

Anticorpos antinucleossomo e síndrome antifosfolipídica: estudo observacional

Alexandre Wagner Silva de Souza¹, Silene Peres Keusseyan²,
Neusa Pereira da Silva³, Emilia Inoue Sato⁴, Luis Eduardo Coelho Andrade⁵

RESUMO

Objetivo: Avaliar a associação entre a presença de anticorpos antinucleossomo (anti-NCS) e a síndrome antifosfolipídica primária (SAFP) e o posterior desenvolvimento de lúpus eritematoso sistêmico (LES). **Materiais e métodos:** Trinta e seis mulheres com o diagnóstico de SAFP foram avaliadas prospectivamente para manifestações de doenças reumáticas autoimunes e para a presença de anticorpos antifosfolípides, anticorpos antinucleares e anti-NCS/cromatina. **Resultados:** Após um período médio de seguimento de 45,7 meses, anticorpos anti-NCS/cromatina foram detectados em apenas uma paciente (2,8%), que desenvolveu manifestações de LES tais como poliartrite, linfopenia, neurite óptica, lesões compatíveis com esclerose múltipla em substância branca cerebral e perfil de autoanticorpos altamente sugestivo de LES. **Conclusão:** A frequência de anticorpos anti-NCS/cromatina é baixa em pacientes com SAFP, e sua presença pode associar-se ao desenvolvimento de manifestações de LES.

Palavras-chave: síndrome antifosfolipídica, lúpus eritematoso sistêmico, anticorpos anticardiolipina, inibidor de coagulação do lúpus.

© 2012 Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

INTRODUÇÃO

A síndrome antifosfolipídica (SAF) caracteriza-se por manifestações trombóticas e/ou morbidade obstétrica na presença de anticorpos antifosfolípides (AAF). Os ensaios padrão para AAF recomendados pelas últimas diretrizes sobre SAF são a pesquisa de anticorpo anticoagulante lúpico (AACL) e imunoenaios enzimáticos para anticorpos contra β_2 glicoproteína I (anti- β_2 GPI) e contra cardiolipina (aCL) na presença de β_2 GPI. A SAF pode ocorrer como doença primária ou associada a outras doenças sistêmicas autoimunes, principalmente lúpus eritematoso sistêmico (LES).^{1,2}

O LES caracteriza-se por uma ampla gama de autoanticorpos circulantes, muitos dos quais direcionados contra antígenos nucleares.³ Em particular, antígenos de cromatina parecem constituir o alvo preferencial dos autoanticorpos no

LES. O nucleossomo é a unidade de cromatina e consiste em 146 pares de bases de DNA enrolados em torno de um núcleo proteico. O núcleo proteico é um octâmero formado por duas moléculas de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4.⁴ A frequência dos autoanticorpos contra o nucleossomo (anti-NCS) e contra a cromatina sem H1 (anti-cromatina) no LES varia de 50%–100%, e sua especificidade para diagnosticar LES é relatada como variando entre 90%–99%.^{5–15} Anticorpos anti-NCS/cromatina foram associados a glomerulonefrite ativa em pacientes com LES.^{6–10}

Embora considerados específicos para LES, os anticorpos anti-NCS/cromatina foram descritos em outras condições autoimunes, tais como esclerose sistêmica, síndrome de Sjögren, doença mista do tecido conjuntivo e hepatite autoimune do tipo 1.^{6,8,9,16,17} A literatura é controversa, e alguns autores acreditam que o achado de positividade em pacientes não lúpicos deva-se

Recebido em 12/08/2011. Aprovado, após revisão, em 05/03/2012. Os autores declaram a inexistência de conflito de interesse. Comitê de Ética: 0974/03. Universidade Federal de São Paulo – Unifesp.

1. Doutor em Reumatologia, Universidade Federal de São Paulo – Unifesp; Professor-Assistente da Disciplina de Reumatologia, Unifesp
2. Mestre em Ciências, Unifesp; Biomédica do Laboratório de Imunorreumatologia Experimental da Disciplina de Reumatologia, Unifesp
3. Doutor em Pediatria e Ciências Aplicadas à Pediatria, Unifesp; Professora Adjunta da Disciplina de Reumatologia, Unifesp
4. Doutora em Reumatologia, Unifesp; Professora Titular da Disciplina de Reumatologia, Unifesp
5. Pós-Doutorado em Reumatologia, The Scripps Research Institute; Professor-Associado da Disciplina de Reumatologia, Unifesp

Correspondência para: Luis Eduardo Coelho Andrade. Universidade Federal de São Paulo – Unifesp. Departamento de Reumatologia. Rua Botucatu, 740 – Vila Clementino. CEP: 04023-900. São Paulo, SP, Brasil. E-mail: luis.andrade@unifesp.br

à heterogeneidade nas preparações NCS/cromatina e nos outros reagentes usados no teste ELISA (do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*).^{6,18–20}

Recentemente, diferentes grupos relataram a presença de anticorpos anti-NCS/cromatina em SAF primária (SAFP).^{9,21,22} Entretanto, a prevalência de anticorpos anti-NCS varia muito entre pacientes com SAFP (7%–77%). Isso pode estar relacionado a questões metodológicas na detecção de anticorpos anti-NCS/cromatina ou à inclusão de pacientes com síndrome lúpus-like. Descobriu-se que muitos dos pacientes com SAFP e positivos para anticorpos anti-NCS/cromatina desenvolviam LES subsequentemente.^{21,22} Portanto, ainda não está estabelecido se pacientes com SAFP e portadores de anticorpos anti-NCS/cromatina são de fato pacientes com LES incipiente. Assim, realizamos um estudo prospectivo e observacional para avaliar a frequência de anticorpos anti-NCS/cromatina em pacientes com SAFP e o desenvolvimento de LES definido ou de traços isolados de LES.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem, recrutamento e coleta de dados

Trinta e seis mulheres, atendendo aos critérios de Sapporo para SAFP,²³ foram submetidas à avaliação clínica para manifestações de SAF e outras doenças autoimunes. No início do estudo, colheu-se sangue periférico para a determinação dos anticorpos AACL, aCL, anti- β_2 GPI e anti-NCS/cromatina. As pacientes foram avaliadas prospectivamente por um tempo médio de $45,7 \pm 9,6$ meses (variação de 13–56), com especial atenção para evidências de doença sistêmica autoimune ou estabelecimento de LES, de acordo com os critérios atualizados do *American College of Rheumatology* para a classificação de LES.²⁴ Os critérios de exclusão na entrada no estudo foram presença de outra doença autoimune sistêmica que não a SAF, infecção crônica, malignidade e idade inferior a 18 anos. Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Informado aprovado pelo Comitê de Ética institucional.

Ensaio de anticorpos

Os anticorpos aCL foram detectados utilizando-se uma técnica ELISA padronizada *in-house*.²⁵ Resumidamente, placas de ELISA (NUNC – Thermo Fisher Scientific Inc, Roskilde, Dinamarca) foram recobertas com 50 μ L de cardiopina bovina (50 μ g/mL) (Sigma Aldrich Inc, St Louis, EUA) por uma noite a 4 °C. Após bloqueio com 100 μ L de soro bovino adulto a 10% (ABS) em solução salina tamponada com fosfato (solução de PBS), pH 7,4, por 2 horas em temperatura ambiente, 50 μ L

de soro de paciente diluído a 1:50 em 10% ABS em PBS foram adicionados para duplicar os poços e incubados por uma noite a 4 °C. As placas foram então lavadas três vezes com PBS, e os poços receberam alternadamente 50 μ L de conjugados de peroxidase anti-IgM ou anti-IgG (Calbiochem, La Jolla, CA, EUA) diluídos a 1:4.000 e 1:5.000 em PBS, respectivamente, sendo então incubados por 90 minutos em temperatura ambiente. Após mais duas lavagens, 50 μ L de p-nitrofenil fosfato dissódico em tampão dietanolamina (pH 9,8) foram adicionados aos poços.

A densidade óptica (DO) foi determinada por espectrofotometria com comprimento de onda de 450 nm a intervalos de 15 minutos até que a amostra padrão positiva atingisse uma DO entre 1.000 e 1.200. A curva de calibração foi baseada em padrões internacionais de AAF (Louisville APL Diagnostics Inc, Doraville, GA, EUA). Todas as amostras foram processadas em duplicata. Os resultados foram expressos em unidades GPL e MPL para aCL IgG e IgM, respectivamente, para os quais valores acima de 20 unidades GPL ou 20 unidades MPL foram considerados positivos. Os AACL foram detectados utilizando-se o tempo de tromboplastina parcial ativada (TPA – Diagnostica Stago, França) e o tempo do veneno de víbora de Russell diluído (dRVVT – Trinity Biotech, Wiclow, Irlanda, RU), de acordo com diretrizes internacionais.²⁶ Os anticorpos séricos anti- β_2 GPI IgG e IgM foram detectados por meio de ELISA (The Binding Site, Birmingham, RU), de acordo com as instruções do fabricante e com valores de ponto de corte de 10 U/mL para IgM e 20 U/mL para IgG.

Os anticorpos anti-NCS/cromatina foram detectados por meio de ELISA (INOVA Diagnostics, San Diego, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O anticorpo antinuclear (ANA) foi determinado por imunofluorescência indireta em células HEp-2 (Bion, Des Plaines, IL, EUA) em uma diluição de triagem de 1:80, de acordo com protocolo padrão.^{27,28} Os testes para anticorpo anti-DNA de dupla hélice (anti-dsDNA) foram realizados com imunofluorescência indireta usando-se *Crithidia luciliae* como substrato. Os anticorpos contra antígenos nucleares extraíveis (ENA) foram detectados por ensaio de imunodifusão radial, e incluíram anticorpos anti-SSA/Ro, anti-SSB/La, anti-Sm e anti-RNP. A técnica *Western blot* foi usada para detectar pelo menos uma banda de três fosfoproteínas ribossomais P0 (38 kD), P1 (19 kD) e P2 (17 kD).

Análise estatística

A análise estatística usou o programa SPSS 10.0 para Windows (Chicago, EUA). Os resultados foram expressos como número

inteiro e porcentagem para as variáveis categóricas, e como média e desvio padrão (DP) para as contínuas.

RESULTADOS

Características das pacientes com SAF

Trinta e seis mulheres com SAF e idade média de $38,4 \pm 11,8$ anos participaram deste estudo. Quinze (42%) eram de origem caucasiana, e 21 (58%) de origem africana. Episódios prévios de trombose arterial ocorreram em 13 (36,1%) pacientes, dos quais acidente vascular encefálico foi a manifestação mais frequente, observada em 11 (84,6%) pacientes. Episódios prévios de trombose venosa ocorreram em 17 (47,2%) pacientes, a maioria nos membros inferiores (13 pacientes, 76,4%). Dezesete pacientes (47,2%) apresentaram morbidade gestacional, que foi a única manifestação de SAF em seis delas (Tabela 1). Durante o seguimento, o anticorpo aCL foi observado em 31 (86,1%) pacientes: aCL IgG em 28 (77,8%) e aCL IgM em oito (22,2%) indivíduos. Onze pacientes (30,6%) tiveram teste positivo para AACL. Anticorpos anti- β_2 GPI foram detectados em oito (22,2%) pacientes: anti- β_2 GPI IgM em cinco (13,9%) e anti- β_2 GPI IgG em seis (16,7%) pacientes. A presença concomitante de três autoanticorpos associados à SAF (anticorpos aCL, AACL e anti- β_2 GPI) foi observada em seis (16,7%) pacientes (Tabela 1). O ANA foi detectado em 12 (33,3%) pacientes, e o padrão pontilhado fino foi o mais frequente, observado em titulações de 1/320 em oito pacientes. Outros padrões de ANA, tais como nuclear homogêneo (dois casos), nuclear envelope (um caso) e pontilhado citoplasmático discreto (um caso), também foram observados.

Anticorpos anti-NCS/cromatina e seguimento de pacientes com SAF

Os anticorpos anti-NCS/cromatina foram positivos em apenas uma paciente (2,8%) com SAF (Tabela 1), com valor de 147 UI/mL. É importante mencionar que o ponto de corte recomendado para o teste dos anticorpos anti-NCS/cromatina é 20 UI/mL, tendo sido estabelecido que valores acima de 60 UI/mL indicam reatividade fortemente positiva (Figura 1). Durante o período de seguimento ($45,7 \pm 9,6$ meses), aquela mesma paciente com reatividade para o teste anti-NCS/cromatina apresentou manifestações de LES, tais como linfopenia, poliartrite e envolvimento neurológico caracterizado por neurite óptica e lesões desmielinizantes da substância branca semelhantes a esclerose múltipla na ressonância magnética cerebral. Ela também apresentou um perfil de autoanticorpos compatível com

Tabela 1

Achados clínicos e perfil de autoanticorpos em pacientes com SAF

Variáveis	Pacientes
Trombose	30 (83,3%)
Manifestações venosas	17 (47,2%)
Membros inferiores	13
Embolismo pulmonar	3
Trombose venosa intracraniana	2
Membros superiores	1
Manifestações arteriais	13 (36,1%)
Acidente vascular encefálico	11
Oclusão periférica	3
Infarto do miocárdio	1
Morbidade gestacional	17 (47,2%)
Autoanticorpos relacionados à SAF	
AACL	11 (30,6%)
aCL IgG	28 (77,8%)
aCL IgM	8 (22,2%)
Anti- β_2 GPI	8 (22,2%)
Todos os três anticorpos antifosfolípidos	6 (16,7%)
Anticorpos antinucleossomo/cromatina	
Anticromatina	1 (2,8%)

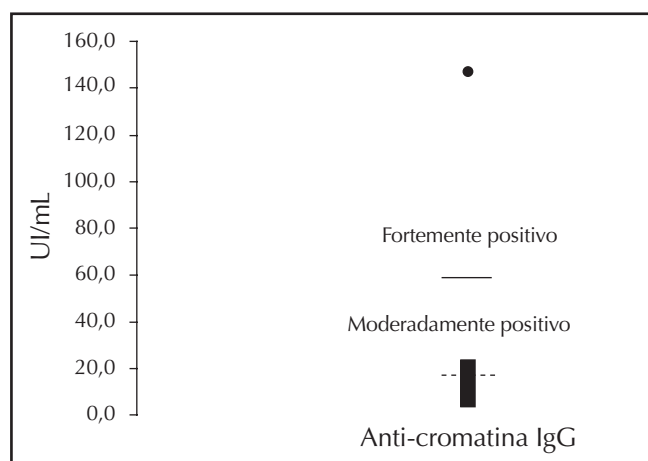


Figura 1

Magnitude da reatividade do anticorpo anti-NCS/cromatina IgG em pacientes com SAF. Níveis entre 20,0 UI/mL e 60,0 UI/mL são considerados moderadamente positivos, enquanto aqueles acima de 60 UI/mL são considerados fortemente positivos.

LES, incluindo positividade para ANA a 1:1280 (Hep-2 ANA) com padrão homogêneo, anti-dsDNA a 1/10, anti-SS-A/Ro e anti-P ribossomal. Essa paciente teve um teste não reagente para o anticorpo anti-aquaporin 4. Entre as pacientes que não reagiram aos anticorpos anti-NCS/cromatina, duas desenvolveram poliartrite tipo reumatoide e foram negativas para o fator reumatoide e anticorpo antipeptídeo citrulinado cíclico. Uma delas foi tratada com corticosteroides e metotrexato, e a

outra com metotrexato e leflunomida. Uma paciente morreu devido a infarto do miocárdio após um seguimento médio de 13 meses. Nenhuma outra paciente desenvolveu sintomas e sinais sugestivos de envolvimento sistêmico. Nenhuma outra paciente foi positiva para anti-dsDNA e ENA.

DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou baixa frequência de anticorpos contra componentes da cromatina na SAFP. De fato, apenas uma paciente (2,8%) apresentou positividade para o ensaio de anti-NCS/cromatina e desenvolveu LES. A maioria das pacientes com SAFP não desenvolveu sinais nem sintomas compatíveis com LES durante o seguimento médio de 45 meses. A única exceção, no entanto, uma paciente com positividade para o ensaio de anti-NCS/cromatina, apresentou linfopenia, poliartrite, neurite óptica, lesões desmielinizantes na substância branca sugestivas de esclerose múltipla e um perfil de anticorpos altamente sugestivo de LES.

A presença de anticorpos anti-NCS/cromatina em pacientes com SAFP tem sido motivo de controvérsia na literatura recente. Como os anticorpos anti-NCS/cromatina têm sido considerados altamente específicos para LES, a presença desses autoanticorpos em uma paciente com diagnóstico de SAFP pode indicar progressão da doença para LES. Um grupo de pesquisadores demonstrou que a prevalência de anticorpos anti-NCS/cromatina na SAFP é baixa,⁹ tendo outros grupos associado a presença desses anticorpos em pacientes com SAF ao subsequente desenvolvimento de características de LES.^{21,22} Embora o desenvolvimento de manifestações de SAF em pacientes lúpicos com anticorpos AAF tenha sido relatado em 50%–70% dos casos ao longo de 20 anos de seguimento,^{1,29} o oposto, em geral, não é esperado. Na verdade, um quadro completo de LES pode se desenvolver em 4%–10% dos pacientes com SAFP, com presença de história familiar de LES, fenômeno de Raynaud, enxaqueca, achados semelhantes a esclerose múltipla, anemia hemolítica, níveis baixos de C3 e C4 e teste de Coombs positivo sendo reconhecidos como fatores de risco.³⁰ Os achados atuais sugerem que os anticorpos anti-NCS/cromatina podem ser considerados um fator de risco adicional para o desenvolvimento de LES em pacientes com SAFP.

O substrato antigênico usado nos ensaios de anticorpos anti-NCS/cromatina é importante para a heterogeneidade dos resultados obtidos por diferentes autores. O ensaio comercial utilizado no presente estudo foi a cromatina sem H1 e sem as proteínas não histonas (principalmente oligonucleossomos) derivada do timo de bezerro. Trata-se de um antígeno largamente usado para ensaios de anti-NCS/cromatina, contendo

a maioria dos epítomos de nucleossomo reconhecidos pelos anticorpos anti-NCS policlonais e monoclonais.

A falta de padronização dos testes sorológicos é o problema principal para a determinação de autoanticorpos.³¹ Os antígenos atualmente utilizados para a determinação dos anticorpos anti-NCS/cromatina incluem cromatina sem H1, polinucleossomos sem H1 e mononucleossomos com ou sem H1. Além disso, há uma variação nas condições bioquímicas de purificação de antígenos e na fonte natural usada para a preparação de antígenos. Finalmente, as condições estabelecidas nos vários imunoenaios são heterogêneas. Toda essa heterogeneidade implica que os diferentes ensaios não detectam exatamente a mesma população de autoanticorpos, o que pode contribuir para os resultados parcialmente conflitantes observados na literatura.³²

O presente estudo mostrou uma baixa frequência de anticorpos anti-NCS/cromatina em pacientes com SAFP, e esses autoanticorpos podem estar associados ao desenvolvimento de características de LES naqueles pacientes. Estudos multicêntricos e longitudinais adicionais são necessários para confirmar tais achados.

AGRADECIMENTOS

A Silvia Helena Rodrigues por realizar os testes para ANA, e a Maria Teresa Costa por coletar as amostras de sangue de todos os participantes deste estudo.

REFERENCES

REFERÊNCIAS

- Levine JS, Branch DW, Rauch J. The antiphospholipid syndrome. *N Eng J Med* 2002; 346(10):752–63.
- Lim W, Crowther MA, Eikelboom JW. Management of the antiphospholipid antibody syndrome: a systematic review. *JAMA* 2006; 295(9):1050–7.
- 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.
- 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.
- Gómez-Puerta JA, Burlingame RW, Cervera R. Anti-chromatin (anti-nucleosome) antibodies: diagnostic and clinical value. *Autoimmun Rev* 2008; 7(8):606–11.
- Amoura Z, Koutouzov S, Chabre H, Cacoub P, Amoura I, Musset L et al. Presence of antinucleosome antibodies 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.
- Min DJ, Kim SJ, Park SH, Seo YI, Kang HJ, Kim WU et al. Antinucleosome antibody: significance in lupus patients lacking anti-double-stranded DNA antibody. *Clin Exp Rheumatol* 2002; 20(1):13–8.

8. Schett G, Smole J, Zimmermann C, Hiesberger H, Hoesler E, Fournel S *et al.* The autoimmune response to chromatin antigens in systemic lupus erythematosus: autoantibodies against histone H1 are highly specific marker of SLE associated with increased disease activity. *Lupus* 2002; 11(11):704–15.
9. 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.
10. 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.
11. Ghirardello A, Doria A, Zampieri S, Tarricone E, Tozzoli R, Villalta D *et al.* Antinucleosome antibodies in SLE: a two-year follow-up study of 101 patients. *J Autoimmun* 2004; 22(3):235–40.
12. Julkunen H, Salonen EM, Walle TK, Miettinen A. Anti-nucleosome antibodies in the diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* 2005; 34(2):122–4.
13. Su Y, Jia RL, Han L, Li ZG. Role of anti-nucleosome antibodies in the diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* 2007; 122(1):115–20.
14. Tikly M, Gould T, Wade AA, van der Westhuizen E, Mokgethwa BB. Clinical and serological correlates of antinucleosome antibodies in South Africans with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 2007; 26(12):2121–5.
15. 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.
16. 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.
17. Li L, Chen M, Huang DY, Nishioka M. Frequency and significance of antibodies to chromatin in autoimmune hepatitis type I. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15(10):1176–82.
18. 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.
19. Pereira LF, Marco FM, Boimorto R, Caturla A, Bustus A, De la Concha EG *et al.* Histones interact with anionic phospholipids with high avidity; its relevance for the binding of histone-antihistone immune complexes. *Clin Exp Immunol* 1994; 97(2):175–80.
20. Villalta D, Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Ghirardello A, Doria A. The relevance of autoantigen source and cutoff definition in antichromatin (nucleosome) antibody immunoassays. *Ann NY Acad Sci* 2005; 1050:176–84.
21. Andreoli L, Pregnotato F, Burlingame RW, Allegrì F, Rizzini S, Fanelli V *et al.* Antinucleosome antibodies in primary antiphospholipid syndrome: a hint at systemic autoimmunity? *J Autoimmun* 2008; 30(1–2):51–7.
22. Abraham Simón J, Rojas-Serrano J, Cabiedes J, Alcocer-Varela J. Antinucleosome antibodies may help predict development of systemic lupus erythematosus in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2004; 13(3):177–81.
23. Wilson AW, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC *et al.* International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report on an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999; 42(7):1309–11.
24. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40(9):1725.
25. Wong RC; Australasian aCL Working Party. Consensus guidelines for anticardiolipin antibody testing. *Thromb Res* 2004; 114(5–6):559–71.
26. Wisløff F, Jacobsen EM, Liestøl S. Laboratory diagnosis of the antiphospholipid syndrome. *Thromb Res* 2002; 108(5–6):263–71.
27. Friou FJ. Clinical Application of Lupus Serum-Nucleoprotein Reaction Using the Fluorescent Antibody Technique. *J Clin Invest* 1957; 36:890–2.
28. Holman HR, Kunkel HG. Affinity between the lupus erythematosus serum factor and cell nuclei and nucleoprotein. *Science* 1957; 126(3265):162–3.
29. Petri M. Epidemiology of the antiphospholipid antibody syndrome. *J Autoimmun* 15(2):145–51.
30. Shoenfeld Y, Meroni PL, Toubi E. Antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus: are they separate entities or just clinical presentations of the same scale? *Curr Opin Rheumatol* 2009; 21(5):495–500.
31. Chan EKL, Fritzler MJ, Wiik A, Andrade LE, Reeves WH, Tincani A *et al.* AutoAbSC.Org – Autoantibody Standardization Committee in 2006. *Autoimmun Rev* 2007; 6(8):577–80.
32. Muller S, Dieker J, Tincani A, Meroni PL. Pathogenic anti-nucleosome antibodies. *Lupus* 2008; 17(5):431–6.