

Desempenho diagnóstico e associações clínicas dos anticorpos contra componentes da cromatina no lúpus eritematoso sistêmico juvenil

Silene Peres Keusseyan¹, Neusa Pereira da Silva², Maria Odete Esteves Hilário³, Eunice Mitiko Okuda⁴, Maria Teresa S. L. R. Ascenção Terreri⁵, Luis Eduardo Coelho Andrade⁶

RESUMO

Objetivos: Determinar a frequência de anticorpos contra componentes da cromatina no lúpus eritematoso sistêmico juvenil (LESJ) e correlacionar a presença desses autoanticorpos com manifestações clínicas e atividade da doença. **Métodos:** Os anticorpos anticromatina (anti-CHR), antinucleossomo (anti-NCS) e anti-dsDNA foram medidos em 175 indivíduos, incluindo 37 pacientes com LESJ ativo e 41 com doença inativa, 47 com doenças autoimunes não lúpicas, e 50 crianças saudáveis. Um teste ELISA *in house* foi desenvolvido com nucleossomos purificados a partir de timo de bezerro para determinar os anticorpos IgG e IgG3 anti-NCS. Anti-CHR e anti-dsDNA foram detectados por kits comerciais de ELISA (INOVA). **Resultados:** Anticorpos anti-NCS e anti-CHR exibiram não só uma alta especificidade para LESJ, mas também uma frequência semelhante em LESJ ativo e inativo. Os níveis séricos de anti-CHR e IgG/IgG3 anti-NCS não diferiram entre LESJ ativo e inativo. Houve correlação entre o SLEDAI e os anticorpos anti-dsDNA, mas não com os anticorpos contra outros componentes da cromatina. Houve associação de anticorpos anti-dsDNA, anti-CHR e IgG/IgG3 anti-NCS com proteinúria e baixos níveis séricos de C4. Foram observados anticorpos anti-NCS em 14% dos pacientes com LESJ na ausência de anticorpos anti-dsDNA. **Conclusões:** Nossos dados indicam que os anticorpos anti-NCS e anti-CHR são marcadores diagnósticos relevantes para LESJ e parecem estar correlacionados com a atividade da nefrite lúpica no LESJ. O anticorpo IgG3 anti-NCS não parece ser mais relevante como marcador de atividade da doença ou nefrite ativa no LESJ em comparação ao anticorpo IgG anti-NCS.

Palavras-chave: nucleossomos, anticorpos antinucleares, lúpus eritematoso sistêmico, nefrite lúpica, cromatina.

© 2012 Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

INTRODUÇÃO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune de múltiplos órgãos, caracterizada por uma ampla variedade de manifestações clínicas. A nefrite lúpica apresenta considerável morbidade e representa importante ameaça à qualidade de vida e sobrevivência do paciente a longo prazo. O envolvimento renal foi relatado em 40%–80% dos pacientes com LES juvenil (LESJ, início da doença antes dos 16 anos de idade), e essa frequência

elevada contribui para a gravidade do LESJ.¹ O LES caracteriza-se pela presença de anticorpos antinucleares (ANA).² Mais de 100 autoanticorpos diferentes foram identificados no soro de pacientes com LES,³ e alguns desses autoanticorpos são clinicamente úteis como marcadores diagnósticos e como parâmetros complementares para a monitoração da atividade da doença.⁴ Entre os autoanticorpos relacionados ao LES e úteis do ponto de vista clínico, os anticorpos anti-DNA nativo, anti-Sm e antiproteína P ribossômica são considerados marcadores

Recebido em 28/09/2011. Aprovado, após revisão, em 27/06/2012. Os autores declaram a inexistência de conflito de interesse. Suporte Financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP. Comitê de Ética: 1149/04. Universidade Federal de São Paulo – Unifesp.

1. Mestre em Ciências da Saúde, Universidade Federal de São Paulo – Unifesp

2. Doutora em Pediatria e Ciências Aplicadas à Pediatria, Unifesp; Professora-Associada da Disciplina de Reumatologia, Unifesp

3. Professora-Associada do Setor de Reumatologia Pediátrica da Disciplina de Alergia, Imunologia e Reumatologia, Unifesp

4. Doutora em Medicina, Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo – SCMSp

5. Doutora em Pediatria e Ciências Aplicadas à Pediatria, Unifesp; Professora-Adjunta da Disciplina de Alergia, Imunologia Clínica e Reumatologia do Departamento de Pediatria, Unifesp

6. Professor-Adjunto da Disciplina de Reumatologia, Unifesp

Correspondência para: Luis Eduardo Coelho Andrade. Rua Botucatu, 740. CEP: 04023-900. São Paulo, SP, Brasil. E-mail: luis.andrade@unifesp.br

diagnósticos específicos, mas sua baixa sensibilidade limita o desempenho diagnóstico. Esse cenário apoiou a busca por biomarcadores novos e mais eficientes para o LES.⁵

A partícula central do nucleossomo é a unidade básica da cromatina, composta por ~146 pares de bases de DNA ao redor de um núcleo proteico, um octâmero que compreende duas moléculas de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4. As partículas centrais do nucleossomo são unidas por um DNA ligante, que é associado à histona H1 localizada fora das partículas centrais do nucleossomo.⁶ Durante a apoptose celular, os nucleossomos são liberados no meio intracelular por meio da clivagem da cromatina por endonucleases. Em condições fisiológicas, os fagócitos promovem a remoção das células apoptóticas, impedindo a liberação de constituintes celulares para o meio extracelular.⁷ Nos últimos 15 anos, várias evidências sugeriram que o nucleossomo pode ser o maior domínio antigênico na fisiopatologia do LES, e que os anticorpos contra as partículas centrais do nucleossomo (anti-NCS/CHR) podem estar associados com dano aos órgãos.^{8–10} Além disso, existem provas isoladas de que anticorpos anti-NCS do isótipo IgG3 podem ser um marcador biológico seletivo de LES ativo e, em particular, na nefrite lúpica.¹¹ Embora vários estudos tenham avaliado o desempenho diagnóstico de anticorpos anti-NCS ou anti-CHR em pacientes adultos com LES, existem poucos estudos sobre esses autoanticorpos no LESJ.^{12–14}

O objetivo do presente estudo foi investigar o desempenho diagnóstico de anticorpos contra o sistema antigênico da cromatina em casos de LESJ, bem como suas associações com o Índice de Atividade do Lúpus Eritematoso Sistêmico (SLEDAI) e com as manifestações clínicas individuais da doença, com ênfase sobre a nefrite lúpica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Pacientes e controles

Em um período de dois anos, 125 pacientes de 5–18 anos de idade foram sequencialmente recrutados do ambulatório clínico do Departamento de Pediatria da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp) e no Hospital Universitário da Santa Casa de Misericórdia, em São Paulo, Brasil. A distribuição da doença entre os pacientes era a seguinte: 37 crianças com LESJ em atividade; 41 crianças com LESJ inativo; 47 apresentavam doenças autoimunes não lúpicas (DA), incluindo esclerose sistêmica (ES, n = 4), artrite idiopática juvenil (AIJ, n = 28), dermatomiosite (DM, n = 7) e hepatite autoimune crônica (n = 8). Os quadros de LES, AIJ, ES e DM foram diagnosticados de acordo com os critérios do *American College of Rheumatology* e do *International Autoimmune Hepatitis Group*, respectivamente.^{15–19} Informações

clínicas e laboratoriais (envolvimento renal, hematológico e cutâneo, além de artrite, febre, alopecia, úlceras de mucosa, cefaleia crônica, manifestações neurológicas, vasculite e serosite) foram obtidas de cada paciente com LESJ para determinar o escore de atividade da doença com o uso do SLEDAI.²⁰ As formas inativas e ativas do LESJ foram arbitrariamente definidas como SLEDAI ≤ 2 e ≥ 6 , respectivamente.²¹ Os pacientes com escores 3, 4 e 5 no SLEDAI foram excluídos do estudo. Os soros de 50 crianças e adolescentes saudáveis de idade e gênero compatíveis foram utilizados como controles. Esses indivíduos eram filhos e parentes de pesquisadores da Unifesp, bem como crianças encaminhadas para realização de coagulograma preparatório para pequenos procedimentos cirúrgicos no Hospital São Paulo, sem relato de processos infecciosos ou outras enfermidades. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Institucional (n° 1149/04).

Após a assinatura do termo de consentimento pelos pais ou responsáveis legais, foi coletado de cada participante 10 mL de sangue para exames laboratoriais. As amostras foram armazenadas a -20°C até sua utilização. No momento da coleta do soro, a maioria dos pacientes com LESJ estava sob tratamento com medicamentos imunossupressores. Foram utilizados os seguintes agentes terapêuticos: ciclofosfamida intravenosa em 2,5%, terapia pulsada com metilprednisolona em 7,7%, prednisona oral acima de 0,5 mg/kg/dia em 65,4%, azatioprina em 33,3%, metotrexato em 6,4% e hidroxiquina em 57,7% dos pacientes com LESJ.

Análise sorológica

Os ANA foram detectados por imunofluorescência indireta (IFI) com lâminas de células HEP-2 preparadas *in house*, de acordo com o procedimento padrão;²² anticorpos anti-dsDNA foram determinados por ensaio imunoenzimático (INOVA Diagnostics, San Diego, CA), de acordo com as instruções do fabricante, e por IFI com lâminas de substrato de *Crithidia luciliae* preparadas *in house* (ensaio CLIF), de acordo com o procedimento padrão.²³ Anticorpos contra antígenos nucleares extraíveis (ENA) foram detectados por imunodifusão dupla em extrato de baço de bezerro, de acordo com a técnica de Ouchterlony.²⁴ Anticorpos anticardiolipina foram determinados por ensaio imunoenzimático *in house*, conforme previamente descrito,²⁵ e calibrados com os padrões internacionais do APL (Louisville APL Diagnostics Inc., Doraville, GA, EUA). Os níveis séricos de C3 e C4 foram determinados por imunodifusão radial (The Binding Site Ltd., Birmingham, Reino Unido), de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizados dois ensaios para medir os anticorpos anticromatina/nucleossomo. Como os anticorpos anticromatina e antinucleossomo são normalmente sinônimos, decidimos nomear o ensaio comercial de anticromatina como anti-CHR, e o ensaio *in house* de antinucleossomo como anti-NCS.

Preparo de nucleossomos e detecção de anticorpos contra as partículas centrais do nucleossomo (NCS) e cromatina (CHR)

O kit comercial QUANTA Life™ Chromatin que utiliza a cromatina altamente purificada de timo de bezerro sem histona H1 e proteínas não histônicas (INOVA Diagnostics, San Diego, CA) foi processado de acordo com as instruções do fabricante. Para avaliação qualitativa, ao utilizar o ponto de corte de 20 U/mL sugerido pelo fabricante, os resultados foram expressos como anti-CHR-20. Alternativamente, ao usar o ponto de corte de 60 U/mL (soros considerados positivos de moderados a forte, de acordo com o fabricante), os resultados foram expressos como anti-CHR-60.

O imunoensaio *in house* anti-NCS foi padronizado para detectar anticorpos IgG e IgG3 contra as partículas centrais do nucleossomo isoladas do timo de bezerro, conforme previamente descrito,^{26,27} com pequenas modificações. Em resumo, 10 g de timo de bezerro foram triturados e homogeneizados em 140 mL de tampão A [sacarose 0,3 M, MgCl₂ 6 mM, CaCl₂ 1,2 mM, NaHSO₃ 10 mM, Tris-HCl 10 mM e fluoreto de fenilmetilsulfonila 0,2 mM (PMSF), pH 7,5] e, depois, passados por gaze e papel-filtro Miracloth®. Os núcleos foram isolados por centrifugação a 3.300 g por 8 minutos a 4°C, lavados duas vezes no mesmo tampão, peletizados e ressuspensos em 8 mL de NaCl 15 mM, 2-mercaptoetanol 15 mM, KCl 60 mM, espermina 0,5 mM, espermidina 0,15 mM, pH 7,4. O volume foi ajustado até produzir uma concentração final de DNA de ~2.500 µg/mL, conforme avaliado pela densidade óptica (DO) a 260 nm. A suspensão contendo os núcleos foi digerida por 2 minutos a 37°C com 40 UI de nuclease de micrococos por mg de DNA (Worthington Biochemical Corp., Likewood, NJ) na presença de CaCl₂ 1 mM e, em seguida, a reação foi finalizada pela adição de EDTA 2 mM. Os núcleos foram peletizados a 8.000 g por 2 minutos a 4°C, ressuspensos no volume original com EDTA 0,2 mM de pH 7,0 e, depois, homogeneizados em um homogeneizador Dounce. O homogenato foi centrifugado novamente por 2 minutos a 8.000 g a 4°C, e o sobrenadante contendo a cromatina longa solúvel, recuperado. Histonas H1 e proteínas não histônicas foram removidas pela adição gota a gota de NaCl 4 M em banho de gelo até uma concentração final de NaCl 0,5 M. As proteínas não histônicas e a histona H1 foram separadas da solução de cromatina purificada por meio de filtração em uma coluna de Sepharose 4B (Sigma Chemical, St. Louis, EUA), previamente equilibrada com NaCl 0,45 M, EDTA 0,2 mM e Tris-HCl 5 mM de pH 7,5. As frações contendo as partículas centrais do nucleossomo foram selecionadas e agrupadas de acordo com o padrão eletroforético apresentado em gel de agarose.

O teste ELISA *in house* para detecção do anticorpo anti-NCS foi baseado no ensaio desenvolvido por Burlingame and Rubin.²⁷ Microplacas para ELISA (Nunc-MediSorpT Surface, Dinamarca) foram cobertas por 200 µL/poço de uma solução a 5 µg DNA/mL de nucleossomos purificados em PBS (solução salina fosfato) gelado e incubadas por 48 horas a 4°C. Os poços de placa foram bloqueados com 200 µL/poço de gelatina a 0,1% em PBS por 2 horas à temperatura ambiente. As amostras dos pacientes (200 µL) diluídas na proporção de 1:100 em gelatina a 0,1% em PBS foram aplicadas a cada poço e, em seguida, incubadas por 2 horas à temperatura ambiente. As placas foram lavadas três vezes com Tween 20 a 0,05% em PBS (250 µL/poço) e, depois, incubadas por 2 horas à temperatura ambiente com 200 µL/poço de conjugado anti-IgG humano - HRP (Sigma, St. Louis, EUA) diluído 1:20.000 em Tween 20 a 0,05%, gelatina a 0,1%, albumina sérica bovina (BSA) a 0,1% e soro fetal bovino (SFB) a 0,5% em PBS ou conjugado anti-IgG3 humano - HRP (ZYMED Laboratories, San Francisco, CA) diluído 1:2.000 no mesmo tampão. Após nova lavagem, as placas receberam 200 µL/poço de substrato cromogênico para peroxidase (10 mg de o-fenilenodiamino, 10 µL de H₂O₂ em 25 mL de tampão citrato 0,1 M, pH 5,0). Após incubação sob agitação por 1 hora à temperatura ambiente em câmara escura e adição de 50 µL/poço de solução de parada (H₂SO₄ 1 N), a DO foi lida a 492 nm. Reatividade inespecífica foi checada em poços não sensibilizados da placa e processados paralelamente com os poços de teste. O valor de corte foi determinado como a média mais três desvios-padrão dos valores de DO obtidos com as amostras séricas de 80 doadores de sangue saudáveis (0,573 para IgG anti-NCS e 0,400 para IgG3 anti-NCS). Os valores de corte obtidos eram compatíveis com aqueles derivados da análise de curva ROC (ver resultados). Três amostras de controle positivas e outras três negativas, obtidas de um laboratório particular certificado no local pelo *US College of American Pathologists*, foram incluídas em cada placa.

Análise estatística

As variáveis contínuas foram expressas como média e desvio-padrão. A comparação entre os grupos foi realizada com o teste *t* de Student (variáveis paramétricas) ou o teste de Mann-Whitney (variáveis não paramétricas) para variáveis contínuas, e o teste exato de Fisher ou qui-quadrado para variáveis categóricas, conforme a necessidade. As correlações foram determinadas pela correlação de Spearman para variáveis não paramétricas. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o programa SPSS (versão 15.0 para Windows, Chicago, EUA). $P < 0,05$ foi considerado significativo.

RESULTADOS

Dados demográficos

Trinta e sete pacientes tinham LESJ ativo (escore do SLEDAI ≥ 6), e 41 apresentavam LESJ inativo (escore do SLEDAI ≤ 2). Não houve diferença significativa em termos de gênero, idade ou etnia entre os grupos de 37 pacientes com LESJ ativo (29 meninas, $13,2 \pm 3,4$ anos de idade, 20 caucasianos), 41 com LESJ inativo (35 meninas, $12,0 \pm 3,0$ anos de idade, 23 caucasianos), 47 com DA não lúpicas (35 meninas, $11,0 \pm 3,6$ anos de idade, 26 caucasianos) e 50 controles saudáveis (35 meninas, $14,0 \pm 4,3$ anos de idade, 22 caucasianos) ($P = 0,153, 0,054, e 0,525$, respectivamente). Os pacientes com LESJ ativo apresentaram duração menor da doença em comparação àqueles com LESJ inativo ($P = 0,013$) (Tabela 1). As características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LESJ ativo e inativo estão retratadas na Tabela 2. Nefrite ativa no momento da coleta de sangue, definida por uma proteinúria acima de $0,5$ g/dia, foi identificada em 15 dos 37 pacientes com LESJ ativo.

Tabela 1

Dados demográficos de pacientes com LESJ ativo, LESJ inativo, DA não lúpicas e controles saudáveis

	LESJ ativo (n = 37)	LESJ inativo (n = 41)	DA não lúpicas (n = 47)	Controles saudáveis (n = 50)	P
Gênero (F/M)	31/6	36/5	35/12	35/15	0,153 ^a
Idade (anos)	$13,2 \pm 3,4$	$13,2 \pm 3,0$	$11 \pm 3,6$	$11,5 \pm 4,3$	0,054 ^a
Duração da doença (meses)	$24 \pm 23,4$	$41,8 \pm 30,4$	nd	nd	0,013 ^b
Etnicidade (C/NC)	20/17	24/17	26/21	22/28	0,525 ^a

Média e desvio-padrão. Valor de P no teste qui-quadrado: ^acomparação de todos os grupos; ^bComparação entre pacientes com LESJ ativo e inativo. F: feminino; M: masculino; C: caucasiano; NC: não caucasiano; JSLE: lúpus eritematoso sistêmico juvenil; DA: doença autoimune.

Tabela 2

Características clínicas e laboratoriais de pacientes com LESJ ativo, LESJ inativo, DA não lúpicas e controles saudáveis

	LESJ ativo %(n = 37)	LESJ inativo %(n = 41)	DA não lúpicas %(n = 47)	Controles saudáveis %(n = 50)
Envolvimento renal	84% (31)	Nenhum	nd	nd
Envolvimento cutâneo	22% (8)	Nenhum	nd	nd
Artrite	19% (7)	Nenhum	nd	nd
Envolvimento hematológico	13% (5)	10% (4)	nd	nd
Febre	11% (4)	Nenhum	nd	nd
Alopecia	11% (4)	Nenhum	nd	nd
Úlceras de mucosa	8% (3)	Nenhum	nd	nd
Cefaleia crônica	8% (3)	Nenhum	nd	nd
Manifestações neurológicas	5% (2)	Nenhum	nd	nd
Vasculite	5% (2)	Nenhum	nd	nd
Serosite	3% (1)	Nenhum	nd	nd

nd: não determinado; LESJ: lúpus eritematoso sistêmico juvenil; DA: doença autoimune.

Anticorpos contra as partículas centrais do nucleossomo (NCS), cromatina (CHR) e DNA nativo (dsDNA)

Entre todos os pacientes com LESJ, foram detectados anticorpos anti-dsDNA em 29% deles por meio do teste ELISA e em 14% pelo CLIF. Foram encontrados anticorpos anti-CHR-20 e IgG anti-NCS em 40% e em 23% de todos os pacientes com LESJ, respectivamente. Também foram detectados anticorpos IgG3 anti-NCS em 18% de todos os pacientes com LESJ. A Tabela 3 retrata a frequência dos diversos autoanticorpos em cada grupo, bem como os dados sobre sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para o diagnóstico de LESJ calculados em relação aos pacientes com DA não lúpicas e crianças saudáveis como um todo. Entre os testes analisados, o ensaio CLIF para detecção de anticorpos anti-dsDNA foi o menos sensível, embora tenha apresentado a maior especificidade e valor preditivo positivo. Os ensaios de ELISA para detecção de anticorpos anti-dsDNA, anti-CHR-60 e IgG anti-NCS exibiram um desempenho equivalente em todos os parâmetros diagnósticos. O ensaio anti-CHR-20 apresentou

sensibilidade mais alta, porém especificidade e valor preditivo positivo mais baixo, em comparação aos três ensaios prévios de ELISA. Houve uma heterogeneidade considerável entre os soros de pacientes com LESJ em relação aos valores de

DO do teste ELISA nos ensaios para detecção de anticorpos anti-dsDNA, anti-CHR e anti-NCS (Figura 1). Os pacientes com LESJ apresentaram níveis significativamente mais altos de anticorpos contra componentes da cromatina que aqueles

Tabela 3

Positividade, sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo de diferentes ensaios de autoanticorpos para o diagnóstico de LESJ em comparação a pacientes com DA não lúpicas e controles saudáveis como um todo

	Positividade dos ensaios de autoanticorpo (%)					
	CHR-20	CHR-60	NCS IgG	NCS IgG3	dsDNA CLIF	dsDNA ELISA
LESJ ativo (n = 37)	43%	27%	27%	22%	24%	38%
LESJ inativo (n = 41)	36%	22%	19%	15%	5%	22%
DA não lúpicas (n = 47)	11%	4%	2%	4%	0%	6%
Controles saudáveis (n = 50)	0%	0%	2%	2%	0%	0%

Parâmetros diagnósticos*						
Sensibilidade	40%	24%	23%	18%	11%	27%
Especificidade	96%	98%	98%	95%	100%	97%
VPP	88%	90%	90%	74%	100%	87%
VPN	66%	62%	61%	58%	58%	62%

*Calculados para o diagnóstico de LESJ diante de pacientes com DA não lúpicas e crianças saudáveis como um todo.

VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo; LESJ: lúpus eritematoso sistêmico juvenil; DA: doença autoimune; CHR-20: ensaio comercial para anticorpo anticromatina com valor de corte de 20 U/mL; CHR-60: ensaio comercial para anticorpo anticromatina com valor de corte de 60 U/mL; NCS-IgG: ensaio in house para anticorpo antinucleossomo em relação aos anticorpos IgG totais; NCS-IgG3: ensaio in house para anticorpo antinucleossomo em relação aos anticorpos IgG3; CLIF: ensaio para anticorpo anti-dsDNA feito com base na imunofluorescência indireta em substrato de *C. luciliae*; ELISA: ensaio imunoabsorvente ligado à enzima.

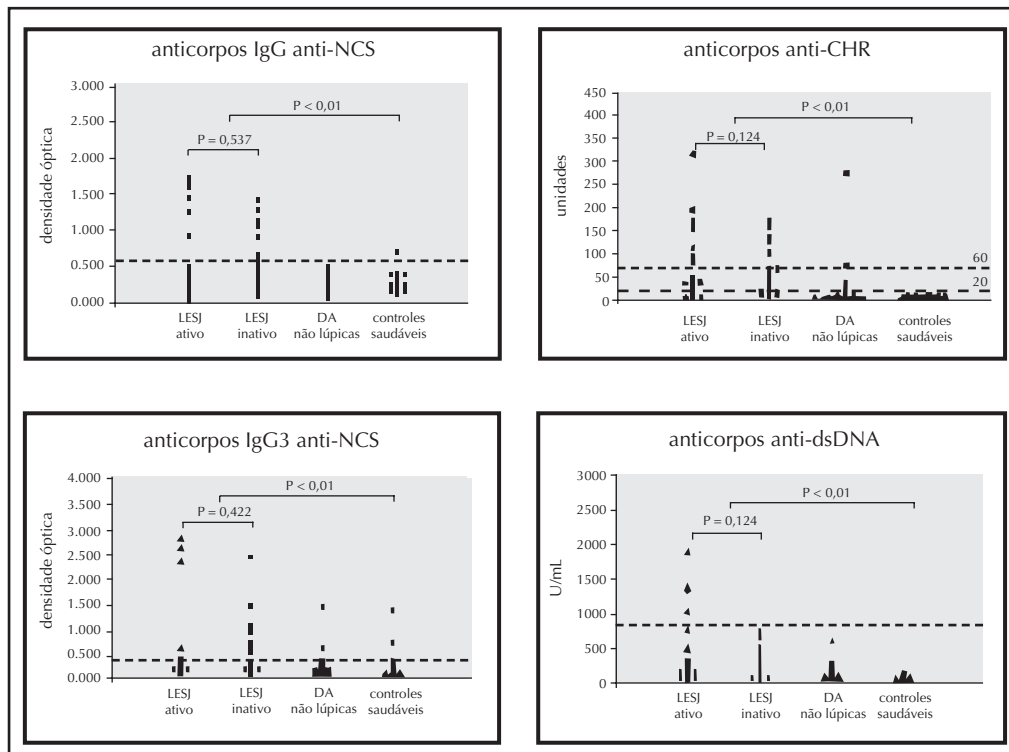


Figura 1
Distribuição de pacientes com LESJ, outros com AD não lúpicas e controles saudáveis de acordo com níveis séricos de anticorpos contra NCS, CHR e dsDNA no teste ELISA. As linhas tracejadas correspondem ao limiar de corte para cada ensaio (para o ensaio anti-CHR, houve níveis de corte de 20 U e 60 U).

Anti-CHR: ensaio comercial para anticorpo anticromatina (com valor de corte de 20 U/mL); IgG anti-NCS: ensaio in house para anticorpo antinucleossomo em relação aos anticorpos IgG totais; IgG3 anti-NCS: ensaio in house para anticorpo antinucleossomo em relação aos anticorpos IgG3; anti-dsDNA: ensaio comercial para anticorpo anti-dsDNA de dupla hélice; ELISA: ensaio imunoabsorvente ligado à enzima.

com DA não lúpicas e os indivíduos saudáveis ($P < 0,01$). Foram observados resultados positivos nos testes ANA-HEp-2 e anti-ENA, respectivamente, em 92% e 32% dos pacientes com LESJ ativo, 90% e 27% daqueles com LESJ inativo, 36% e 0% de outros com DA não lúpicas e 2% e 0% das crianças saudáveis. No teste ANA-HEp-2, os padrões homogêneos e pontilhados finos foram os mais frequentemente encontrados em soros de pacientes com LESJ positivos para quaisquer componentes testados da cromatina.

Vários parâmetros de atividade da doença demonstraram correlação com anticorpos contra os componentes da cromatina. Anticorpos anti-dsDNA (ensaio CLIF) eram mais frequentes em pacientes com LESJ ativo (SLEDAI ≥ 6) em comparação àqueles com a doença inativa (SLEDAI ≤ 2) (24% vs. 5%, $P < 0,001$). Além disso, o SLEDAI se correlacionou com os níveis de anticorpos anti-dsDNA no teste ELISA ($r = 0,235$; $P = 0,038$), mas não com os níveis de anticorpos anti-CHR e anti-NCS. Os pacientes com LESJ ativo não diferiram significativamente daqueles com LESJ inativo em relação à frequência e aos níveis de DO dos anticorpos anti-dsDNA ($424,8 \pm 540,9$ UI/mL vs. $208,2 \pm 202,9$ UI/mL; $P = 0,124$), anti-CHR-20 ($56,3 \pm 71,8$ U/mL vs. $35,4 \pm 43,7$ U/mL, $P = 0,537$), IgG anti-NCS ($0,589 \pm 0,528$ vs. $0,429 \pm 0,336$; $P = 0,432$), e IgG3 anti-NCS ($0,536 \pm 0,810$ vs. $0,343 \pm 0,442$; $P = 0,422$). Foi observada frequência significativamente mais alta de proteinúria em pacientes com anticorpos contra qualquer um dos componentes testados da cromatina *versus* aqueles sem esses anticorpos (Tabela 4). Correspondentemente, os níveis de autoanticorpos eram bem mais altos em pacientes com proteinúria em comparação àqueles sem proteinúria para os anticorpos anti-dsDNA ($691,1 \pm 730,4$ vs. $220,4 \pm 217,6$; $P = 0,049$) e

IgG anti-NCS ($0,814 \pm 0,598$ vs. $0,431 \pm 0,365$; $P = 0,019$) no teste ELISA. Também havia uma tendência semelhante para os anticorpos anti-CHR ($95,5 \pm 93,1$ vs. $33,3 \pm 40,6$; $P = 0,093$), mas não para os anticorpos IgG3 anti-NCS ($0,811 \pm 1,03$ vs. $0,340 \pm 0,485$; $P = 0,700$). Foi constatada uma associação entre o declínio dos níveis de C3 e a frequência de resultado positivo para o ensaio anti-CHR-20. Entre os pacientes com LESJ e níveis reduzidos de C4, havia uma frequência mais alta de resultados positivos para ensaios de dsDNA (ELISA), CHR-20, IgG NCS e IgG3 NCS (Tabela 4). Foram observados anticorpos contra antígenos nucleares extraíveis isolados ou combinados em 23 pacientes com LESJ (13 anti-SS-A/Ro, quatro anti-SS-B/La, seis anti-Sm e 14 anti-U1-RNP), não havendo qualquer associação com a presença de anticorpos contra os componentes da cromatina. Apenas sete dos 78 pacientes com LESJ exibiram níveis moderados de anticorpos anticardiolipina [dois IgG (2,5%) e cinco IgM (6,4%)], mas nenhuma associação foi observada entre a reatividade à cardiolipina e a presença de anticorpos contra os componentes da cromatina. Outras manifestações clínicas foram igualmente frequentes em pacientes com LESJ com e sem qualquer um dos anticorpos testados contra os componentes da cromatina (dados não ilustrados).

Conforme retratado na Figura 2, havia uma boa concordância entre os ensaios ELISA para os anticorpos anti-dsDNA e anti-CHR (85% e 87% para CHR-20 e CHR-60, respectivamente), entre os anticorpos anti-dsDNA e IgG anti-NCS (86%), bem como entre os anticorpos IgG anti-NCS e anti-CHR (78% e 91% para CHR-20 e CHR-60, respectivamente). De fato, constatamos enorme semelhança entre o ensaio *in house* anti-NCS e o ensaio comercial anti-CHR quando este foi analisado com

Tabela 4

Distribuição de 78 pacientes com LESJ de acordo com a presença de autoanticorpos contra componentes da cromatina e parâmetros laboratoriais relevantes

Parâmetro laboratorial	Autoanticorpos				
	dsDNA CLIF n = 11	dsDNA ELISA n = 23	CHR-20 n = 33	IgG NCS n = 18	IgG3 NCS n = 14
Proteinúria > 0,5 g/24 h	6 (54,5%)*	9 (39,1%)*	11 (33,3%)*	7 (38,9%)*	6 (42,9%)*
Proteinúria < 0,5 g/24 h	5 (45,4%)	14 (60,9%)	22 (66,7%)	11 (61,1%)	8 (57,1%)
C3 diminuído	3 (27,3%)	8 (34,8%)	13 (39,4%)*	7 (38,9%)	6 (42,9%)
C3 normal	8 (72,7%)	15 (65,2%)	20 (60,6%)	11 (61,1%)	8 (57,1%)
C4 diminuído	4 (36,4%)	10 (43,5%)*	15 (45,5%)*	9 (50%)*	8 (57,1%)*
C4 normal	7 (63,6%)	13 (56,5%)	18 (54,5%)	9 (50%)	6 (42,9%)

* $P < 0,05$ (os valores de P referem-se ao teste qui-quadrado que compara a presença/ausência de cada autoanticorpo com a presença/ausência do parâmetro analisado).

CHR-20: ensaio comercial para anticorpo anticromatina com valor de corte de 20 U/mL; IgG NCS: ensaio *in house* para anticorpo antinucleossomo em relação aos anticorpos IgG totais; IgG3 NCS: ensaio *in house* para anticorpo antinucleossomo em relação aos anticorpos IgG3; CLIF: ensaio para anticorpo anti-dsDNA feito com base na imunofluorescência indireta em substrato de *C. luciliae*; ELISA: ensaio imunabsorvente ligado à enzima.

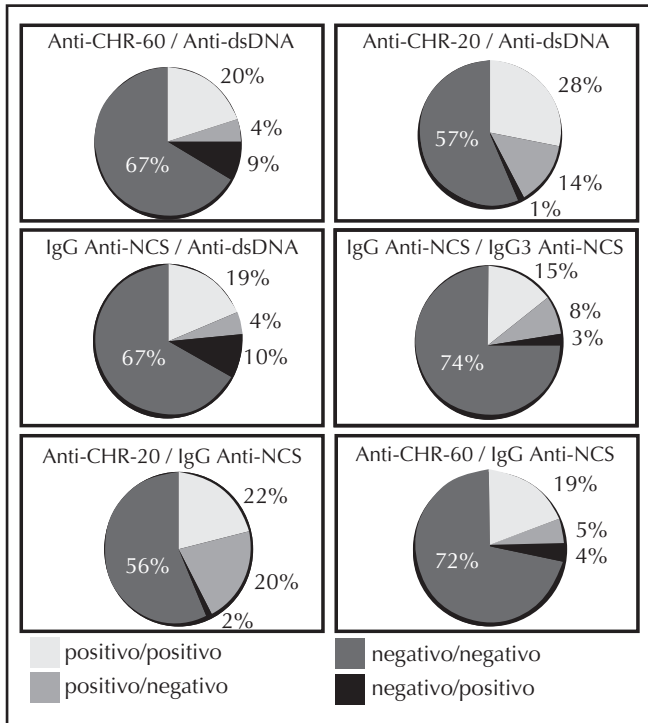


Figura 2

Concordância entre os ensaios de ELISA para anticorpos anti-NCS, anti-CHR-20, anti-CHR-60 e anti-dsDNA em pacientes com LESJ. Os níveis de anti-CHR-20 e anti-CHR-60 referem-se ao teste ELISA para o anticorpo anti-CHR com pontos de corte de 20 U/mL e 60 U/mL, respectivamente.

CHR-20: ensaio comercial para anticorpo anticromatina com valor de corte de 20 U/mL; CHR-60: ensaio comercial para anticorpo anticromatina com valor de corte de 60 U/mL; IgG anti-NCS: ensaio *in house* para anticorpo antinucleossomo em relação aos anticorpos IgG totais; IgG3 anti-NCS: ensaio *in house* para anticorpo antinucleossomo em relação aos anticorpos IgG3; anti-dsDNA: ensaio comercial para anticorpo anti-DNA de dupla hélice; ELISA: ensaio imunoabsorvente ligado à enzima.

o uso de 60 U/mL como valor de corte (anti-CHR-60). Além disso, a taxa de concordância entre os anticorpos IgG anti-NCS e IgG3 anti-NCS foi de 89%. A taxa de discordância entre os mesmos pares de testes variou de 9%–21%. Em particular, o teste ELISA para anti-dsDNA e os testes ELISA para anti-NCS ou anti-CHR demonstraram taxas de discordância em torno de 15%. Em relação aos 23 pacientes positivos para anti-dsDNA no teste ELISA, 22 também eram positivos para anti-CHR-20.

DISCUSSÃO

Estudos prévios abordaram a análise de autoanticorpos contra os componentes da cromatina em LES e doenças

relacionadas; no entanto, poucas pesquisas falaram sobre os anticorpos anti-NCS em casos de LESJ. No presente estudo, observamos uma considerável variação no desempenho diagnóstico dos testes para detecção de diversos anticorpos contra os componentes da cromatina em LESJ. O CLIF tradicional para os anticorpos anti-dsDNA foi o teste mais específico e menos sensível. O teste ELISA para anti-dsDNA e o anti-CHR-20 foram os testes mais sensíveis, embora um pouco menos específicos. Embora o SLEDAI tenha se correlacionado apenas com os anticorpos anti-dsDNA, havia uma associação entre alguns dos autoanticorpos testados contra os componentes da cromatina e os parâmetros indicativos de atividade da doença, como proteinúria e baixos níveis do complemento.

As partículas centrais do nucleossomo constituem as unidades básicas da cromatina e um produto normal da apoptose celular. Os defeitos do processo de apoptose são bem conhecidos por sua associação com certos modelos animais de lúpus, mas tais defeitos também foram discutidos em conexão com LES humano.^{28–31} Provas recentes obtidas em modelos murinos de LES sugerem que as partículas centrais do nucleossomo sejam um dos alvos preferenciais dos autoanticorpos lúpicos; tais partículas, por sua vez, são aceitas como autoantígenos genuínos que deflagram a produção de anticorpos contra as próprias partículas centrais do nucleossomo, o dsDNA e as histonas.^{32–34} De acordo com dados recentes da literatura especializada, a presença de nucleossomos extracelulares glomerulares derivados, por exemplo, de células apoptóticas é um pré-requisito para a ligação de anticorpos anticromatina aos glomérulos e pode estar envolvida em processos nefríticos.^{33,34} Como a resposta autoimune humoral é aceita como uma reação impulsionada por antígeno,² é justificável uma análise abrangente dos autoanticorpos contra componentes individuais de um complexo supramolecular. Além disso, os detalhes técnicos no preparo do substrato antigênico podem ser determinantes na conservação de epítopos fastidiosos não lineares. Em relação ao sistema da cromatina, isso é crucial em virtude da interação complexa e delicada do DNA nativo e de várias histonas e proteínas não histônicas. Portanto, cada plataforma metodológica favorece a exposição de um único grupo de epítopos e isso pode influenciar consideravelmente o significado clínico desses testes.³⁵

Um método amplamente aceito para a purificação das partículas centrais do nucleossomo consiste na solubilização de cromatina nativa pela digestão com a nuclease de micrococos e remoção da histona H1 e de outras proteínas pela extração com NaCl 0,5 M em pH neutro. A maioria dos kits comerciais anti-NCS/cromatina utiliza poli ou mononucleossomos extraídos da cromatina do timo de bezerro como substrato antigênico.

O presente estudo utilizou ensaios imunoenzimáticos, preparados tanto *in house* como comerciais. O kit comercial para anticorpo anticromatina (anti-CHR) (INOVA Diagnostics, San Diego, CA) e o imunoensaio *in house* para anticorpo antipartícula central do nucleossomo (anti-NCS) fizeram uso de substratos antigênicos derivados da cromatina, tanto isolados como purificados do timo de bezerro e desprovidos de histona H1 e proteínas não histônicas. Além disso, os anticorpos contra dsDNA foram determinados por um kit comercial de ELISA e pela imunofluorescência indireta com substrato de *Crithidia luciliae* (CLIF). A variabilidade de desempenho dos vários ensaios no presente grupo de pacientes provavelmente se deve ao efeito cumulativo das diferenças no perfil de epítomos exibidos por diferentes substratos antigênicos e às condições heterogêneas da análise bioquímica dos diferentes testes. De fato, o presente estudo não teve como objetivo a comparação dos vários testes, mas sim a exploração da variabilidade na reatividade dos soros de pacientes com LESJ contra diferentes perfis de epítomos em ensaios cujos alvos eram autoantígenos aparentemente relacionados.

O presente estudo confirmou a alta especificidade de anticorpos antinucleossomo e anticromatina em pacientes com LESJ (anti-CHR-20, 96% e anti-NCS, 98%) quando comparados a crianças com DA não lúpicas e outras saudáveis. Essa observação está de acordo com a especificidade diagnóstica de anticorpos antinucleossomo/anticromatina para lúpus em adultos (média de 95%; variação de 85%–98,8%). A sensibilidade dos vários testes para os diferentes autoanticorpos contra os componentes da cromatina foi relativamente baixa (11%–40%) quando comparada aos dados da literatura especializada sobre LES no adulto.^{11,36–45} Isso pode estar relacionado a características específicas do LESJ e à composição étnica da amostra estudada ou ao fato de que a maioria dos pacientes com LESJ estava sob terapia imunossupressora no momento da coleta do soro. No presente estudo, 22 de 23 (96%) amostras positivas para anti-dsDNA no teste ELISA também eram positivas para anti-CHR-20. Esse achado é compatível com o conceito de que a maior parte dos anticorpos anti-dsDNA em pacientes com LES constitui um subgrupo de anticorpos direcionados contra a cromatina.⁴⁰ Contudo, 14% dos pacientes com LESJ eram reativos no ensaio anti-CHR-20, mas não no teste ELISA para anti-dsDNA. Em contrapartida, 1% das amostras de pacientes com LESJ era positivo para anticorpos anti-dsDNA no teste ELISA, mas negativo para anti-CHR-20. Por outro lado, 15 de 23 (65%) das amostras positivas para anti-dsDNA no teste ELISA também eram positivas nos ensaios para

IgG anti-NCS e anti-CHR-60, mas 4% dos pacientes com LESJ exibiram resultados negativos nesses ensaios. Tal dissociação foi previamente relatada^{13,38,40,42,43,46–48} e indica que esses sistemas de autoanticorpos desempenham papéis complementares no diagnóstico de LES. Isso pode exercer um impacto na prática clínica, na medida em que a demonstração de anticorpos anti-NCS, na ausência de outros autoanticorpos, pode ser particularmente útil em pacientes com poucas manifestações clínicas (p. ex., < 3 critérios de classificação). Nesses casos, a terapia precoce pode ter utilidade.

Os presentes dados confirmam a importância de se definir o valor de corte de acordo com a população estudada a fim de determinar a acurácia diagnóstica dos vários ensaios imunoenzimáticos em diferentes estruturas étnicas e sociais. Com o uso do valor de corte recomendado pelo fabricante em nossa amostra, o kit comercial anticromatina (INOVA) exhibe uma especificidade consideravelmente menor.

A atividade da doença, conforme mensurada pelo SLEDAI, foi associada com a presença de anti-dsDNA (ensaio CLIF) e correlacionada com os níveis séricos de anti-dsDNA no teste ELISA, mas não foi associada com qualquer um dos outros ensaios avaliados. Contudo, o baixo nível de correlação ($r = 0,235$) sugere que esse parâmetro deva ser utilizado com cuidado na prática clínica. No entanto, é interessante notar que a presença de anticorpos contra os componentes da cromatina foi basicamente associada na literatura especializada com marcadores de nefrite lúpica ativa. Vários estudos demonstraram previamente uma associação de anticorpos antinucleossomo e atividade da doença ou nefrite ativa em LES.^{11,13,14,35,38,40,43,48} Também foi apontado que os anticorpos antinucleossomo sejam altamente correlacionados com insuficiência renal e evolução para transplante renal em casos de LES.⁴⁹ O presente estudo também confirmou tal associação para o quadro de LESJ e aprofundou ainda mais a observação para várias especificidades de autoanticorpos dentro do sistema supramolecular da cromatina. Apesar da ampla dispersão dos níveis séricos desses autoanticorpos em pacientes com doença ativa e inativa, eles foram associados com marcadores de nefrite ativa. Isso sugere uma possível associação intraindividual de atividade da doença com níveis séricos de anticorpos antinucleossomo e anti-dsDNA. Portanto, estudos longitudinais prospectivos são justificáveis para explorar ainda mais essa possibilidade.

O comportamento de anticorpos antinucleossomo nos casos de lúpus em adultos foi analisado de acordo com o isótipo do anticorpo (classes de IgG e IgM, além de subclasses de IgG) por Amoura *et al.*¹¹ Interessantemente, anticorpos IgG3 anti-NCS estavam presentes em altos níveis apenas em pacientes com LES ativa, sobretudo em nefrite lúpica ativa. No teste para detecção

de anticorpos IgG3 anti-NCS em casos de LESJ, confirmamos que esses anticorpos estavam associados com marcadores de nefrite lúpica ativa, como proteinúria e baixo nível sérico de C4. Havia sensibilidade de 18% e especificidade de 95% para o diagnóstico de LESJ. Contudo, a frequência de IgG3 anti-NCS foi semelhante em crianças com LESJ ativo e inativo, mas os níveis séricos de IgG3 anti-NCS não se correlacionaram com o SLEDAI. Em suma, este é o primeiro relato de LESJ sobre uma pesquisa abrangente de autoanticorpos contra vários autoantígenos do complexo da cromatina, incluindo anticorpos IgG3 anti-NCS. Constatamos especificidade elevada e sensibilidade moderada desses anticorpos para o diagnóstico de LESJ, sinalizando-os como ferramentas úteis no diagnóstico diferencial de LESJ entre doenças autoimunes sistêmicas. Houve uma taxa de discordância moderada entre anticorpos anti-NCS/cromatina e anti-dsDNA, indicando que tais marcadores são autoanticorpos complementares para o diagnóstico de lúpus. A associação de anticorpos anti-NCS/cromatina com proteinúria e baixos níveis de C4 sugere um possível papel desempenhado por esses anticorpos como marcadores de atividade da nefrite lúpica. Portanto, é justificável a realização de outros estudos longitudinais para definir a utilidade clínica de anticorpos anti-NCS/cromatina na monitorização da atividade de LESJ.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Rufus Burlingame pela supervisão técnica na purificação do nucleossomo e na montagem do teste ELISA para detecção dos anticorpos antinucleossomo, bem como pela orientação geral do projeto. Esse estudo foi apoiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) por meio do subsídio nº 05/00658-0.

REFERENCES

REFERÊNCIAS

- Baqi N, Moazami S, Singh A, Ahmad H, Balachandra S, Tejani A. Lupus nephritis in children: a longitudinal study of prognostic factors and therapy. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7(6):924-9.
- Tan EM, Chan EKL. Molecular biology of autoantigens and new insights into autoimmunity. *Clin Investig* 1993; 71(4):327-30.
- Sherer Y, Gorstein A, Fritzler MJ, Shoenfeld Y. Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus: more than 100 different antibodies found in SLE patients. *Semin Arthritis Rheum* 2004; 34(2):501-37.
- Tan EM, Chan EKL, Sullivan KF, Rubin RL. Antinuclear antibodies (ANAs): diagnostically specific immune markers and clues toward the understanding of systemic autoimmunity. *Clin Immunol Immunopathol* 1988; 47(2):121-41.
- Amoura Z, Piette JC, Bach JF, Koutouzov S. The key role of nucleosomes in lupus. *Arthritis Rheum* 1999; 42(5):833-43.
- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 1997; 389(6648):251-60.
- Flora PK, Gregory CD. Recognition of apoptotic cells by human macrophages: inhibition by a monocyte/macrophage-specific monoclonal antibody. *Eur J Immunol* 1994; 24(11):2625-32.
- Decker P. Nucleosome autoantibodies. *Clin Chim Acta* 2006; 366(1-2):48-60.
- Mohan C, Adams S, Stanik V, Datta SK. Nucleosome: a major immunogen for pathogenic autoantibody-inducing T cells of lupus. *J Exp Med* 1993; 177(5):1367-81.
- Bruns A, Bläss S, Hausdorf G, Burmester GR, Hiepe F. Nucleosome are major T and B cell autoantigens in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2000; 43:2307-15.
- Amoura Z, Koutouzov S, Chabre H, Cacoub P, Amoura I, Musset L *et al.* Presence of antinucleosome autoantibodies in a restricted set of connective tissue diseases: antinucleosome antibodies of the IgG3 subclass are markers of renal pathogenicity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2000; 43(1):76-84.
- Massa M, De Benedetti F, Pignatti P, Albani B, Di Fuccia G, Monestier M *et al.* Anti-double stranded DNA, anti-histone, and antinucleosome IgG reactivities in children with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 1994; 12(2):219-25.
- Campos LM, Kiss MH, Scheinberg MA, Manguera CL, Silva CA. Antinucleosome antibodies in patients with juvenile systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2006; 15(8):496-500.
- Wu JF, Yang YH, Wang LC, Lee JH, Shen EY, Chiang BL. Antinucleosome antibodies correlate with the disease severity in children with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 2006; 27(2):119-24.
- Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF *et al.* The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25(11):1271-7.
- Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40(9):1725.
- Petty RE, Southwood TR, Manners P, Baum J, Glass DN, Goldenberg J *et al.* International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001. *J Rheumatol* 2004; 31(2):390-2.
- Bohan A, Peter JB. Polymyositis and Dermatomyositis (first of two parts). *N Engl J Med* 1975; 292(7):344-7.
- Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Burroughs AK, Cancado EL *et al.* International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999; 31(5):929-38.
- Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum* 1992; 35(6):630-40.
- Petri M, Genovese M, Engle E, Hochberg M. Definition, incidence, and clinical description of flare in systemic lupus erythematosus. A prospective cohort study. *Arthritis Rheum* 1991; 34(8):937-44.
- Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cell. *J Immunol* 1978; 121(6):2228-34.

23. Aarden LA, de Groot ER, Feltkamp TE. Immunology of DNA III. Crithidia luciliae, a simple substrate for the determination of anti-dsDNA with the immunofluorescence technique. *Ann NY Acad Sci* 1975; 254:505–15.
24. Hardin JA, Craft JE. Patterns of autoimmunity to nucleoproteins in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am* 1987; 13(1):37–46.
25. Wong RC; Australasian aCL Working Party. Consensus guidelines for anticardiolipin antibody testing. *Thromb Res* 2004; 114(5–6):559–71.
26. Lutter LC. Kinetic analysis of deoxyribonuclease I cleavages in the nucleosome core: evidence for a DNA superhelix. *J Mol Biol* 1978; 124(2):391–420.
27. Burlingame RW, Rubin RL. Subnucleosome structures as substrates in enzyme-linked immunosorbent assays. *J Immunol Methods* 1990; 134(2):187–99.
28. Amoura Z, Chabre H, Koutouzov S, Lotton C, Cabrespines A, Bach JF *et al.* Nucleosome-restricted antibodies are defected before anti-ds-DNA and/or antihistone in serum of MRL-Mp lpr/lpr and +/- mice, and are present in kidney eluates of lupus mice with proteinuria. *Arthritis Rheum* 1994, 37(11):1684–8.
29. Tax WJM, Kramers C, van Bruggen MCJ, Berden JH. Apoptosis, nucleosomes, and nephritis in systemic lupus erythematosus. *Kidney Int* 1995; 48(3):666–73.
30. Koutouzov S, Jeronimo AL, Campos H, Amoura Z. Nucleosomes in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am* 2004; 30(3):529–58.
31. Berden JHM, Groostscholten C, Jürgen WC, van der Vlag J. Lupus nephritis: a nucleosome waste disposal defect? *J Nephrol* 2002; 15(Suppl. 6): S1–10.
32. Kalaaji M, Mortensen E, Jørgensen L, Olsen R, Rekvig OP. Nephritogenic lupus antibodies recognize glomerular basement membrane-associated chromatin fragments released from apoptotic intraglomerular cells. *Am J Pathol* 2006; 168(6):1779–92.
33. Kalaaji M, Fenton KA, Mortensen ES, Olsen R, Sturfelt G, Alm P *et al.* Glomerular apoptotic nucleosomes are central target structures for nephritogenic antibodies in human SLE nephritis. *Kidney Int* 2007; 71(7):664–72.
34. Mjelle JE, Rekvig OP, Fenton KA. Nucleosomes possess a high affinity for glomerular laminin and collagen IV and bind nephritogenic antibodies in murine lupus-like nephritis. *Ann Rheum Dis* 2007; 66(12):1661–68.
35. Simón JA, Cabiedes J, Ortiz E, Alcocer-Varela J, Sánchez-Guerrero J. Anti-nucleosome antibodies in patients with systemic lupus erythematosus of recent onset. Potential utility as a diagnostic tool and disease activity marker. *Rheumatology (Oxford)* 2004; 43(2):220–4.
36. Burlingame RW, Boey ML, Starkebaum G, Rubin RL. The central role of chromatin in autoimmune responses to histones and DNA in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1994; 94(1):184–92.
37. Wallace DJ, Lin HC, Shen GQ, Peter JB. Antibodies to histone (H2A-H2B)-DNA complexes in the absence of antibodies to double-stranded DNA or to (H2A-H2B) complexes are more sensitive and specific for scleroderma-related disorders than for lupus. *Arthritis Rheum* 1994; 37(12):1795–7.
38. Chabre H, Amoura Z, Piette JC, Godeau P, Bach JF, Koutouzov S. Presence of nucleosome-restricted antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1995; 38(10):1485–91.
39. Mohan C, Liu F, Xie C, Williams Jr RC. Anti-subnucleosome reactivities in systemic lupus erythematosus (SLE) patients and their first-degree relatives. *Clin Exp Immunol* 2001; 123(1):119–26.
40. Min DJ, Kim SJ, Park SH, Seo YI, Kang HJ, Kim WU *et al.* Anti-nucleosome antibody: significance in lupus patients lacking anti-double-stranded DNA antibody. *Clin Exp Rheumatol* 2002; 20(1):13–8.
41. Ghillani-Dalbin P, Amoura Z, Cacoub P, Charuel JL, Diemert MC, Piette JC *et al.* Testing for anti-nucleosome antibodies in daily practice: a monocentric evaluation in 1696 patients. *Lupus* 2003; 12(11):833–7.
42. Cairns AP, McMillan SA, Crockard AD, Meenagh GK, Duffy EM, Armstrong DJ *et al.* Antinucleosome antibodies in the diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2003; 62(3):272–3.
43. Cervera R, Viñas O, Ramos-Casals M, Font J, García-Carrasco M, Sisó A *et al.* Anti-chromatin antibodies in systemic lupus erythematosus: a useful marker for lupus nephropathy. *Ann Rheum Dis* 2003; 62(5):431–4.
44. González C, Garcia-Berrocal B, Herráez O, Navajo JA, González-Buitrago JM. Anti-nucleosome, anti-chromatin, anti-dsDNA and anti-histone antibody reactivity in systemic lupus erythematosus. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42(3):266–72.
45. Ghirardello A, Doria A, Zampieri S, Tarricone E, Tozzoli R, Villalta D *et al.* Antinucleosome antibodies in SLE: a two-year follow-up of 101 patients. *J Autoimmun* 2004; 22(3):235–40.
46. Gómez-Puerta JA, Molina JF, Anaya JM, Molina J. Clinical significance of anti-chromatin antibodies in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2001; 10(suppl 1):S73.
47. Braun A, Sis J, Max R, Mueller K, Fiehn C, Zeier M *et al.* Anti-chromatin and anti-C1q antibodies in systemic lupus erythematosus compared to other systemic autoimmune diseases. *Scand J Rheumatol* 2007; 36(4):291–8.
48. Sardeto GA, Simas LM, Skare TS, Nisihara RN, Utiyama SR. Antinucleosome in systemic lupus erythematosus. A study in a Brazilian population. *Clin Rheumatol* 2011; 31(3):553–6.
49. Stinton LM, Barr SG, Tibbles LA, Yilmaz S, Sar A, Benediktsson H *et al.* Autoantibodies in lupus nephritis patients requiring renal transplantation. *Lupus* 2007; 16(6):394–400.