle sierosità ricorrenti e del titolo ANA positivo. Tuttavia il fenotipo di questo ragazzo differiva dalle forme classiche di lupus pediatrico in quanto i marcatori sierologici specifici come anti-dsDNA e antiENA sono sempre stati negativi, la recidiva della malattia renale a carico del rene trapiantato è stata troppo brusca e troppo precoce, infine, non vi erano altri segni e sintomi sistemici di lupus (ad esempio ematologici o mucocutanei).

Nell'ipotesi di forme monogeniche di SLE e di altre interferonopatie è stata eseguita su sangue periferico la firma interferonica che è risultata negativa, mentre il test genetico ha identificato una mutazione frame-shift in omozigosi del gene DNase1L3 (c.289_290delCA) che porta a troncamento della proteina normalmente codificata. È stata quindi posta diagnosi, all'età di 20 anni, di lupus Monogenico.

Nel nostro studio, ai fini dell'applicazione dei criteri di classificazione, i sintomi e i segni clinici rilevanti sono stati: gli episodi febbrili ricorrenti, la pericardite e la pleurite, la proteinuria nefrosica, la biopsia renale di classe II e il titolo ANA positivo.

Il paziente 3 ha soddisfatto sia EULAR/ACR-2019, con uno score complessivo di 16 punti, che SLICC-2012. In quest'ultimo caso perché, pur non totalizzando complessivamente 4 domini su 17, ha manifestato segni bioptici di nefrite lupica associati ad una positività ANA, due domini che, se presenti contemporaneamente, sono sufficienti alla verifica di questo criterio.

Paziente 4

Il paziente 4 è nato da genitori sani, non consanguinei, a termine di una gravidanza fisiologica con parto eutocico. L'anamnesi familiare è muta per patologie autoimmuni. Il piccolo bambino ha goduto di sostanziale benessere fino all'età di 3 anni, quando è giunto all'attenzione dei colleghi pediatri presso l'ospedale di residenza per un quadro di linfadenopatia diffusa (prevalentemente in sede ascellare). All'esame obiettivo si evidenziava la presenza di linfonodi di consistenza teso elastica, non dolenti, mobili, con lesioni cutanee roseoliformi eritematose fisse ai quattro arti e all'addome. Gli esami ematochimici e di laboratorio hanno riscontrato Quantiferon, sierologia per TORCH e Bartonella negativi, ANA e ENA assenti e striscio periferico nella norma. È stato eseguito anche un esame ecografico dei linfonodi ascellari che ha mostrato alcune linfadenopatie ovalari con ilo evidente. Il bambino è stato dimesso con Claritromicina per 10 giorni. Tuttavia, dopo 20 giorni è stato nuovamente ricoverato per persistenza di linfadenopatia generalizzata. Anche in questa occasione l'emocromo con striscio periferico e il Monotest sono risultati negativi e il bambino è stato mandato a casa con terapia antibiotica: Amoxicillina e acido Clavulanico.

Tre mesi più tardi si è verificato un peggioramento del quadro clinico generale. Il bambino ha manifestato episodi febbrili, linfadenopatia generalizzata, comparsa di rash eritematoso al volto, agli arti e al tronco non pruriginoso e peggiorato dall'esposizione solare. Gli esami ematici documentavano una VES e una PCR elevate, lieve anemia (Hb 10.8 g/dl), Monotest negativo, ANA e ENA assenti e screening per morbo celiaco negativo. L'ecografia dell'addome risultava nella norma, l'ecografia del collo evidenziava linfonodi ingranditi in sede laterocervicale bilateralmente, di natura presumibilmente reattiva, stesso reperto ecografico si descriveva a livello del cavo ascellare e in regione inguinale. È stato eseguito anche un ecocardiocolordoppler risultato privo di connotati patologici. Visto il quadro clinico sfumato si è deciso di effettuare anche la genetica per le febbri periodiche che ha documentato la presenza della mutazione c.208>G (p.K695R) allo stato eterozigote nell'esone 10 del gene MEFV e assenza di mutazioni del gene MVK e del gene TNFRSF1A. Durante la degenza il bambino ha presentato transitori episodi di tumefazione dolorosa con segni di rubor e calor a carico delle articolazioni interfalangee prossimali e metacarpo-falangee del IV dito della mano sinistra, del I dito della mano destra e del V dito del piede sinistro, associati alla comparsa di fugace rash maculo-papulare diffuso a tronco e arti inferiori.

È stata eseguita una biopsia linfonodale a livello del cavo ascellare destro che ha evidenziato reperti di linfadenite reattiva. In considerazione del quadro clinico e laboratoristico, si è deciso di avviare terapia con antinfiammatorio per 4 settimane, alla sospensione della quale è ricomparsa febbre, tumefazione articolare, questa volta coinvolgente soprattutto il ginocchio destro e le interfalangee, e anche il rash roseoliforme diffuso. Gli esami ematici mostravano un persistente aumento degli indici di flogosi. Durante la degenza è stata eseguita una scintigrafia ossea che è risultata priva di connotati patologici e anche un aspirato midollare che ha documentato un quadro morfologico di midollo reattivo.

La sintomatologia continuava a persistere con rialzi febbrili e vomito. All'emocromo si presentava un quadro di anemia, piastrinosi, VES e PCR elevate, consumo del complemento (in particolare della frazione C3), diminuzione della ferritina, ACE nella norma e ANA positivi con titolo 1:160. Si è pertanto deciso di iniziare terapia steroidea con Prednisone (1 mg/kg/die) con progressivo décalage, che ha portato ad un miglioramento della linfadenopatia.

All'età di 4 anni il bambino è stato di nuovo ricoverato per ricomparsa di febbre e tumefazione alle ginocchia che impedivano la deambulazione. Durante la degenza è stata eseguita una RMN del ginocchio destro con Mdc che ha mostrato una falda di versamento articolare in sede retro patellare e nei recessi paracondilari bilateralmente. Inoltre, alla visita oculistica è stato evidenziato un quadro di congiuntivite allergica, mentre agli esami ematochimici un'anemia microcitica. È stata nuovamente intrapresa terapia steroidea con Prednisone che ha permesso una rapida defervescenza e un miglioramento dell'obiettività articolare. Il bambino è stato dimesso con diagnosi di sospetta artrite idiopatica giovanile.

Negli anni seguenti il quadro clinico si è dimostrato avere un andamento remittente-ricidivante. Il bambino presentava, quasi costantemente o a cicli, linfonodi palpabili in sede ascellare, inguinale e sottomandibolare bilateralmente e episodi di rash maculo-papulare non confluyente e non pruriginoso. Saltuariamente si verificavano dolori addominali e congiuntivite. Sono, invece, regredite sia le puntate febbrili che il coinvolgimento articolare, fatta eccezione per una lieve rigidità mattutina associata ad artralgie degli arti inferiori con risoluzione spontanea. Anche il faringe si è sempre mantenuto roseo senza comparsa di aftosi orale. È stata eseguita una visita allergologica che ha mostrato prick test positivi per graminacee e olivo con indicazione ad intraprendere terapia con Dicoflor D3 5 gtt/die e Rupafin 7 ml/die.

Gli esami ematochimici sono stati ripetuti a finalità di follow up e hanno mostrato lieve leucocitosi con linfocitosi, piastrinosi, anemia, indici di flogosi aumentati, C3 e C4 nei limiti, ANA assenti, TAS negativo, transglutaminasi IgA, esame delle urine e valutazione dell'apoptosi indotta dall'attivazione dell'antigene Fas nella norma.

Nonostante il sostanziale benessere del piccolo, continuavano a permanere sia il coinvolgimento linfonodale che cutaneo, per questo motivo il bambino all'età di 8 anni è giunto alla nostra attenzione e ha effettuato il primo accesso presso il nostro centro. In tale occasione si è riscontrato un quadro caratterizzato da vasculite ad aspetto orticarioide, interessamento articolare e linfoadenomegalia. Gli esami eseguiti, oltre all'aumento dei marker infiammatori (VES, PCR, SAA), hanno segnalato una debole positività del LAC, assenza di ANA ed ENA e C4 ai limiti inferiori della norma. Inoltre, all'esame urine su singola minzione è stata riscontrata la presenza di microalbuminuria, motivo per cui è stata indicata una raccolta urine delle 24h con dosaggio della proteinuria. È stata effettuata anche una capillaroscopia che non ha evidenziato nessun reperto patologico. In seguito all'analisi del quadro e al confronto multidisciplinare si è deciso di avviare terapia con Idrossiclorochina 100 mg/die.

Ai successivi controlli di follow up con cadenza trimestrale presso il nostro Istituto, si è potuto riscontrare un netto miglioramento della sintomatologia soprattutto articolare e linfonodale. Anche gli esami ematici, la raccolta urine delle 24h e l'ecografia renale sono risultati globalmente nella norma. La terapia con Idrossiclorochina non è risultata affidabile per via della scarsa collaborazione, per cui si è deciso di aumentare il dosaggio a 200 mg/die. Questo ha permesso di constatare, all'ultimo controllo, un netto miglioramento della sintomatologia sistemica, con la sola persistenza di manifestazioni cutanee a cadenza settimanale trattate con antistaminici. Ad oggi il quadro rimane più sfumato e lieve, le riacutizzazioni si verificano solo in associazione ad episodi infettivi, mentre non si sono più presentati episodi acuti in assenza di trigger scatenanti.

Presso il nostro centro, per un miglior inquadramento diagnostico, è stata eseguita l'analisi genetica che ha permesso di identificare una mutazione in omozigosi c.289_290delCA nel gene della DNase1L3. Il bambino aveva 8 anni quando grazie a questa scoperta si è potuta porre diagnosi genetica di Lupus Monogenico.

Ai fini del nostro studio, i dati anamnestici di questo piccolo paziente che hanno dimostrato avere un valore nell'applicazione dei criteri di classificazione sono stati: gli episodi febbrili, le manifestazioni cutanee, il coinvolgimento articolare, il consumo del complemento nella frazione C3 e il titolo ANA.

Il paziente 4 ha soddisfatto sia EULA/ACR-2019, totalizzando uno score di 17 punti, sia SLICC-2012, verificando 4 domini su 17.

Paziente 5

Il paziente 5, nato alla 37° settimana di una gravidanza normodecorsa, ha presentato alla nascita una condizione di insufficienza epatica acuta, a eziologia non chiara, insorta con pallore, ittero, emorragie cutanee, epatosplenomegalia, ipertransaminasemia, bilirubina e ferritina elevate, leucocitosi, anemia e piastrinopenia (per cui sono state necessarie trasfusioni). La biopsia epatica evidenziava un infiltrato istiocitario a livello degli spazi portali, un'organizzazione panacinare degli epatociti, una strutturazione pseudoghiandolare comprendente trombi biliari, segni di colestasi di lunga data e paucità dei dotti biliari. È stata esclusa la diagnosi di emosiderosi ed è stato eseguito il puntato midollare, anch'esso risultato negativo. Questo episodio è stato seguito da un periodo di sostanziale benessere.

All'età di 3 anni è stata ripetuta la biopsia epatica, con riscontro di un quadro di iniziale cirrosi con segni di attività, l'EGDS, eseguita nello stesso anno, non ha evidenziato segni di ipertensione portale.

Il bambino ha goduto di buona salute fino all'età di 6 anni, quando sono comparsi per la prima volta artralgie, rigidità articolare e contratture in flessione delle grandi e piccole articolazioni, associati a saltuari rialzi febbrili. Questi episodi, inizialmente inquadrati come artrite idiopatica giovanile ad esordio poliarticolare, sono recidivati negli anni successivi, accompagnati da altri sintomi e segni quali: palato ogivale con micrognazia, dismorfismi facciali, proteinuria, ematuria di verosimile origine glomerulare, chiazze cutanee iperemiche. Agli esami ematochimici sono emersi: leucopenia con linfocitopenia (valori sempre inferiori a 1000, spesso <500), Hb variabile tra 10-12 g/dl, VES persistentemente alterata con PCR negativa o poco mossa, ANA positivi con titolo 1:640, anti-dsDNA positivi, LAC in un riscontro e C3 e C4 ai limiti inferiori o francamente ridotti. Tali esami si sono sempre mantenuti pressoché invariati nonostante le diverse terapie immunosoppressive di fondo e la terapia steroidea, anche ad alto dosaggio, efficace più sulla sintomatologia articolare e sulla febbre.

All'età di 10 anni, sono stati eseguiti alcuni accertamenti diagnostici: l'aspirato midollare ha evidenziato un quadro compatibile con malattia infiammatoria cronica, la biopsia epatica ha riscontrato focolai cirrotici in assenza di flogosi attiva e la biopsia renale ha individuato reperti istologici di verosimile glomerulonefrite membranosa di classe V. In quell'occasione sono state effettuate anche delle infiltrazioni articolari alle ginocchia con posizionamento di

docce, al fine di mantenere gli arti in estensione e migliorare la deformità flessoria. Inoltre, è stata avviata la terapia con Metotrexate 12.5 mg alla settimana.

All'età di 13 anni, in seguito ad un tentativo di sospensione dello steroide, si è verificato un episodio di recrudescenza della sintomatologia con dolore addominale, aftosi orale, artralgie diffuse, lesioni eritematoso-nodulari a carico di due articolazioni interfalangee prossimali e articolazioni globalmente limitate pur in assenza di flogosi attiva. La ripresa del cortisone 25 mg/die ha migliorato la sintomatologia. Tuttavia, nei mesi successivi si sono riacutizzati il dolore articolare, la febbre, i rash cutanei maculo-papulari al dorso delle mani e sono comparse anche una ridotta apertura della rima orale per alterata morfologia del condilo mandibolare di sinistra, cefalea e disfonia con voce da false corde.

Per un miglior inquadramento clinico si è deciso di ripetere una biopsia renale che ha evidenziato, a fronte di scarsi aspetti patologici sia glomerulari che tubulointerstiziali, una discreta quantità di immunocomplessi con la frazione C1q del complemento più attiva e a seguire IgM, C3 ed IgG. Questo reperto bioptico è stato interpretato come un quadro di nefrite simil-lupica ed è stata avviata terapia con Micofenolato mofetile. È stata eseguita anche una RM del bacino che ha mostrato un aspetto tozzo del collo femorale bilateralmente, una diffusa ipotrofia muscolare e una marcata disomogeneità del segnale midollare a livello del collo e della diafisi femorale, delle ossa del bacino e in minor misura del rachide in T1, compatibile con sostituzione del midollo giallo da possibile malattia da accumulo.

Sospesa la terapia con Micofenolato mofetile per inefficacia, è stato avviato un ciclo di iniezioni di Canakinumab (anticorpo monoclonale umanizzato contro l'Interleuchina-1 β) 100 mg s.c. con tentativo di riduzione dello steroide a 12.5 mg/die. Tuttavia, sempre per inefficacia è stato sospeso anche il Canakinumab, ed incrementato nuovamente il Prednisone a 25 mg/die.

La malattia non risultava essere ben controllata né dal punto di vista clinico (persistenza di rigidità articolare lamentata dal paziente e di artrite riscontrata obiettivamente, presenza di lesioni crostose ai gomiti e alle dita), né da un punto di vista laboratoristico (leucopenia, anemia e indici di flogosi, in particolare VES, aumentati) con continui episodi di recrudescenza alla diminuzione del dosaggio di steroide e con risposta quasi nulla a qualsiasi altro trattamento.

Il bambino ha sempre risposto bene alla terapia steroidea, senza però mai completa risoluzione della rigidità articolare e ha mostrato un'importante steroido-dipendenza, nonostante l'avvio di altre terapie immunosoppressive (Metotrexato e Azatioprina) e biologiche (Etanercept, Anakinra, Infliximab e Canakinumab) che sono state sospese per inefficacia e, solo in una minoranza dei casi, per effetti collaterali.

La sintomatologia del bambino, evolvendo in maniera sempre più complessa nel tempo, con comparsa di dolore addominale ricorrente, rinolalia e manifestazioni cutanee eritemato-desquamative ai gomiti e sulla superficie estensoria delle dita delle mani, risultava di difficile gestione. È stato eseguito anche un esame spirometrico, sulla base del quale è stato evidenziato un modesto quadro restrittivo e una riduzione dei valori alla DLCO. Per approfondimento, il ragazzo è stato sottoposto anche a una TC del torace che ha evidenziato un principio di interstiziopatia polmonare.

I numerosi elementi clinici hanno reso necessaria un'accurata diagnosi differenziale: sono state escluse le malattie metaboliche attraverso l'accertamento dei valori di acidi organici ed amminoacidi urinari, acidi grassi a catena lunga, sialotransferrine, GAG (glicosaminoglicani) urinari, mucopolisaccaridi urinari, alfa-iduronidasi, alfa-galattosidasi, acido lattico, ammoniemia, antitripsina plasmatica, chitotriosidasi, tutti risultati nella norma; per la presenza di febbre, interessamento articolare, cutaneo, addominale e della costante elevazione degli indici di flogosi sono state eseguite le indagini genetiche per le principali malattie autoinfiammatorie (CANDLE, MKD, FMF, TRAPS, CIAS1), risultate negative.

Successivamente, alla luce dei dati clinici, laboratoristici e strumentali, evocativi di una sindrome simil-lupica è stato avviato il percorso diagnostico per le interferonopatie monogeniche. Il ragazzo è stato sottoposto alla valutazione della firma dell'interferone che è risultata molto elevata e il suo DNA è stato analizzato attraverso lo studio dell'intero esoma con la tecnica NGS. È stata riscontrata la mutazione c.A362T (mutazione da Adenosina a Timina nella posizione 362 del cDNA) a carico del gene che codifica per la DNase2 sull'esone 4, che corrisponde a p.D121V, una mutazione patogenetica da Aspartato a Valina nella posizione 121 della proteina. Questa indagine ha permesso di fare diagnosi genetica di lupus Monogenico nel paziente ormai 18enne.

Nel nostro studio i dati anamnestici rilevanti per l'applicazione dei criteri classificativi sono risultati essere: la febbre, la leucopenia e la trombocitopenia, l'aftosi orale, il rash cutaneo maculo-papulare, il coinvolgimento articolare, la proteinuria, la nefrite da immunocomplessi di classe V, la positività del LAC, degli ANA e degli anti-dsDNA e l'ipocomplementemia C3 e C4.

Il paziente 5 ha soddisfatto sia EULAR/ACR-2019, totalizzando uno score di 38 punti, sia SLICC-2012, verificando 10 domini su 17.



Figura 8: Artrite a carico di mani e piedi.

A sinistra, è riportato un esempio di coinvolgimento articolare con rigidità, limitazione funzionale e contratture in flessione delle piccole articolazioni delle mani. A destra, è rappresentato un quadro di tumefazione e deformazione articolare in assenza di segni di flogosi che vede coinvolte le articolazioni di entrambi i piedi.

Paziente 6

Il paziente 6, secondogenito di genitori non consanguinei, è nato alla quarantesima settimana di gestazione con parto eutocico, dopo una gravidanza travagliata e minacciata da aborto. Il bambino alla nascita non presentava segni di sofferenza perinatale e il successivo sviluppo psicomotorio è stato nella norma.

Il primo ricovero è avvenuto all'età di 5 mesi per comparsa di epatosplenomegalia, linfadenomegalia diffusa, anemia, leucocitosi, reticolocitosi, ipergammaglobulinemia, ipocomplementemia sia C3 che C4, lieve aumento delle transaminasi e riscontro di sierologia positiva per EBV (IgG anti VCA positive e IgM anti VCA negative). In tale occasione sono stati eseguiti: ecografia addominale (organomegalia a struttura omogenea), biopsia midollare (riscontro di cellularità discreta, rapporto mielo-eritroide aumentato, presenza delle varie serie midollari nei vari stadi maturativi, 10% di linfociti con rari linfoblasti) e studio del cariotipo (46 XY con presenza di frequenti rotture cromosomiche). Il piccolo bambino è stato dimesso con diagnosi di infezione cronica da EBV.

Il mese successivo è stata effettuata anche una biopsia linfonodale a livello ascellare con riscontro di iperplasia linfoghiandolare di tipo misto; la ricerca dell'EBV con ibridazione in situ su tessuto biotico è risultata negativa. Per la persistenza del quadro clinico, si è deciso di effettuare terapia con IFN per 6 settimane e con Aciclovir per 7 giorni. Al controllo successivo si aveva riscontro di IgM anti-VCA negative con IgG anti-VCA, EBNA e EA positive.

A 16 mesi si è verificato un peggioramento delle condizioni generali con comparsa di febbre, otite media, dispnea, edema palpebrale e a mantellina, anemia (Hb 8.6 g/dl), incremento dell'epatosplenomegalia e della linfadenomegalia generalizzata. All'Rx torace si evidenziava un'area di addensamento parenchimale in sede basale paracardiaca destra e una tenue velatura dei campi polmonari, ombre ilari ingrandite a carattere adenopatico e ipertrofia timica. L'ecografia addominale era invariata. La biopsia del linfonodo ascellare mostrava una linfadenopatia iperplastica reattiva aspecifica. Alla TC torace-addome-pelvi: linfonodi diffusamente aumentati di volume. Si è, quindi, impostata terapia con Betametasona e.v. per sei giorni (0,2 mg/Kg/die).

All'età di 3 anni il piccolo viene ricoverato per un nuovo inquadramento. Durante la degenza si verifica un notevole peggioramento delle condizioni generali con versamento pericardico, ascitico ed articolare, edemi periferici, proteinuria ed ematuria.

Gli esami ematochimici mostravano anemia (Hb 9.1 g/dl), piastrinopenia (PTL 86000), ac. urico 6.3 mg/dl, ANA, anti dsDNA e anti miocardio positivi, C3 e C4 diminuiti e ipergammaglobulinemia (IgG 2575 mg/dl). CMV-PCR nelle urine positiva, IgG anti EBV positive. Venne eseguita un'ecocardiografia che evidenziava un versamento pericardico (trattato con puntura evacuativa di 150 ml e successivo drenaggio per 20 giorni). È stato ripetuto anche l'agoaspirato midollare che è rimasto invariato rispetto ai precedenti. Per l'aggravarsi dell'anemia e della piastrinopenia il bambino è stato sottoposto a trasfusioni di plasma, emazie concentrate, piastrine e fattori della coagulazione. Infine, è stato dimesso con diagnosi di LES e infezione cronica da EBV.

Ha iniziato terapia con Prednisone 40mg/dl, che è stata successivamente ridotta per comparsa di cortisonizzazione ed è stata associata prima all'Idrossiclorochina e poi al Micofenolato mofetile nel tentativo di tenere sotto controllo la sintomatologia recidivante.

All'età di 8 anni a causa dell'intensa proteinuria (4,08 g/die) e ipoproteinemia (5,5g/dl), è stata eseguita un'agobiopsia renale che non ha mostrato significative alterazioni e, in particolare, nemmeno modificazioni della cellularità e della matrice mesangiale o delle membrane basali. Nulla di rilevante anche a livello tubulare ed interstiziale. In considerazione dei reperti in immunofluorescenza e del dato clinico di rilevante proteinuria, i quadri istologici di normalità sono stati ritenuti compatibili con una malattia renale a lesioni minime o con una nefrite lupica classe I. E' stata quindi intrapresa terapia steroidea al dosaggio di 2mg/Kg/die e si è deciso di non avviare terapia immunosoppressiva.

Due anni più tardi il ragazzo è stato nuovamente ricoverato per via di una nuova riaccensione di malattia e durante la degenza è stato riscontrato un severo quadro disprotidemico con marcata ipoalbuminemia e severa proteinuria. Inoltre, è stato evidenziato un addensamento broncopneumonico, trattato con beneficio grazie alla terapia antibiotica, oltre ad una tumefazione dolente a livello delle logge parotidiche associata a linfadenomegalia generalizzata. Il coinvolgimento parotideo, in seguito all'esecuzione di un'ecografia e di una scialografia qualche anno più tardi, è stato inquadrato come parotidite attribuibile a SLE e a scialoadenite cronica. Tenuto conto del coinvolgimento sistemico si è deciso di avviare terapia con steroide a 2mg/kg/die e con Cell Cept (Micofenolato mofetile) con netto miglioramento della sintomatologia clinica: riduzione della linfadenomegalia, della tumefazione delle parotidi, miglioramento del reperto auscultatorio toracico e bioumorale (significativa riduzione della proteinuria).

A 12 anni per riscontro di deficit di crescita staturale, è stata intrapresa terapia sostitutiva con GH e successivamente, per ritardo nello sviluppo puberale, terapia con testosterone.

Persistevano episodi di proteinuria marcata, rash malare, strie rubre, epatosplenomegalia, linfadenopatia, ipertrofia delle ghiandole salivari, tumefazione della ghiandola parotidea destra, ispessimento del grosso interstizio bronchiale con aree limitate di *ground glass* parenchimale, aumento delle IgM e riduzione delle IgG e IgA (queste ultime hanno richiesto infusione di immunoglobuline endovena).

All'età di 17 anni il ragazzo ha iniziato a sviluppare una progressiva anemizzazione con riduzione dei livelli di ferritina: è stato pertanto eseguito lo screening per celiachia (EMA, TTG) e un'EGDS, che permettevano di porre diagnosi di morbo celiaco. Venivano eseguiti in tale occasione anche lo studio delle sottopopolazioni linfocitarie con doppi negativi e la valutazione dell'apoptosi indotta da attivazione dell'antigene Fas. È stata anche posta diagnosi di ipotiroidismo, per cui è stata avviata terapia sostitutiva con Eutirox. Si presentava, quindi, un quadro clinico di SLE associato ad ALPS (Sindrome Linfoproliferativa Autoimmune), che ben spiegava la comparsa di tiroidite e celiachia.

In seguito all'esecuzione di un'EGDS di controllo all'età di 20 anni si sono evidenziate modeste ectasie venose al terzo distale dell'esofago, visibili con manovra di Valsalva; successivamente, all'ecografia addominale è stata dimostrata la presenza di epatomegalia, di una formazione nodulare ipo-isoecogena di diametro 20 mm a livello epatico, dilatazione della vena porta, splenomegalia e reni di dimensioni regolari con ridotta differenziazione cortico-midollare bilateralmente. La RM addome confermava l'organomegalia e la presenza di circoli epatofughi superficiali e profondi, oltre a riscontro di molteplici aree di alterato segnale in sede epatica dovute a verosimile disturbo della vascolarizzazione. La TC total-body sottolineava la presenza di importanti varici esofagee attribuibili ad un quadro di ipertensione portale conseguente ad epatopatia. Il ragazzo ha effettuato legatura endoscopica delle varici e anche una biopsia epatica. Il danno epatico si manifestava anche sul versante clinico e di laboratorio con il calo ponderale, la febbre, l'ittero colestatico, la piastrinopenia, l'ipoproteinemia e l'ipocomplementemia, oltre al riscontro di elevata calprotectina e proteinuria. Il quadro clinico complessivo è stato interpretato come SLE atipico associato a epatopatia complicata da severa ipertensione portale e il paziente aveva appena compiuto 24 anni.

Per un miglior inquadramento diagnostico si è deciso di eseguire la firma interferonica su sangue periferico che ha rivelato una marcata positività dell'Interferon Score.

Il fenotipo clinico era molto complesso, erano presenti tratti suggestivi sia di lupus sia di sindrome linfoproliferativa autoimmune (sierosite, autoanticorpi, linfoproliferazione, ipogammaglobulinemia, sindrome nefrosica, signature dell'IFN positiva). Il ragazzo aveva 26 anni quando è stato deciso di avviare l'analisi genetica con lo studio dell'esoma che ha finalmente dimostrato la presenza di una mutazione patogenetica. Si tratta di una mutazione somatica a carico del gene NRAS (*G13D*), responsabile della sindrome RALD (*RAS-associated Autoimmune Leukoproliferative Disease*). La mutazione in questione rientra fra le cosiddette RASopatie. Oggi il paziente ha 29 anni ed è in lista di attesa per il trapianto di fegato, unica possibilità terapeutica della sindrome epato-polmonare da lui sviluppata nel corso degli anni di malattia.

Ai fini del nostro studio, i sintomi manifestati durante il corso della patologia che hanno avuto un peso nella verifica dei criteri di classificazione sono stati: gli episodi febbrili, la trombocitopenia, l'anemia emolitica, il rash malare, l'effusione pleuro-pericardica e il versamento articolare, la proteinuria, gli anticorpi anticardiolipina, l'ipocomplementemia C3 e C4, la positività autoanticorpale sia ANA che anti-dsDNA.

Il paziente 6 ha soddisfatto sia EULAR/ACR-2019, con uno score complessivo di 39 punti, sia SLICC-2012, rispettando 10 domini su 17.

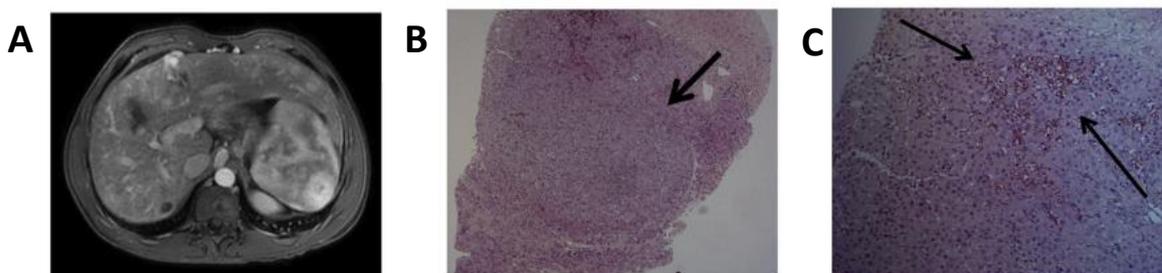


Figura 9 (126): (A) Immagine di scansione TC addominale T2-ponderata che mostra iperplasia nodulare rigenerativa del fegato con segni di ipertensione portale. (B) Ago-biopsia epatica che mostra l'alterazione del parenchima con pattern micronodulare (freccia) e dilatazione della rete vascolare. (C) Particolare di ago-biopsia epatica che mostra sinusoidi dilatati e ricolmi di sangue (freccie).

7. Discussione

Il Lupus Eritematoso Sistemico è una malattia infiammatoria cronica autoimmune del tessuto connettivo che può colpire potenzialmente qualsiasi organo ed apparato e la cui eziopatogenesi è complessa e multifattoriale. Sebbene il preciso meccanismo patogenetico alla sua base non sia ancora oggi definito, sicuramente, la suscettibilità genetica gioca un ruolo causale importante, soprattutto in quelle forme di SLE a carattere familiare (12).

Una forma unica di SLE, conosciuta con il nome di Lupus Monogenico, è caratterizzata da una storia anamnestica familiare positiva, un esordio precoce e grave di malattia, manifestazioni cliniche di principale carattere mucocutaneo e un decorso recidivante e refrattario alle principali terapie convenzionali. I piccoli pazienti affetti da questa rara malattia generalmente presentano difetti genetici sottostanti che interessano diversi componenti del sistema immunitario. Tant'è vero che ad oggi, grazie alle moderne tecniche di sequenziamento genetico (*Next Generation Sequencing*, NGS e *Whole Exome Sequencing*, WES), più di 30 geni sono stati scoperti essere gli agenti causali di questa particolare forma di SLE pediatrico (18).

Sebbene l'interesse nei confronti di questa patologia stia sempre più aumentando nel corso degli anni e la ricerca scientifica stia apportando numerose nuove scoperte, non solo di carattere diagnostico, ma anche e soprattutto nell'ambito terapeutico e farmacologico, il Lupus Monogenico rimane comunque, momentaneamente, ancora un termine puramente descrittivo.

L'obiettivo che ha guidato il nostro studio è stato quello di applicare ad un'ampia coorte di pazienti, provenienti da aree geografiche ed etnie differenti, i criteri di classificazione attualmente validati e utilizzati per le forme più comuni di SLE adulto e pediatrico, al fine di comprendere se fossero adeguatamente sensibili e specifici anche nella classificazione del più raro Lupus Monogenico. Questo progetto ha anche permesso di descrivere e analizzare in modo più approfondito e dettagliato gli aspetti clinici, ematologici e immunologici di questa "giovane" malattia. Il nostro auspicio è, dunque, che la descrizione dei casi da noi selezionati e riportati possa essere d'aiuto nell'identificazione precoce di pazienti con quadri di malattia sospetti e possa indirizzare prontamente il medico specialista ad intraprendere l'indagine genetica per la ricerca di mutazioni responsabili.

Dalla letteratura scientifica attualmente presente, si può dedurre che nessuno dei criteri di classificazione disponibili per SLE è stato fino ad oggi applicato ai piccoli pazienti affetti da Lupus Monogenico. Più recentemente, la performance dei criteri EULAR/ACR-2019 si è dimostrata efficace, raggiungendo un stima di sensibilità significativa, nella classificazione di bambini con cSLE sporadico, indipendentemente dall'etnia. Tuttavia, nei confronti dei vari criteri classificativi, esistono stime incostanti di specificità (127,128).

Questo studio (129) è stato condotto nella più grande coorte multinazionale di pazienti con diagnosi genetica di Lupus Monogenico. Nonostante l'eterogeneità delle presentazioni cliniche e l'evoluzione delle caratteristiche fenotipiche, i criteri EULAR/ACR-2019 si sono dimostrati classificare in modo efficiente ed esaustivo i pazienti con questa patologia, senza essere influenzati dalla diversità delle mutazioni genetiche sottostanti.

I criteri EULAR/ACR-2019 hanno mostrato un'alta sensibilità (95.6% con IC95%: 0.8-0.9) e questo significa che detengono un elevato potenziale di identificazione precoce dei pazienti affetti da Lupus Monogenico. Questo è un risultato di grande valore, in quanto una patologia ad insorgenza così precoce e grave, di natura spesso refrattaria e recidivante, potrebbe essere diagnosticata ed inquadrata con tempistiche più celeri, evitando complicanze sia a breve che a lungo termine, talvolta invalidanti e compromettenti la qualità di vita di bambini così piccoli.

Per quanto riguarda la specificità, quest'ultima non si è dimostrata molto alta (75.0% IC95%: 0.5-0.9), tuttavia, questo risultato è in linea con quanto precedentemente riportato nella casistica su cSLE sporadico.

La performance dei criteri di classificazione EULAR/ACR-2019 nei pazienti con Lupus Monogenico si è dimostrata essere molto buona. Infatti, l'89.8% dei pazienti (44 di 49) hanno soddisfatto il criterio, totalizzando uno score medio di 22.3 ± 8.9 .

Nel presente studio, i criteri SLICC-2012 sono stati scelti come gold standard e come metro comparativo verso cui condurre le indagini statistiche. SLICC-2012 sono stati preferiti a più datati ACR-1997 in quanto hanno dimostrato una maggiore sensibilità in tutte le fasce di età di SLE e, come affermato in precedenza, sono stati anche utilizzati come quadro di riferimento da molti medici (113). Inoltre, SLICC-2012 ha classificato precocemente la maggior parte dei nostri controlli cSLE, diagnosticati anche da reumatologi esperti come Lupus pediatrico sporadico (SLICC-2012 90,9% rispetto ad ACR-1997 61,8%). I pazienti con Lupus Monogenico che hanno soddisfatto SLICC-2012 sono stati il 93.9% (46 di 49).

Nel gruppo sperimentale di pazienti affetti da Lupus Monogenico, la differenza tra la performance di EULAR/ACR-2019 (89.9%) e SLICC-2012 (93.9%) è principalmente legata alla negatività del titolo ANA. Infatti, tra i pazienti che non sono riusciti a soddisfare i criteri EULAR/ACR-2019, 2 pazienti con mutazione in DNase1L3 avrebbero ottenuto un punteggio maggiore di 10 per le loro manifestazioni cliniche, ma non è stato possibile effettuare il conteggio per mancanza del criterio d'inclusione ANA \geq 1:80.

Inoltre, vale la pena far notare che alcuni domini, come quello immunologico, sono stati ottenuti al momento della diagnosi iniziale, proprio per cercare di valutare l'efficienza della classificazione precoce. Tuttavia, questo potrebbe comportare una riduzione della sensibilità e un aumento della specificità di EULAR/ACR-2019, in particolare nei casi di cSLE e Lupus Monogenico, poiché gli autoanticorpi possono aumentare ed essere rilevati più tardivamente nel corso della malattia.

Sono state osservate anche altre differenze nell'adempimento dei domini clinici fra i due set di criteri in esame, in particolare riguardanti le manifestazioni ematologiche e neuropsichiatriche. In SLICC-2012 tre domini su quattro possono essere soddisfatti avendo anche un paziente con sole manifestazioni ematologiche, lo stesso non può accadere in EULAR/ACR-2019 poiché i tre domini, separati nel precedente criterio, sono in quest'ultimo raggruppati in un unico dominio. Inoltre, alcune delle manifestazioni neuropsichiatriche contemplate nello SLICC-2012 non sono state inserite e considerate fra i sottodomini di EULAR/ACR-2019. Questa evoluzione e modifica dei criteri nel corso delle successive stesure si è dimostrata avere un peso anche nel nostro gruppo di studio, poiché la metà dei pazienti che hanno soddisfatto i criteri neuropsichiatrici SLICC-2012 non ha poi ugualmente rispettato quelli dell'EULAR/ACR-2019. Al contrario, i pazienti che hanno soddisfatto EULAR/ACR-2019, ma non SLICC-2012, lo hanno fatto collezionando punteggi di alto valore, nonostante le minori manifestazioni elencate fra i sottodomini.

Per quanto riguarda la sezione immunologica, la differenza significativa fra i due criteri è in gran parte dovuta al maggior numero di domini riservati a questa categoria nello SLICC-2012 rispetto ad EULAR/ACR-2019.

Nel dominio renale, invece, rispetto a tutti gli altri, non c'è stata alcuna differenza, poiché la nefrite lupica di classe III e IV ha raggiunto i punteggi più alti nell'EULAR/ACR-2019 e associata alla positività del titolo ANA è stata sufficiente per classificare i pazienti.

Talvolta, il sistema di punteggio ponderato ha anche classificato erroneamente alcuni pazienti con artrite idiopatica giovanile e dermatomiosite giovanile che presentavano quadri di artrite e coinvolgimento mucocutaneo.

Nella vita reale i dati vengono raccolti ad ogni visita in modo longitudinale, ossia secondo il susseguirsi degli avvenimenti nella storia clinica e anamnestica del paziente, per questo motivo i criteri di classificazione SLICC-2012 e EULAR/ACR-2019 sono cumulativi e i vari domini/sottodomini, per essere verificati, non devono necessariamente manifestarsi contemporaneamente.

Il nostro studio ha sicuramente i suoi limiti, il principale è che nessuno dei criteri di classificazione in questione è mai stato valutato e applicato a bambini con forme monogeniche di Lupus, per cui, per questa classe di pazienti, non esiste attualmente un vero gold standard per la classificazione e la diagnosi. Ci rendiamo conto che l'opinione del medico specialista esperto non sia uno strumento standardizzato, ma al momento rimane il metodo più attendibile e utilizzato nella pratica clinica. Inoltre, i pazienti del gruppo controllo con diagnosi di cSLE non sono stati indagati dal punto di vista genetico, quindi, potrebbe esserci la possibilità che alcuni di questi bambini siano portatori di mutazioni monogeniche o somatiche sconosciute. Sicuramente, per avere un'idea più chiara, sarebbe necessario in futuro adottare un approccio più inclusivo e, ad esempio, testare questi criteri in una coorte di pazienti indagata per tutti gli errori congeniti monogenici conosciuti, scatenanti una disregolazione del sistema immunitario.

In secondo luogo, il gruppo di pazienti in esame è una coorte retrospettiva, per cui ne deriva che alcune variabili immunologiche come gli anticorpi lupus-specifici non sono state ottenute al momento della diagnosi iniziale, soprattutto nei pazienti controllo con una diagnosi di artrite idiopatica giovanile e dermatomiosite giovanile. Infine, sebbene questo progetto sia uno studio multinazionale multicentrico, a cui hanno aderito quattro centri terziari di reumatologia pediatrica dall'Arabia Saudita, dall'Oman e dall'Italia, la maggior parte dei pazienti arruolati sono di etnia araba e l'influenza razziale non è stata esplorata.

Si è tutti concordi sul ritenere che la messa a punto di questi set di criteri classificativi è principalmente orientata alla ricerca clinica e non viene, al momento proposta, con finalità diagnostica. Sicuramente è però indirizzata ad ottenere una maggiore specificità, che di solito va a scapito della sensibilità.

Certamente, la continua revisione di questi criteri negli anni è stata alla base del loro progressivo perfezionamento che è destinato ad essere la base per il loro desiderato e forse prossimo utilizzo nella pratica clinica, nel ruolo sia di guida diagnostica che di classificazione, di tutte le forme di SLE (128). Se questo si realizzasse sarebbe una conquista di grande valore per la definizione di un iter diagnostico-terapeutico più uniforme e lineare, non solo per le forme di Lupus dell'adulto, ma soprattutto per quelle pediatriche e ancor più per il Lupus Monogenico, che fa dell'eterogeneità fenotipica il suo punto di forza nell'elusione anche del più esperto occhio clinico.

Il nostro auspicio è che, nel prossimo futuro, studi che analizzano casistiche più ampie di pazienti affetti da Lupus Monogenico possano aumentare la potenza statistica delle nostre valutazioni, in modo tale da riuscire a formulare indicazioni più precise, omogenee e, soprattutto, basate sull'evidenza, che possano essere concretamente di aiuto nel percorso di cura di questi piccoli pazienti.

8. Conclusioni

Il Lupus Monogenico è un'entità rara, ma sempre più segnalata nella popolazione pediatrica, si presenta con manifestazioni eterogenee e atipiche e ad oggi ancora non dispone di criteri convalidati per una classificazione efficiente. Conoscere le sfumature delle presentazioni cliniche di queste forme monogeniche di SLE, sospettarne la presenza e fare diagnosi precoce, stanno diventando prerogative fondamentali per lo specialista pediatra. Lo scopo ultimo è quello di offrire ai piccoli bambini, affetti da mutazione geniche responsabili della patologia, delle possibilità terapeutiche più specifiche ed efficaci e, nondimeno, una migliore qualità di vita.

Negli ultimi anni, *Next Generation Sequencing* e *Whole Exome Sequencing* hanno assunto un ruolo di rilievo nella definizione diagnostica di questa e di altre malattie che fino a poco tempo fa restavano orfane di un inquadramento preciso. In caso di sospetto diagnostico, queste moderne tecnologie costituiscono sicuramente uno strumento di supporto fondamentale all'attività dello specialista. Tuttavia, nella pratica clinica di tutti i giorni si sente la necessità di avere a disposizione anche soluzioni di più facile impiego, che possano semplificare la valutazione delle molteplici manifestazioni di malattia che si susseguono nella storia anamnestica del paziente affetto.

Proprio con questo fine, il nostro è il primo grande studio atto a valutare le prestazioni dei nuovi criteri di classificazione EULAR/ACR-2019 nei pazienti con diagnosi genetica di Lupus Monogenico. In seguito ad un attento e scrupoloso lavoro di equipe, attraverso l'analisi dei dati collezionati, siamo riusciti a dimostrare che i presenti criteri classificativi sono efficaci e sufficientemente sensibili e specifici anche quando applicati a pazienti con questa rara forma genetica di SLE.

Su questa scia e affinché possano nascere evidenze più solide, è caldamente sollecitata la stesura di ulteriori studi e di nuove collaborazioni tra colleghi di diversi centri, prerogative essenziali per la descrizione di una malattia rara come il Lupus Monogenico.

In conclusione, sulla base dei risultati ottenuti dalla nostra analisi, le ottime prestazioni dei criteri EULAR/ACR-2019 indicano che non sono necessari nuovi criteri classificativi specifici per la classificazione dei pazienti affetti da Lupus Monogenico.

9. Bibliografia

1. Barsalou J, Levy DM, Silverman ED. An update on childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol.* settembre 2013;25(5):616–22.
2. Hedrich CM, Smith EMD, Beresford MW. Juvenile-onset systemic lupus erythematosus (jSLE) – Pathophysiological concepts and treatment options. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* agosto 2017;31(4):488–504.
3. Fortuna G, Brennan MT. Systemic Lupus Erythematosus. *Dent Clin North Am.* ottobre 2013;57(4):631–55.
4. Vachvanichsanong P, Dissaneewate P, McNeil E. Twenty-two years' experience with childhood-onset SLE in a developing country: are outcomes similar to developed countries? *Arch Dis Child.* 1 gennaio 2011;96(1):44–9.
5. Morgan T, Watson L, McCann L, Beresford M. Children and adolescents with SLE: not just little adults. *Lupus.* ottobre 2013;22(12):1309–19.
6. Mina R, Brunner HI. Update on differences between childhood-onset and adult-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(4):218.
7. Brunner HI, Gladman DD, Ibañez D, Urowitz MD, Silverman ED. Difference in disease features between childhood-onset and adult-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* febbraio 2008;58(2):556–62.
8. Massias JS, Smith EMD, Al-Abadi E, Armon K, Bailey K, Ciurtin C, et al. Clinical and laboratory characteristics in juvenile-onset systemic lupus erythematosus across age groups. *Lupus.* aprile 2020;29(5):474–81.
9. Al-Mayouf SM, Al Sonbul A. Influence of gender and age of onset on the outcome in children with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol.* settembre 2008;27(9):1159–62.
10. Tirosh I, Spielman S, Barel O, Ram R, Stauber T, Paret G, et al. Whole exome sequencing in childhood-onset lupus frequently detects single gene etiologies. *Pediatr Rheumatol.* dicembre 2019;17(1):52.
11. Almlöf JC, Nystedt S, Leonard D, Eloranta ML, Grosso G, Sjöwall C, et al. Whole-genome sequencing identifies complex contributions to genetic risk by variants in genes causing monogenic systemic lupus erythematosus. *Hum Genet.* febbraio 2019;138(2):141–50.
12. Al-Mayouf SM, Sunker A, Abdwani R, Arawi SA, Almurshedi F, Alhashmi N, et al. Loss-of-function variant in DNASE1L3 causes a familial form of systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* dicembre 2011;43(12):1186–8.
13. Perry D, Sang A, Yin Y, Zheng YY, Morel L. Murine Models of Systemic Lupus Erythematosus. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:1–19.
14. Santiago-Raber ML, Laporte C, Reininger L, Izui S. Genetic basis of murine lupus. *Autoimmun Rev.* gennaio 2004;3(1):33–9.
15. Deafen D, Escalante A, Weinrib L, Horwitz D, Bachman B, Roy-Burman P, et al. A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* marzo 1992;35(3):311–8.

16. Alperin JM, Ortiz-Fernández L, Sawalha AH. Monogenic Lupus: A Developing Paradigm of Disease. *Front Immunol.* 30 ottobre 2018;9:2496.
17. Hiraki LT, Silverman ED. Genomics of Systemic Lupus Erythematosus. *Rheum Dis Clin N Am.* agosto 2017;43(3):415–34.
18. Demirkaya E, Sahin S, Romano M, Zhou Q, Aksentijevich I. New Horizons in the Genetic Etiology of Systemic Lupus Erythematosus and Lupus-Like Disease: Monogenic Lupus and Beyond. *J Clin Med.* 5 marzo 2020;9(3):712.
19. Omarjee O, Picard C, Frachette C, Moreews M, Rieux-Laucat F, Soulas-Sprauel P, et al. Monogenic lupus: Dissecting heterogeneity. *Autoimmun Rev.* ottobre 2019;18(10):102361.
20. Elkon KB. Review: Cell Death, Nucleic Acids, and Immunity: Inflammation Beyond the Grave. *Arthritis Rheumatol.* giugno 2018;70(6):805–16.
21. Poon IKH, Lucas CD, Rossi AG, Ravichandran KS. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nat Rev Immunol.* marzo 2014;14(3):166–80.
22. Lintner KE, Wu YL, Yang Y, Spencer CH, Hauptmann G, Hebert LA, et al. Early Components of the Complement Classical Activation Pathway in Human Systemic Autoimmune Diseases. *Front Immunol* [Internet]. 15 febbraio 2016 [citato 14 febbraio 2022];7. Disponibile su: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2016.00036/abstract>
23. Leffler J, Bengtsson AA, Blom AM. The complement system in systemic lupus erythematosus: an update. *Ann Rheum Dis.* settembre 2014;73(9):1601–6.
24. Lood C, Gullstrand B, Truedsson L, Olin AI, Alm GV, Rönnblom L, et al. C1q inhibits immune complex-induced interferon- α production in plasmacytoid dendritic cells: A novel link between C1q deficiency and systemic lupus erythematosus pathogenesis. *Arthritis Rheum.* ottobre 2009;60(10):3081–90.
25. Ling GS, Crawford G, Buang N, Bartok I, Tian K, Thielens NM, et al. C1q restrains autoimmunity and viral infection by regulating CD8⁺ T cell metabolism. *Science.* 4 maggio 2018;360(6388):558–63.
26. Sturfelt G, Truedsson L. Complement in the immunopathogenesis of rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol.* agosto 2012;8(8):458–68.
27. Lewis MJ, Botto M. Complement deficiencies in humans and animals: Links to autoimmunity. *Autoimmunity.* gennaio 2006;39(5):367–78.
28. Roers A, Hiller B, Hornung V. Recognition of Endogenous Nucleic Acids by the Innate Immune System. *Immunity.* aprile 2016;44(4):739–54.
29. Carbonella A, Mancano G, Gremese E, Alkuraya FS, Patel N, Gurrieri F, et al. An autosomal recessive *DNASE1L3*-related autoimmune disease with unusual clinical presentation mimicking systemic lupus erythematosus. *Lupus.* giugno 2017;26(7):768–72.
30. Özçakar ZB, Foster J, Diaz-Horta O, Kasapcopur O, Fan YS, Yalçinkaya F, et al. *DNASE1L3* Mutations in Hypocomplementemic Urticarial Vasculitis Syndrome: *DNASE1L3* Mutations in HUVS. *Arthritis Rheum.* agosto 2013;65(8):2183–9.

31. Bodaño A, Amarelo J, González A, Gómez-Reino JJ, Conde C. Novel *DNASE I* mutations related to systemic lupus erythematosus: Concise Communications. *Arthritis Rheum.* dicembre 2004;50(12):4070–1.
32. Yasutomo K, Horiuchi T, Kagami S, Tsukamoto H, Hashimura C, Urushihara M, et al. Mutation of *DNASE1* in people with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* agosto 2001;28(4):313–4.
33. Campbell AM, Kashgarian M, Shlomchik MJ. NADPH Oxidase Inhibits the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *Sci Transl Med [Internet].* 24 ottobre 2012 [citato 15 febbraio 2022];4(157). Disponibile su: <https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.3004801>
34. Battersby AC, Braggins H, Pearce MS, Cale CM, Burns SO, Hackett S, et al. Inflammatory and autoimmune manifestations in X-linked carriers of chronic granulomatous disease in the United Kingdom. *J Allergy Clin Immunol.* agosto 2017;140(2):628-630.e6.
35. Sanford AN, Suriano AR, Herche D, Dietzmann K, Sullivan KE. Abnormal apoptosis in chronic granulomatous disease and autoantibody production characteristic of lupus. *Rheumatology.* 1 febbraio 2006;45(2):178–81.
36. Cale CM, Morton L, Goldblatt D. Cutaneous and other lupus-like symptoms in carriers of X-linked chronic granulomatous disease: incidence and autoimmune serology. *Clin Exp Immunol.* 7 febbraio 2007;148(1):79–84.
37. Crow YJ. Type I interferonopathies: a novel set of inborn errors of immunity: Type I interferonopathies. *Ann N Y Acad Sci.* novembre 2011;1238(1):91–8.
38. Hagberg N, Rönnblom L. Systemic Lupus Erythematosus - A Disease with A Dysregulated Type I Interferon System. *Scand J Immunol.* settembre 2015;82(3):199–207.
39. Rodero MP, Decalf J, Bondet V, Hunt D, Rice GI, Werneke S, et al. Detection of interferon alpha protein reveals differential levels and cellular sources in disease. *J Exp Med.* 1 maggio 2017;214(5):1547–55.
40. Rice GI, Forte GMA, Szykiewicz M, Chase DS, Aeby A, Abdel-Hamid MS, et al. Assessment of interferon-related biomarkers in Aicardi-Goutières syndrome associated with mutations in *TREX1*, *RNASEH2A*, *RNASEH2B*, *RNASEH2C*, *SAMHD1*, and *ADAR*: a case-control study. *Lancet Neurol.* dicembre 2013;12(12):1159–69.
41. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ, et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci.* 4 marzo 2003;100(5):2610–5.
42. Pescarmona R, Belot A, Villard M, Besson L, Lopez J, Mosnier I, et al. Comparison of RT-qPCR and Nanostring in the measurement of blood interferon response for the diagnosis of type I interferonopathies. *Cytokine.* gennaio 2019;113:446–52.
43. Kim H, de Jesus AA, Brooks SR, Liu Y, Huang Y, VanTries R, et al. Development of a Validated Interferon Score Using NanoString Technology. *J Interferon Cytokine Res.* aprile 2018;38(4):171–85.
44. Picard C, Belot A. Does type-I interferon drive systemic autoimmunity? *Autoimmun Rev.* settembre 2017;16(9):897–902.

45. Rönnblom L. The importance of the type I interferon system in autoimmunity. giugno 2016;4.
46. Cavlar T, Ablasser A, Hornung V. Induction of type I IFNs by intracellular DNA-sensing pathways. *Immunol Cell Biol.* maggio 2012;90(5):474–82.
47. Wu J, Sun L, Chen X, Du F, Shi H, Chen C, et al. Cyclic GMP-AMP Is an Endogenous Second Messenger in Innate Immune Signaling by Cytosolic DNA. *Science.* 15 febbraio 2013;339(6121):826–30.
48. Dobbs N, Burnaevskiy N, Chen D, Gonugunta VK, Alto NM, Yan N. STING Activation by Translocation from the ER Is Associated with Infection and Autoinflammatory Disease. *Cell Host Microbe.* agosto 2015;18(2):157–68.
49. Schafer SL, Lin R, Moore PA, Hiscott J, Pitha PM. Regulation of Type I Interferon Gene Expression by Interferon Regulatory Factor-3. *J Biol Chem.* gennaio 1998;273(5):2714–20.
50. Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, Mizutani T, et al. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature.* aprile 2005;434(7034):772–7.
51. Schreiber G. The molecular basis for differential type I interferon signaling. *J Biol Chem.* marzo 2017;292(18):7285–94.
52. Jaks E, Gavutis M, Uzé G, Martal J, Piehler J. Differential Receptor Subunit Affinities of Type I Interferons Govern Differential Signal Activation. *J Mol Biol.* febbraio 2007;366(2):525–39.
53. Sancho-Shimizu V, Perez de Diego R, Jouanguy E, Zhang SY, Casanova JL. Inborn errors of anti-viral interferon immunity in humans. *Curr Opin Virol.* dicembre 2011;1(6):487–96.
54. Ciancanelli MJ, Huang SXL, Luthra P, Garner H, Itan Y, Volpi S, et al. Life-threatening influenza and impaired interferon amplification in human IRF7 deficiency. *Science.* 24 aprile 2015;348(6233):448–53.
55. Crow YJ, Hayward BE, Parmar R, Robins P, Leitch A, Ali M, et al. Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 cause Aicardi-Goutières syndrome at the AGS1 locus. *Nat Genet.* agosto 2006;38(8):917–20.
56. Rice GI, Bond J, Asipu A, Brunette RL, Manfield IW, Carr IM, et al. Mutations involved in Aicardi-Goutières syndrome implicate SAMHD1 as regulator of the innate immune response. *Nat Genet.* luglio 2009;41(7):829–32.
57. Rice GI, Kasher PR, Forte GMA, Mannion NM, Greenwood SM, Szykiewicz M, et al. Mutations in ADAR1 cause Aicardi-Goutières syndrome associated with a type I interferon signature. *Nat Genet.* novembre 2012;44(11):1243–8.
58. Rice GI, del Toro Duany Y, Jenkinson EM, Forte GMA, Anderson BH, Ariaudo G, et al. Gain-of-function mutations in IFIH1 cause a spectrum of human disease phenotypes associated with upregulated type I interferon signaling. *Nat Genet.* maggio 2014;46(5):503–9.
59. Liu Y, Jesus AA, Marrero B, Yang D, Ramsey SE, Montealegre Sanchez GA, et al. Activated STING in a Vascular and Pulmonary Syndrome. *N Engl J Med.* 7 agosto 2014;371(6):507–18.

60. Gruber C, Martin-Fernandez M, Ailal F, Qiu X, Taft J, Altman J, et al. Homozygous STAT2 gain-of-function mutation by loss of USP18 activity in a patient with type I interferonopathy. *J Exp Med.* 4 maggio 2020;217(5):e20192319.
61. Zhang X. Human intracellular ISG15 prevents interferon alfa-beta over-amplification and auto-inflammation. 1 gennaio 2015;
62. Rodero MP, Crow YJ. Type I interferon-mediated monogenic autoinflammation: The type I interferonopathies, a conceptual overview. *J Exp Med.* 14 novembre 2016;213(12):2527–38.
63. Rice GI, Rodero MP, Crow YJ. Human Disease Phenotypes Associated With Mutations in TREX1. *J Clin Immunol.* aprile 2015;35(3):235–43.
64. Yoshida H, Okabe Y, Kawane K, Fukuyama H, Nagata S. Lethal anemia caused by interferon- β produced in mouse embryos carrying undigested DNA. *Nat Immunol.* gennaio 2005;6(1):49–56.
65. Rodero MP, Tesser A, Bartok E, Rice GI, Della Mina E, Depp M, et al. Type I interferon-mediated autoinflammation due to DNase II deficiency. *Nat Commun.* dicembre 2017;8(1):2176.
66. Kretschmer S, Wolf C, König N, Staroske W, Guck J, Häusler M, et al. SAMHD1 prevents autoimmunity by maintaining genome stability. *Ann Rheum Dis.* marzo 2015;74(3):e17–e17.
67. Ravenscroft JC, Suri M, Rice GI, Szykiewicz M, Crow YJ. Autosomal dominant inheritance of a heterozygous mutation in SAMHD1 causing familial chilblain lupus. *Am J Med Genet A.* gennaio 2011;155(1):235–7.
68. Dale RC, Gornall H, Singh-Grewal D, Alcausin M, Rice GI, Crow YJ. Familial Aicardi-Goutières syndrome due to *SAMHD1* mutations is associated with chronic arthropathy and contractures. *Am J Med Genet A.* aprile 2010;152A(4):938–42.
69. Mackenzie KJ, Carroll P, Lettice L, Tarnauskaitė Ž, Reddy K, Dix F, et al. Ribonuclease H2 mutations induce a CGAS / STING -dependent innate immune response. *EMBO J.* 15 aprile 2016;35(8):831–44.
70. Günther C, Kind B, Reijns MAM, Berndt N, Martinez-Bueno M, Wolf C, et al. Defective removal of ribonucleotides from DNA promotes systemic autoimmunity. *J Clin Invest.* 2 gennaio 2015;125(1):413–24.
71. Liddicoat BJ, Piskol R, Chalk AM, Ramaswami G, Higuchi M, Hartner JC, et al. RNA editing by ADAR1 prevents MDA5 sensing of endogenous dsRNA as nonself. *Science.* 4 settembre 2015;349(6252):1115–20.
72. Crow YJ, Chase DS, Lowenstein Schmidt J, Szykiewicz M, Forte GMA, Gornall HL, et al. Characterization of human disease phenotypes associated with mutations in *TREX1* , *RNASEH2A* , *RNASEH2B* , *RNASEH2C* , *SAMHD1* , *ADAR* , and *IFIH1* . *Am J Med Genet A.* febbraio 2015;167(2):296–312.
73. Al-Saif F, Alhumidi A, Alhallaf R. Dyschromatosis symmetrica hereditaria with cutaneous lupus erythematosus and hyperthyroidism. *Int Med Case Rep J.* maggio 2017;Volume 10:149–52.
74. de Carvalho LM, Ngoumou G, Park JW, Ehmke N, Deigendesch N, Kitabayashi N, et al. Musculoskeletal Disease in MDA5-Related Type I Interferonopathy: A Mendelian Mimic of

Jaccoud's Arthropathy: MUSCULOSKELETAL DISEASE IN MDA-5-RELATED TYPE I INTERFERONOPATHY. *Arthritis Rheumatol.* ottobre 2017;69(10):2081–91.

75. Bursztejn AC, Briggs TA, del Toro Duany Y, Anderson BH, O'Sullivan J, Williams SG, et al. Unusual cutaneous features associated with a heterozygous gain-of-function mutation in *IFIH1* : overlap between Aicardi-Goutières and Singleton-Merten syndromes. *Br J Dermatol.* dicembre 2015;173(6):1505–13.
76. Robinson Talin. Autoimmune disease risk variant of *IFIH1* is associated with increased sensitivity to IFN alfa and serologic autoimmunity in lupus patients. 24 giugno 2011;
77. Van Eyck L, De Somer L, Pombal D, Bornschein S, Frans G, Humblet-Baron S, et al. Brief Report: *IFIH1* Mutation Causes Systemic Lupus Erythematosus With Selective IgA Deficiency: *IFIH1* MUTATION IN SLE WITH SELECTIVE IgA DEFICIENCY. *Arthritis Rheumatol.* giugno 2015;67(6):1592–7.
78. Liu F, Gu J. Retinoic acid inducible gene-I, more than a virus sensor. *Protein Cell.* maggio 2011;2(5):351–7.
79. Jang MA, Kim EK, Now H, Nguyen NTH, Kim WJ, Yoo JY, et al. Mutations in *DDX58*, which Encodes RIG-I, Cause Atypical Singleton-Merten Syndrome. *Am J Hum Genet.* febbraio 2015;96(2):266–74.
80. Burdette DL, Monroe KM, Sotelo-Troha K, Iwig JS, Eckert B, Hyodo M, et al. STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature.* ottobre 2011;478(7370):515–8.
81. Jeremiah N, Neven B, Gentili M, Callebaut I, Maschalidi S, Stolzenberg MC, et al. Inherited STING-activating mutation underlies a familial inflammatory syndrome with lupus-like manifestations. *J Clin Invest.* 1 dicembre 2014;124(12):5516–20.
82. Klarquist J, Hennies CM, Lehn MA, Reboulet RA, Feau S, Janssen EM. STING-Mediated DNA Sensing Promotes Antitumor and Autoimmune Responses to Dying Cells. *J Immunol.* 15 dicembre 2014;193(12):6124–34.
83. An J, Durcan L, Karr RM, Briggs TA, Rice GI, Teal TH, et al. Expression of Cyclic GMP-AMP Synthase in Patients With Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* aprile 2017;69(4):800–7.
84. Meuwissen MEC, Schot R, Buta S, Oudesluijs G, Tinschert S, Speer SD, et al. Human *USP18* deficiency underlies type 1 interferonopathy leading to severe pseudo-TORCH syndrome. *J Exp Med.* 27 giugno 2016;213(7):1163–74.
85. Yuan Y, Ma H, Ye Z, Jing W, Jiang Z. Interferon-stimulated gene 15 expression in systemic lupus erythematosus: Diagnostic value and association with lymphocytopenia. *Z Für Rheumatol.* aprile 2018;77(3):256–62.
86. Lu D, Song J, Sun Y, Qi F, Liu L, Jin Y, et al. Mutations of deubiquitinase *OTUD1* are associated with autoimmune disorders. *J Autoimmun.* novembre 2018;94:156–65.
87. An J, Briggs TA, Dumax-Vorzet A, Alarcón-Riquelme ME, Belot A, Beresford M, et al. Tartrate-Resistant Acid Phosphatase Deficiency in the Predisposition to Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* gennaio 2017;69(1):131–42.
88. Bilginer Y, Düzova A, Topaloğlu R, Batu ED, Boduroğlu K, Güçer Ş, et al. Three cases of spondyloenchondrodysplasia (SPENCD) with systemic lupus erythematosus: a case series and review of the literature. *Lupus.* giugno 2016;25(7):760–5.

89. Peng SL. Altered T and B lymphocyte signaling pathways in lupus. *Autoimmun Rev.* gennaio 2009;8(3):179–83.
90. Salzer Elisabeth. Protein Kinase C delta: a Gatekeeper of Immune Homeostasis. 19 agosto 2016;
91. Miyamoto A, Nakayama K, Imaki H, Hirose S, Jiang Y, Abe M, et al. Increased proliferation of B cells and auto-immunity in mice lacking protein kinase Cd. 2002;416:5.
92. Belot. Protein Kinase C delta Deficiency causes mendelian systemic lupus erythematosus with B cell-defective apoptodidi and hyperproliferation. 2013;
93. Kuehn HS. Loss-of-function of the protein kinase C delta causes a B-cell lymphoproliferative syndrome in humans. 2013;
94. Kiykim Ayaca. Potentially Beneficial Effect of Hydroxychloroquine in a Patient with a Novel Mutation in Protein Kinase C delta Deficiency. luglio 2015;
95. Nanthapaisal S, Omoyinmi E, Murphy C, Standing A, Eisenhut M, Eleftheriou D, et al. Early-Onset Juvenile SLE Associated With a Novel Mutation in Protein Kinase C δ . *Pediatrics.* 1 gennaio 2017;139(1):e20160781.
96. Salzer Elisabeth. B cell deficiency and severe autoimmunity caused by deficiency of protein kinase C delta. febbraio 2013;
97. Marín-Rosales M, Cruz A, Salazar-Camarena DC, Santillán-López E, Espinoza-García N, Muñoz-Valle JF, et al. High BAFF expression associated with active disease in systemic lupus erythematosus and relationship with rs9514828C>T polymorphism in TNFSF13B gene. *Clin Exp Med.* maggio 2019;19(2):183–90.
98. Walter JE, Lo MS, Kis-Toth K, Tirosh I, Frugoni F, Lee YN, et al. Impaired receptor editing and heterozygous RAG2 mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and erosive arthritis. *J Allergy Clin Immunol.* gennaio 2015;135(1):272–3.
99. Chen K, Wu W, Mathew D, Zhang Y, Browne SK, Rosen LB, et al. Autoimmunity due to RAG deficiency and estimated disease incidence in RAG1/2 mutations. *J Allergy Clin Immunol.* marzo 2014;133(3):880-882.e10.
100. Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, Roberts IAG, Debatin KM, Fischer A, et al. Mutations in Fas Associated with Human Lymphoproliferative Syndrome and Autoimmunity. *Science.* 2 giugno 1995;268(5215):1347–9.
101. Magerus-Chatinet A, Stolzenberg MC, Lanzarotti N, Neven B, Daussy C, Picard C, et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by a homozygous null FAS ligand (FASLG) mutation. *J Allergy Clin Immunol.* febbraio 2013;131(2):486–90.
102. Wu J, Wilson J, He J, Xiang L, Schur PH, Mountz JD. Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease. *J Clin Invest.* 1 settembre 1996;98(5):1107–13.
103. Bader-Meunier B, Cavé H, Jeremiah N, Magerus A, Lanzarotti N, Rieux-Laucat F, et al. Are RASopathies new monogenic predisposing conditions to the development of systemic lupus erythematosus? Case report and systematic review of the literature. *Semin Arthritis Rheum.* ottobre 2013;43(2):217–9.

104. Leventopoulos. Noonan syndrome and systemic lupus erythematosus in a patient with a novel KRAS mutation. 2010;
105. Hanaya A, Miyamae T, Kishi T, Sahara M, Tani Y, Yamanaka H, et al. Systemic lupus erythematosus associated with RASopathy. *Mod Rheumatol Case Rep.* 3 luglio 2017;1(2):94–8.
106. Hoshino A, Okada S, Yoshida K, Nishida N, Okuno Y, Ueno H, et al. Abnormal hematopoiesis and autoimmunity in human subjects with germline IKZF1 mutations. *J Allergy Clin Immunol.* luglio 2017;140(1):223–31.
107. Zhang YM, Zhou XJ, Cheng FJ, Qi YY, Hou P, Zhao MH, et al. Association of the *IKZF1* 5' UTR variant rs1456896 with lupus nephritis in a northern Han Chinese population. *Scand J Rheumatol.* 4 maggio 2017;46(3):210–4.
108. Aeschlimann FA, Batu ED, Canna SW, Go E, Gül A, Hoffmann P, et al. A20 haploinsufficiency (HA20): clinical phenotypes and disease course of patients with a newly recognised NF-κB-mediated autoinflammatory disease. *Ann Rheum Dis.* maggio 2018;77(5):728–35.
109. Kadowaki T, Ohnishi H, Kawamoto N, Hori T, Nishimura K, Kobayashi C, et al. Haploinsufficiency of A20 causes autoinflammatory and autoimmune disorders. *J Allergy Clin Immunol.* aprile 2018;141(4):1485-1488.e11.
110. Skrabl-Baumgartner A, Plecko B, Schmidt WM, König N, Hershfield M, Gruber-Sedlmayr U, et al. Autoimmune phenotype with type I interferon signature in two brothers with ADA2 deficiency carrying a novel CECR1 mutation. *Pediatr Rheumatol.* dicembre 2017;15(1):67.
111. Brown GJ, Cañete PF, Wang H, Medhavy A, Bones J, Roco JA, et al. TLR7 gain-of-function genetic variation causes human lupus. *Nature.* 12 maggio 2022;605(7909):349–56.
112. Dahlström Ö, Sjöwall C. The diagnostic accuracies of the 2012 SLICC criteria and the proposed EULAR/ACR criteria for systemic lupus erythematosus classification are comparable. *Lupus.* maggio 2019;28(6):778–82.
113. Rodrigues Fonseca A, Felix Rodrigues MC, Sztajn bok FR, Gerardin Poirot Land M, Knupp Feitosa de Oliveira S. Comparison among ACR1997, SLICC and the new EULAR/ACR classification criteria in childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Adv Rheumatol.* dicembre 2019;59(1):20.
114. Aringer M, Costenbader K, Daikh D, Brinks R, Mosca M, Ramsey-Goldman R, et al. 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* settembre 2019;71(9):1400–12.
115. Henrickson M, Wang H. Tocilizumab reverses cerebral vasculopathy in a patient with homozygous SAMHD1 mutation. *Clin Rheumatol.* giugno 2017;36(6):1445–51.
116. Hayashi M, Kikuchi T, Takada T. Mycophenolate mofetil for the patients with interstitial lung diseases in amyopathic dermatomyositis with anti-MDA-5 antibodies. *Clin Rheumatol.* gennaio 2017;36(1):239–40.
117. Spetie DANN, Tang Y, Rovin BH, Nadasdy T, Nadasdy G, Pesavento TE, et al. Mycophenolate therapy of SLE membranous nephropathy. *Kidney Int.* dicembre 2004;66(6):2411–5.

118. Piscianz E. Reappraisal of Antimalarials in Interferonopathies: New Perspectives for Old Drugs. 2018;
119. Sanchez GAM, Reinhardt A, Ramsey S, Wittkowski H, Hashkes PJ, Berkun Y, et al. JAK1/2 inhibition with baricitinib in the treatment of autoinflammatory interferonopathies. *J Clin Invest.* 2 luglio 2018;128(7):3041–52.
120. Frémond ML. EFFICACY OF THE JANUS KINASE 1/2 INHIBITOR RUXOLITINIB IN THE TREATMENT OF VASCULOPATHY ASSOCIATED WITH TMEM173-ACTIVATING MUTATIONS IN THREE CHILDREN [Internet]. 2016 set [citato 4 marzo 2022]. Disponibile su: <https://www.morressier.com/article/57bc1755d462b80290b4d6b9>
121. Furie R. Anifrolumab, an anti-interferon-alfa receptor monoclonal antibody in moderate-to-severe systemic lupus erythematosus: ANIFROLUMAB IN MODERATE-TO-SEVERE SLE. 2017;
122. Rice GI, Meyzer C, Bouazza N, Hully M, Boddaert N, Semeraro M, et al. Reverse-Transcriptase Inhibitors in the Aicardi–Goutières Syndrome. *N Engl J Med.* 6 dicembre 2018;379(23):2275–7.
123. Lei L. Successful use of Ofatumumab in two cases of early-onset juvenile SLE with thrombocytopenia caused by a mutation in protein kinase C delta. 2018;
124. Arkwright PD, Riley P, Hughes SM, Alachkar H, Wynn RF. Successful cure of C1q deficiency in human subjects treated with hematopoietic stem cell transplantation. *J Allergy Clin Immunol.* gennaio 2014;133(1):265–7.
125. Gordon C, Amissah-Arthur MB, Gayed M, Brown S, Bruce IN, D’Cruz D, et al. The British Society for Rheumatology guideline for the management of systemic lupus erythematosus in adults. *Rheumatology.* 1 gennaio 2018;57(1):e1–45.
126. Papa R, Rusmini M, Schena F, Traggiari E, Coccia MC, Caorsi R, et al. Type I interferon activation in RAS-associated autoimmune leukoproliferative disease (RALD). *Clin Immunol.* ottobre 2021;231:108837.
127. Batu ED, Akca UK, Kısarslan AP, Sağ E, Demir F, Demir S, et al. The Performances of the ACR 1997, SLICC 2012, and EULAR/ACR 2019 Classification Criteria in Pediatric Systemic Lupus Erythematosus. *J Rheumatol.* giugno 2021;48(6):907–14.
128. Smith EMD, Rasul S, Ciurtin C, Al-Abadi E, Armon K, Bailey K, et al. Limited sensitivity and specificity of the ACR/EULAR-2019 classification criteria for SLE in JSLE?—observations from the UK JSLE Cohort Study. *Rheumatology.* 3 novembre 2021;60(11):5271–81.
129. Al-Mayouf SM, Akbar L, Abdwani R, Ginesi G, Volpi S, Gattorno M, et al. Performance of the EULAR/ACR 2019 classification criteria for systemic lupus erythematosus in monogenic lupus. *Clin Rheumatol* [Internet]. 19 maggio 2022 [citato 4 giugno 2022]; Disponibile su: <https://link.springer.com/10.1007/s10067-022-06209-9>