

Caracterização dos padrões nucleares com placa metafásica cromossômica positiva

Lais Laura de Souza
Guilherme Guerra Ferreira
Wilson de Melo Cruvinel

Escola de Ciências Médicas e da Vida, Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC GOIÁS), Avenida Universitária 1.440, Setor Universitário, Goiânia, GO, 74605-010, Brasil.

Resumo

O teste de Imunofluorescência Indireta (IFI) em células HEp-2 é uma técnica laboratorial que detecta autoanticorpos em amostras de soro de pacientes suspeitos de doenças autoimunes. Recomendado por instituições médicas, como o Colégio Americano de Reumatologia, o teste fornece informações sobre a presença, padrões e títulos de autoanticorpos, ajudando na diferenciação entre indivíduos com e sem doenças autoimunes. Recentemente, uma atenção especial foi dada à caracterização e distinção dos padrões nucleares com placa metafásica cromossômica positiva, especificamente o AC-1, AC-2 e AC-29, devido às suas semelhanças morfológicas, mas associações a contextos clínicos distintos. O presente estudo contempla uma revisão narrativa conduzida em 2021 para analisar as características morfológicas, identidade imunológica e relevâncias clínicas desses padrões, visando auxiliar profissionais laboratoriais e clínicos na identificação e interpretação prática desses padrões. O documento final será submetido a um periódico especializado em formato de artigo científico.

Palavras-chave: Autoanticorpos, Células HEp-2, Anticorpos antinúcleo, Imunofluorescência indireta

Lista de Abreviaturas:

AC, Anti-cell antibody
BAC, Brazilian anti-cell autoantibodies
CBA, Consenso Brasileiro de Autoanticorpos / **BCA**: Brazilian Consensus on ANA
cDNA, complementary Deoxyribonucleic acid
DFS, Dense Fine Speckled
dsDNA, double stranded Deoxyribonucleic acid
ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ENA, Extractable Nuclear Antigens
ES, Esclerose sistêmica
FAN, Fator antinuclear
HEp-2, Human epithelial type 2
ICAP, International Consensus on Ana Patterns
IFI, Imunofluorescência Indireta
LEDGF, Lens Epithelium derived Growth fator
LES, Lúpus Eritematoso Sistêmico
NOR, Nucleolus organizer regions
SARD, Systemic autoimmune rheumatic diseases
Topo-I, DNA topoisomerase-I

*Correspondencia: melocruvinel@gmail.com

School of Medical and Life Sciences, Escola de Ciências Médicas e da Vida,
Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC GOIÁS), Avenida Universitária 1.440, Setor
Universitário, Goiânia, GO 74605-010, Brazil

Wilson de Melo Cruvinel
melocruvinel@gmail.com

Introdução

O Teste de Imunofluorescência indireta em células HEp-2 (IFI HEp-2) é uma técnica laboratorial na qual autoanticorpos específicos presentes em fluidos biológicos são imobilizados no substrato celular e, posteriormente, detectados por anticorpos secundários marcados com fluorocromos. Para esta pesquisa utilizam-se as células derivadas de carcinoma de laringe humano, linhagem tumoral conhecida como células HEp-2 (**DELLAVANCE et al, 2009**). Essa metodologia, conhecida como “Pesquisa de Anticorpo Anticélula - FAN”, é considerada o padrão ouro para detecção de autoanticorpos em doenças reumáticas sistêmicas, permitindo triar um grande número de autoanticorpos relevantes na prática clínica (**MERONI et al, 2010; CRUVINEL et al, 2022**). O teste fornece três informações muito importantes: a presença ou ausência de autoanticorpos na amostra, o título dos anticorpos e o padrão de imunofluorescência. O resultado auxilia na diferenciação de indivíduos não-autoimunes dos pacientes com provável enfermidade autoimune, além de direcionar a pesquisa dos autoanticorpos específicos mais prováveis, orientando a investigação médica (**DELLAVANCE et al, 2003; SATOH et al, 2007; SACK et al, 2009; WIJK et al, 2010; MARIZ et al, 2011**).

Dada a relevância desse teste no diagnóstico em autoimunidade, no ano de 2015 foi realizada a primeira reunião do *International Consensus on Ana Patterns* - (ICAP) (**CHAN et al, 2015**). Desde então o objetivo do ICAP tem sido promover mundialmente a harmonização da IFI HEp-2, além de otimizar a utilização dos resultados pelos clínicos no diagnóstico de enfermidades autoimunes, fornecendo diretrizes tanto para a realização do teste quanto para a interpretação dos resultados (**DAMOISEAUX et al, 2019**). A base conceitual do algoritmo do ICAP foi elaborada por uma equipe de especialistas internacionais tendo como referência a plataforma desenvolvida pelo Consenso Brasileiro iniciado no ano de 2000 (**FRANCESANTONIO et al, 2014**).

O ICAP reconhece 30 padrões diferentes de IFI HEp-2 categorizados em 4 grupos principais: padrões negativos ($n=1$), nucleares ($n=15$), citoplasmáticos ($n=9$) e mitóticos ($n=5$) (**CHAN et al, 2015**). A nomenclatura de consenso está organizada em uma árvore de classificação que é exibida no site permanente do ICAP (www.ANApatterns.org). O CBA HEp-2 tem trabalhado ao longo dos últimos anos em um contínuo processo de harmonização com as diretrizes do ICAP, embora tenha também foco em aspectos específicos da realidade brasileira não contemplados pelo ICAP e cujo processo de padronização advém de mais de 20 anos de discussões (**CRUVINEL et al, 2022**). Para cada padrão é prevista a atribuição de um código AC alfanumérico (anticélula). O padrão nuclear homogêneo, por exemplo, é designado AC-1 e na página oficial do consenso são apresentadas imagens representativas, bem como outras informações importantes como a designação recomendada, sinônimos, a descrição das

principais características morfológicas dos padrões, as possíveis especificidades antigênicas e a relevância clínica (**DAMOISEAUX et al, 2019**).

Segundo levantamento de Santos e colaboradores (2022) em um laboratório clínico brasileiro os padrões nucleares representaram mais de 70% das amostras positivas na IFI HEp-2. Entre os padrões nucleares, AC-1 e AC-2 estão entre os mais frequentes, com relato superior a 28% (**SANTOS et al., 2022**).

No ano de 2021 houve uma atualização na árvore do ICAP com o propósito de chamar a atenção para as similaridades morfológicas entre os padrões AC-1, AC-2 e AC-29 e, por este motivo, eles foram agrupados na árvore de classificação do consenso internacional (www.anapaterns.org) como um grupo. Deste modo, considerando-se a complexidade morfológica desses três padrões que por vezes podem ser confundidos, bem como suas distintas relevâncias clínicas que representam entidades clínicas e percursos totalmente distintos, a presente revisão teve como objetivo revisar as principais características, peculiaridades e correlações clínicas dos 3 padrões: nuclear homogêneo (AC-1), nuclear pontilhado fino denso (AC-2) e DNA topoisomerase I (AC-29).

Padrão AC-1 - Nuclear Homogêneo

O padrão AC-1 está associado a mais de um autoanticorpo direcionado contra às estruturas da cromatina, como DNA de dupla hélice (dsDNA), as histonas e os nucleossomos (**CHAN et al, 2015**). A cromatina consiste no complexo nativo de histonas e DNA encontrado no núcleo celular dos eucariotos, sendo composta por aproximadamente 40% de DNA, 40% de histonas e 20% de proteínas não histonas, RNA e outras macromoléculas (**GOMEZ-PUERTA et al, 2008**). Trataremos a seguir do detalhamento destes três alvos antigênicos relacionados ao padrão AC-1.

ANTI-dsDNA

Os anticorpos que se ligam aos ácidos nucleicos são definidos com anti-dsDNA ou anti-DNA nativo (**REKVIK, 2019**). Incluem anticorpos com um amplo espectro de especificidades moleculares finas que são produzidos persistentemente no contexto da verdadeira autoimunidade (**REKVIK, 2019**). São capazes de reconhecer múltiplas estruturas do DNA, podendo se ligar a um complexo de dsDNA nativo ou DNA modificado que contém um dímero de timina, de forma que o dsDNA modificado quimicamente resulta em maior afinidade por autoanticorpos, formando complexos mais estáveis (**AKBEROVA et al, 2017**).

Os anticorpos anti-dsDNA podem ser de diferentes isotipos com especificidades e significados diferentes, com elevada heterogeneidade e capacidade de reação cruzada, além de serem fortemente relacionados à imunopatogenia do LES (**EHRENSTEIN et al., 1995; SCHIFFER et al, 2002**). Os autoanticorpos da classe IgG podem ser vistos predominante em pacientes com LES, participando da patogênese da glomerulonefrite, especialmente os anticorpos IgG de alta avidéz (**VILLALTA et al, 2013**). Em contraste, os Anti-dsDNA da classe IgM são considerados menos específicos para o LES sendo que sua relevância patológica ainda não foi totalmente elucidada, porém, foi relatada relação inversa com o envolvimento renal, o que pode ser justificado por sua capacidade de se ligar a um número maior de autoantígenos e, assim, por inibição competitiva, reduzir a formação de imunocomplexos (**VILLALTA et al, 2013; KEISERMAN et al., 2013**). Os anticorpos da classe IgA parecem ter maior relação com anormalidades renais e articulares na doença em atividade. Sendo assim, a detecção de anticorpos anti-dsDNA das classes IgG e IgA possuem maior associação com a atividade do LES (**VILLALTA et al, 2013**).

A participação desses autoanticorpos na inflamação e nas lesões teciduais ainda não está totalmente elucidada (**ISENBERG et al, 2007**). Do ponto de vista fisiopatológico estão relacionados à formação de complexos imunes com o dsDNA, com subsequente fixação nos glomérulos ou ainda a ligação direta dos autoanticorpos em estruturas glomerulares. Tal fato induz lesões com classificações histopatológicas distintas e diferentes graus de nefrite (**WINFIELD et al., 1977; SCHWARTZ et al., 2008; YU et al., 2010; NOWLING & GILKESON, 2011; YUNG et al., 2010, 2012**). Outro aspecto é a natureza nefritogênica de alguns anticorpos anti-dsDNA em decorrência da presença de resíduos de arginina, asparagina e lisina nos sítios combinatórios o que confere potencial nefritogênico (**RADIC & WEIGERT, 1994**). Destaca-se ainda a possível influência do recrutamento de células inflamatórias por meio dos receptores Fc de IgG, bem como a ativação do sistema complemento, elementos relevantes no mecanismo de lesão tecidual (**ISENBERG et al, 2007**).

O padrão nuclear homogêneo (AC-1) caracteriza-se por fluorescência de coloração regular, homogênea e difusa em todo o nucleoplasma da célula HEp-2. As regiões dos nucléolos geralmente se apresentam coradas, mas podem também não se corar, a depender do substrato celular (**CHAN et al, 2015**). Nas células em intérfase, em soros com títulos mais elevados, pode ocorrer uma coloração mais acentuada nas bordas externas do núcleo. Nas células mitóticas (metáfase) observa-se a massa de cromatina intensamente corada também de maneira homogênea, com aparência nitidamente hialina ou difusa. O citoplasma se apresenta tipicamente negativo (sem coloração) tanto na intérfase, quanto nas células em mitose (**CHAN et al, 2015**).

Um teste de FAN com positividade para o padrão AC-1 é fortemente sugestivo da presença de anticorpos anti-dsDNA. Na prática, os ensaios que identificam esse autoanticorpo são baseados no princípio da formação de complexos imunes entre os anticorpos anti-DNA e a molécula de DNA, diferenciando entre si pela metodologia e condições do ensaio. Diferentes metodologias podem ser utilizadas. Dentre estas destacam-se o imunoensaio de Farr com isótopos radioativos, a imunofluorescência indireta (IFI) com o protozoário *Crithidia luciliae*, o Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) e os ensaios multiplex (**PISETSKY, 2016**). Estudos comparativos demonstraram que os autoanticorpos de baixa avidéz são detectados principalmente por ELISA bem como fixação de complemento e hemaglutinação, enquanto os anticorpos de alta avidéz são preferencialmente detectados pelo ensaio de Farr e por IFI (**SMEENK, 2002; RIBOLDI et al, 2005**). De modo geral, bons valores preditivos são alcançados a partir da utilização das metodologias de radioimunoensaio e IFI (**EDNER, 2000; ISENBERG et al, 2004; SMEENK, 2002; HAUGBRO et al., 2004**). Da mesma forma, a técnica de ELISA de alta avidéz tem fornecido informações confiáveis das possíveis correlações clínicas desse marcador (**SUH-LAILAM et al., 2011**).

Em relação às relevâncias clínicas, o anti-dsDNA representa um excelente parâmetro de monitoramento do LES com seus níveis aumentados durante as exacerbações da enfermidade, especialmente na nefrite lúpica e diminuindo os níveis em resposta ao tratamento (**REKVIK, 2019**). Deste modo, diante de um padrão AC-1 em caso de suspeita de LES, recomenda-se a realização de um teste confirmatório da presença de anticorpos anti-dsDNA, o qual constitui um potente parâmetro para classificar e diagnosticar o LES, especialmente pacientes com a forma renal da enfermidade (**REKVIK, 2019**).

ANTI--HISTONAS

O padrão AC-1 pode ainda estar relacionado à presença de anticorpos anti-histona que são subunidades proteicas estruturais que fornecem um núcleo no qual a cromatina é enovelada permitindo a organização da cromatina. O núcleo de histonas é composto por dois dímeros H2A-H2B e um tetrâmero (H3-H4), formando um octâmero de histonas com uma histona H1 externa, sendo esta última uma subunidade conservada que auxilia na estabilidade da estrutura (**BURLINGAME, 1997**). O octâmero de histonas, acoplado a cerca de 150 pares de bases de DNA, é conhecido como nucleossomo e forma a unidade fundamental básica da cromatina (**MCGINTY et al, 2015**). As histonas não apenas formam suporte para a cromatina, mas também desempenham um papel relevante e complexo na regulação da expressão gênica (**PRADO et al, 2017**) sendo codificadas por múltiplos genes que abrangem

vários cromossomos, incluindo os cromossomos 6, 11 e 12 em humanos (**MARZLUFF et al, 2002**).

Embora os anticorpos anti-histonas possam ser de qualquer isótipo, IgG é considerado o mais frequente e clinicamente o mais relevante. Os anticorpos anti-histonas da classe IgM são menos específicos e podem ser encontrados em outros distúrbios, como na artrite reumatoide e na doença mista do tecido conjuntivo (**CORNETT et al. 2017**).

Do ponto de vista da patogenicidade, a atividade dos anticorpos anti-histonas é desconhecida. Estudos sugerem mecanismos potenciais que associam modificações pós-traducionais das histonas com aumento da imunogenicidade e subsequente indução da autoimunidade (**LIU et al, 2012**).

Os anticorpos anti-histonas podem reconhecer as histonas totais ou subunidades de histonas, sendo possível observá-los por imunofluorescência indireta no substrato HEP-2 com o padrão AC-1 (nuclear homogêneo) conforme previamente descrito (**KUBO et al, 1999**). Os anticorpos anti-histonas podem ser detectados nos ensaios de quimioluminescência, que possuem vários métodos de apresentação de antígenos e detecção de anticorpos secundários, que tem como vantagem viabilizar a detecção de moléculas de histonas inteiras ou subunidades (**VORDENBÄUMEN et al, 2018**). A técnica de *Western blotting* tem sido utilizada para detectar tradicionalmente autoanticorpos contra subunidades de histonas. Nesse caso a eletroforese em gel de poliácridamida é usada para separar as histonas em seus constituintes com base nos pesos moleculares, sendo que H1 tem cerca de 23 kDa, enquanto as histonas centrais (H2A, H2B, H3 e H4) variam entre 10 a 15 kDa. A detecção de autoanticorpos contra essas frações utilizando anticorpos secundários específicos para IgG, IgA ou IgM pode também ser realizada (**LUZHETSKAYA et al, 2020**).

No âmbito das relevâncias clínicas desse achado, os anticorpos anti-histonas representam um subconjunto clinicamente importante. Eles podem ser direcionados contra histonas livres ou histonas ligadas ao DNA (**LEE et al., 2014; KRIPPNER, 1984**) e, embora classicamente atribuídos ao LES e ao lúpus eritematoso induzido por drogas, são encontrados também em outras doenças, incluindo a doença de Sjögren, as miosites inflamatórias e a artrite reumatóide (**KRIPPNER et al., 1984; ZIRWAS et al., 2004**).

ANTI NUCLEOSSOMAS

Os antinucleossomos consistem em uma grande família de autoanticorpos direcionados contra epítomos das histonas expostos na cromatina, contra o dsDNA e contra a conformação de epítomos gerada a partir da interação entre dsDNA e histonas centrais (**BIZZARO et al., 2012**). A presença de autoanticorpos capazes de se ligar ao nucleossomo intacto, mas não aos seus componentes individuais (dsDNA e histonas), foi descrita no final da década de 1980

(**BIZZARO et al., 2012**).

Os nucleossomos são gerados durante a apoptose celular pela clivagem da cromatina realizada por endonucleases (**FLORA et al, 1994**). Tais componentes podem se tornar imunogênicos durante a apoptose quando os detritos celulares contendo cromatina não são eliminados adequadamente (**DÜZGÜN et al, 2007**). Há evidências crescentes de que, como resultado da depuração fagocítica de detritos nucleares apoptóticos deficiente, os nucleossomos ligados à superfície das células brancas e os polinucleossomos circulantes encontram-se aumentados no LES, o que, por sua vez, estimula e favorece a produção de autoanticorpos (**AMOURA et al, 2000**).

Os níveis séricos dos isotipos IgG, IgA e IgM dos anticorpos antinucleossomos podem ser utilizados para estimar a inflamação, a resposta ao tratamento e são considerados marcadores para monitorar a progressão do LES. Em especial o subtipo IgG 3 é visto como principal subclasse de antinucleossomo detectado em pacientes com LES ativo e envolvimento renal grave. Além disso, o isotipo IgM pode apresentar uma correlação significativa com envolvimento cutâneo em pacientes com LES, de forma que se especula que esse isotipo tenha alta afinidade por antígenos produzidos pela pele (**ZENG et al, 2022**).

Várias tecnologias vêm sendo utilizadas para mensurar os anticorpos antinucleossomos, iniciando-se com o teste da célula LE atualmente em desuso, à metodologias de imunoprecipitação e o ELISA (**BURLINGAME, 1997**).

Do ponto de vista da relevância clínica, os anticorpos antinucleossomos demonstram ser um bom marcador diagnóstico para o LES representando o primeiro marcador sorológico descrito em associação com a doença, especialmente no desenvolvimento da nefrite, uma das principais complicações do LES renal (**BIZZARO, et al., 2012**). Além disso, esses autoanticorpos podem ser úteis no diagnóstico do lúpus induzido por drogas e da hepatite autoimune (**GOMEZ-PUERTA et al, 2006**).

Padrão AC-29 DNA Topoisomerase-I

O padrão AC-29 é altamente sugestivo de reatividade contra a enzima DNA topoisomerase-I (topo-I), proteína de 765 aminoácidos (91 kDa) localizada no núcleo celular devido à existência de um sinal de localização nuclear funcional no domínio N-terminal da enzima. Tanto a topo-I quanto a topo-II são enzimas envolvidas no relaxamento da hélice do DNA à medida que ele se desenrola para replicação e transcrição do RNA (**MO et al, 2000**; **CHAMPOUX, 2001**).

Em humanos, seis enzimas topoisomerases distintas foram identificadas: topoisomerase I (topo I), topoisomerase II com duas isoformas (topo II α e topo II β),

topoisomerase III com duas isoformas (topo III α e topo III β) e topoisomerase I mitocondrial (**CHAMPOUX, 2001**). Vários epítomos são reconhecidos por autoanticorpos anti-topo I sendo que os aminoácidos do epítomo 489-573, em particular, demonstraram ser um sítio imunodominante (**KUWANA et al, 1999**). Os anticorpos anti-topo I da classe IgG são os mais frequentemente detectados, se comparado aos isotipos IgA e IgM (**HILDEBRANDT et al, 1990**).

A imunopatogenicidade dos anticorpos anti-topo-I não está totalmente esclarecida permanecendo dúvida se tais autoanticorpos podem levar à ativação do sistema imunológico favorecendo a lesão vascular, inflamação e fibrose (**CZÖMPÖLY et al, 2009**). Um estudo descreveu a presença de anticorpos anti-topo-I ligados à superfície de fibroblastos estimulando a adesão e ativação de monócitos *in vitro* (**HENAUULT et al, 2006**). Entretanto, o local preciso de ligação dos autoanticorpos na superfície dos fibroblastos não foi identificado e verificou-se que o anti-topo I se liga tanto aos fibroblastos normais quanto nos derivados da Esclerose Sistêmica (ES) - (**HENAUULT et al, 2006**).

Em 1979 o Dr. Eng M. Tan e colaboradores descreveram em pacientes com ES a presença de autoanticorpos que reconheciam um antígeno nuclear de 70kDa, denominado Scl-70 (**DOUVAS, A. S.; ACHTEN, M.; TAN, E. M, 1979**). Posteriormente, nos estudos de van Venrooij e colaboradores e Guldner e colaboradores (1985 e 1986 respectivamente), foi demonstrado que esse autoantígeno correspondia a um fragmento de 100kDa da enzima Topo I (**VAN VENROOIJ et al, 1985; GULDNER et al, 1986**). Dada a relevância clínica da presença de anticorpos anti-topo I, que são marcadores altamente específicos da ES, especialmente a forma cutânea difusa (**SHERO te al, 1986**), em 2009 Dellavance e colaboradores redefiniram as características do padrão de fluorescências relacionado a esse autoanticorpo. No estudo, foi destacado que o padrão se caracteriza pela reatividade na célula HEP-2 de 5 regiões celulares distintas (núcleo, nucléolo, citoplasma nas células em intérfase, região organizadora do nucléolo (NOR) e cromossomos mitóticos (**DELLAVANCE et al, 2009**). Em 2018 o ICAP atribuiu o código de classificação de padrões de autoanticorpos em células HEP-2 de número 29 (AC-29) para o padrão com essa identidade imunológica (**ANDRADE et al, 2018**).

O AC-29 apresenta uma associação antigênica com o DNA topoisomerase I e é altamente específico para ES, em particular com ES cutânea difusa e formas mais agressivas de ES (**ANDRADE et. al., 2018**). As amostras positivas apresentam um padrão que é definido pela presença de até 5 elementos morfológicos: (1) fluorescência nuclear pontilhada fina, compacta e proeminente nos núcleos das células em interfase; (2) coloração consistente e forte da cromatina condensada nas células mitóticas e, dependendo da diluição de soro utilizada, a coloração da cromatina mitótica pode parecer homogênea; (3) forte coloração das regiões organizadoras do nucléolo associada à cromossomos condensados em células mitóticas. Essa coloração das NOR podem ser obscurecidas pela coloração cromossômica brilhante, pois as NOR nem sempre estão no mesmo plano focal da cromatina; (4) fluorescência citoplasmática

delicada e fraca em forma de teia irradiando da área perinuclear para a vizinhança da membrana plasmática. Em geral a coloração citoplasmática torna-se mais proeminente durante a titulação da amostra para diluições mais altas; e finalmente (5) fluorescência inconsistente dos nucléolos de aspectos variados. Devido a quantidade de elementos e a variação da análise conforme a marca da lâmina HEp-2, esse padrão é considerado de difícil identificação e recomenda-se análise detalhada com atenção aos diferentes planos focais para concluir uma boa visualização do padrão. Por esse motivo o padrão é classificado no nível expert do ICAP e do Consenso Brasileiro (**CHAN et al., 2015; ANDRADE et al., 2018; CRUVINEL et al., 2022**).

Os anticorpos anti topo-I podem ser confirmados pelo método de ELISA, imunodifusão e *immunoblotting*. O ELISA ou métodos similares são utilizados como uma alternativa em laboratórios que realizam testes em alta demanda (**DE ALMEIDA BRITO et al, 2016**).

Os autoanticorpos anti topo-I estão presentes em 20-30% dos pacientes com ES e estão preferencialmente associados ao envolvimento cutâneo difuso e fibrose intersticial pulmonar, sugerindo um curso mais agressivo para a enfermidade (**GABRIELLI et al, 2009**). Além disso, o anti topo-I apresenta associação com uma maior probabilidade de dano vascular renal, crise renal, gastrointestinal grave e fibrose cardíaca (**HO et al, 2003**).

Padrão AC-2 Padrão nuclear pontilhado fino denso

O padrão AC-2 é produzido por autoanticorpos que reconhecem uma proteína associada à cromatina de 70kD designada DFS70. Embora a descrição inicial do padrão tenha sido publicada em 1994 pelo grupo do doutor Eng Tan (**OCHS et al, 1994**), somente no final da década de 1990 os autoanticorpos responsáveis pelo padrão foram caracterizados a partir das descrições iniciais da estrutura e função do antígeno alvo (**OCHS et al, 2000**). Subsequentemente, Ochs e colaboradores utilizaram autoanticorpos séricos provenientes de amostras do padrão DFS de pacientes com dermatite atópica, definindo-os como *Dense Fine Speckled* (pontilhado denso fino) 70 (DFS70) com base no padrão de fluorescência nuclear e na migração em torno da região de 70kD na reação de *immunoblot* (**OCHS et al, 2000**). Eles também observaram que toda a sequência DFS70 (aminoácidos de 1 - 530) correspondem ao coativador de transcrição p75, enquanto sua região amino-terminal (aminoácidos de 1 - 326) correspondem a uma variante de *splicing* curto dessa proteína, chamada p52, que não é reconhecido pelos autoanticorpos (**GE et al, 1998a; OCHS et al, 2000**). Tais coativadores integram o complexo RNA polimerase II, tendo participação no processo de transcrição celular (**GE et al, 1998a**).

Trabalhando de forma independente, Shinohara e colaboradores utilizaram autoanticorpos de um paciente com catarata relacionada à idade para isolar um clone de cDNA

de célula epitelial do cristalino humano (LEC) que codifica uma proteína idêntica ao coativador de transcrição p75 (**SINGH et al, 1999**). Devido aos efeitos protetores, secreção aparente em células cultivadas na presença de estresse e homologia significativa com membros da família do fator de crescimento derivado de hepatoma (HDGF), a proteína foi considerada um fator de crescimento para células epiteliais do cristalino, o que gerou a designação LEDGF/p75 (**SINGH et al, 1999; SHINOHARA et al, 2000**). Sendo assim, essa proteína é também conhecida como fator de crescimento derivado do epitélio da lente (LEDGF), coativador de transcrição p75 e proteína 1 de interação entre o coativador de transcrição PC4 e o fator de *splicing* SRSF1 (PSIP1) (**GE et al 1998b; OCHS et al, 2016**).

Atuando como um centro para interações proteína-proteína no núcleo, o DFS70/LEDGFp75 facilita a agregação de fatores de transcrição, remodeladores de cromatina e outros reguladores aos complexos de transcrição da RNA polimerase II (RNAPII) em sítios de cromatina ativos (**TESINA et al, 2015**). O DFS70/LEDGFp75 é regulado positivamente em resposta a estressores ambientais associados ao aumento do estresse oxidativo, incluindo drogas quimioterápicas, privação de nutrientes, radiação, infecções pelo vírus do papiloma humano (HPV) e citocinas inflamatórias (**LUNDGREN et al, 2021**).

A reatividade imunológica contra o DFS70/LEDGF é consistente com a noção de que os autoanticorpos têm como alvo domínios estruturais conservados e funcionalmente importantes (**TAN et al, 1997**). A estrutura intrinsecamente desordenada do DFS70/LEDGF, suas interações com múltiplas proteínas e a geração durante a apoptose de fragmentos de clivagem dessa proteína, podem tornar esse componente mais propenso a se tornar o alvo da resposta imune humoral em indivíduos geneticamente susceptíveis. Essa resposta pode ser amplificada na presença de fatores ambientais ou fisiológicos específicos, ou condições inflamatórias, que podem aumentar a expressão de DFS70/LEDGF em tecidos específicos. Nesse contexto, sugerem-se vários fatores potencializadores do estresse oxidativo celular incluindo transformação maligna, infecção pelo HPV, sinalização aumentada de receptores de andrógenos e glicocorticóides (**ORTIZ-HERNANDEZ et al, 2020**).

Segundo a descrição do ICAP o padrão pontilhado fino denso caracteriza-se por fluorescência pontilhada granular não uniforme distribuída ao longo do núcleo interfásico com heterogeneidade característica no tamanho, brilho e distribuição dos pontos. Ao longo do núcleo interfásico, existem algumas áreas mais densas e mais escassas de coloração. A placa metafásica apresenta forte padrão pontilhado com alguns pontilhados grosseiros se destacando (**CHAN et al., 2015**).

Os anticorpos anti-DFS70/LEDGF são principalmente da classe IgG, embora anticorpos da classe IgE tenham sido detectados em algumas doenças atópicas que têm como alvo uma região conservada no domínio DFS70 C-terminal e podem ser detectados em títulos moderados

a altos com frequência variável nas rotinas (**OCHS et al, 2000; FITCH-ROGALSKY et al, 2014; CARBONE et al, 2019**).

Os estudos iniciais desse marcador foram baseados principalmente no teste de IFI em células HEp-2 para a detecção desses autoanticorpos, com poucos estudos inicialmente que confirmavam sua presença. No entanto, uma infinidade de novos ensaios para a detecção desses autoanticorpos foi desenvolvida nos últimos anos, fornecendo excelentes plataformas para a confirmação de sua presença no soro com alta especificidade e sensibilidade. Esses ensaios incluem imunoabsorção de soro contra a proteína recombinante DFS70/LEDGF, lâminas IFI HEp-2 nas quais a maioria das células foi depletada de DFS70/LEDGF; imunoensaio de quimioluminescência (CIA), ELISA contendo DFS70/LEDGF recombinante, imunoensaios de linha incluindo autoantígenos recombinantes e ensaios de *dot blot* (**ORTIZ-HERNANDEZ et al, 2020**).

Apesar do relato inicial de ocorrência do padrão AC-2 em algumas doenças inflamatórias, como doenças atópicas e oculares (**OCHS et al, 1994; OCHS et al, 2000; SINGH et al, 1999**), sabe-se que o anticorpo anti-DFS70 ocorre comumente em soros de pacientes fora do contexto de doença reumática autoimune sistêmica e até mesmo em indivíduos saudáveis (**MARIZ et al., 2011**). Alguns estudos demonstraram que, na ausência de autoanticorpos comuns contra os antígenos nucleares extraíveis (anti-DNA), os autoanticorpos anti-DFS70 raramente tem relação com SARD (doenças reumáticas autoimunes sistêmicas) (**FITCH-ROGALSKY et al., 2014; MURO et al., 2008; INFANTINO et al., 2019a**). Portanto, anticorpos anti-DFS70 mono-específicos, caracterizados imunologicamente e, na ausência de anticorpos anti-DNA comuns, excluem SARD (**DAMOISEAUX et al., 2019**). Deste modo, a identificação precisa do padrão AC-2 produzido por autoanticorpos para DFS70/LEDGFp75 é crucial para seu uso clínico como potenciais biomarcadores para auxiliar na exclusão de SARD (**SANCHEZ-HERNANDEZ et al., 2023**). Todavia, tanto indivíduos aparentemente saudáveis quanto pacientes que não têm SARD, o padrão morfológico AC-2 pode ser causado por autoanticorpos para outros antígenos além do DFS70 (**OCHS et al., 2016**).

Considerações finais

Os consensos Nacional e Internacional de autoanticorpos em células HEp-2 buscam promover uma harmonização da nomenclatura dos padrões fornecendo diretrizes para a realização do teste, caracterização dos padrões e interpretação dos resultados (**FRANCESANTONIO et al, 2014, CRUVINEL et al., 2022, CHAN et al., 2015, VON MUHLEN et al, 2021**). Uma preocupação recente do Consenso Internacional foi em relação à diferenciação entre os padrões AC-1, AC-2 e AC-29, que possuem semelhanças no âmbito morfológico estando sujeitos a serem confundidos. Na última atualização da árvore de

classificação do ICAP, os 3 padrões foram reorganizados em um grupo, de modo a destacar e chamar a atenção dos usuários para suas semelhanças (**ICAP, 2021**) sobretudo considerando-se que a adequada interpretação dos mesmos leva à contextos clínicos totalmente distintos (**DAMOISEAUX et al, 2019**).

As informações aqui revisadas confirmam a complexidade e limites na discriminação dos três padrões, demonstrando que o analista necessita investir em treinamento e adotar parâmetros técnicos que o subsidiem na caracterização dos padrões e na definição dos títulos. Nesse contexto, um aspecto relevante é a adoção dos parâmetros de controle de qualidade na IFI HEp-2 e a utilização de soros de referência que dão suporte na caracterização dos padrões nas diferentes marcas de substratos utilizados no laboratório (**FRANCESANTONIO et al, 2014, CRUVINEL et al., 2022**).

Outro aspecto relevante aqui abordado foi a ratificação de que a pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2 é um teste de triagem e, em caso de identificação de padrões com relevância clínica, deve-se proceder a investigação da identidade imunológica do autoanticorpo por testes complementares. Por exemplo, a associação negativa do padrão AC-2 com doença autoimune reumática sistêmica só é válida se for confirmada a ausência de reatividade direcionada contra DFS70 (LEDGF/p75) e se nenhum outro ENA comum for reconhecido (**WATANABE et al., 2004; MAHLER et al., 2012**). O mesmo aplica-se aos achados do padrão AC-1, nuclear homogêneo, cuja relevância clínica está atrelada ao encontro de reatividade contra ds-DNA, histonas ou nucleossomas (**DAMOISEAUX et al., 2019**).

Considerando-se a comprovada identidade imunológica dos padrões nucleares com placa positiva (AC-1, AC-29 e AC-2), é vantajoso para o clínico a discriminação dos padrões no âmbito laboratorial, o que agrega informações para o diagnóstico da enfermidade e adianta a investigação clínica. Contudo, existem situações em que a distinção não será possível por vários fatores como por exemplo a concentração do autoanticorpo na amostra, a expertise do analista em nível competente, peculiaridades e limites do substrato na caracterização dos padrões entre outras situações. Nesses casos é altamente recomendado que o laboratório adote a caracterização mais genérica do padrão e o clínico, por sua vez, dará continuidade à investigação por meio dos métodos complementares de caracterização de autoanticorpos específicos.

Outro desafio expressivo para o laboratório clínico são os padrões nucleares com placa positiva não clássicos que se enquadram no mesmo grupo, como o padrão *Quasi*-homogêneo (BAC-3) e o PF com placa e cuja prevalência é não pode ser desconsiderada. É altamente recomendado que os laboratórios clínicos acompanhem os avanços na compreensão desses marcadores no âmbito da identificação e interpretação dos padrões e invistam continuamente em programas de educação continuada.

Referências

AKBEROVA, N. I. et al. An anti-DNA antibody prefers damaged dsDNA over native. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, v. 35, n. 1, p. 219-232, 2017.

AMOURA, Zahir 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 & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, v. 43, n. 1, p. 76-84, 2000.

ANDRADE, Luis EC et al. International consensus on antinuclear antibody patterns: definition of the AC-29 pattern associated with antibodies to DNA topoisomerase I. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, v. 56, n. 10, p. 1783-1788, 2018.

BIZZARO, Nicola et al. Are anti-nucleosome antibodies a better diagnostic marker than anti-dsDNA antibodies for systemic lupus erythematosus? A systematic review and a study of metanalysis. *Autoimmunity reviews*, v. 12, n. 2, p. 97-106, 2012.

BURLINGAME, Rufus W. The clinical utility of antihistone antibodies: autoantibodies reactive with chromatin in systemic lupus erythematosus and drug-induced lupus. *Clinics in laboratory medicine*, v. 17, n. 3, p. 367-378, 1997.

CARBONE, Teresa et al. Prevalence and serological profile of anti-DFS70 positive subjects from a routine ANA cohort. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 2177, 2019.

CHAMPOUX, James J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annual review of biochemistry*, v. 70, n. 1, p. 369-413, 2001.

CHAN, Edward KL et al. Report of the first international consensus on standardized nomenclature of antinuclear antibody HEp-2 cell patterns 2014–2015. *Frontiers in immunology*, v. 6, p. 412, 2015

CONRAD, Karsten et al. *Autoantibodies in organ specific autoimmune diseases: a diagnostic reference*. Lengerich: Pabst Science Publishers, 2017.

CORNETT, Evan M.; DICKSON, Bradley M.; ROTHBART, Scott B. Analysis of histone antibody specificity with peptide microarrays. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, n. 126, p. e55912, 2017.

CRUVINEL, Wilson M., ANDRADE, Luiz EC, DELLAVANCE, Alessandra et al. VI Brazilian consensus guidelines for detection of anti-cell autoantibodies on Hep-2. *Adv Rheumatol*, v. 62, n. 34, 2022.

CZÖMPÖLY, Tamás et al. Anti-topoisomerase I autoantibodies in systemic sclerosis. *Autoimmunity reviews*, v. 8, n. 8, p. 692-696, 2009

DAMOISEAUX, Jan et al. Clinical relevance of HEp-2 indirect immunofluorescent patterns: the International Consensus on ANA patterns (ICAP) perspective. *Annals of the rheumatic diseases*, v. 78, n. 7, p. 879-889, 2019.

DE ALMEIDA BRITO, Fabiano et al. Diagnostic evaluation of ELISA and chemiluminescent assays as alternative screening tests to indirect immunofluorescence for the detection of

antibodies to cellular antigens. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 145, n. 3, p. 323-331, 2016.

DELLAVANCE, Alessandra et al. II Brazilian Consensus on Antinuclear Antibodies in HEp-2 Cells. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 43, p. 129-140, 2003

DELLAVANCE, Alessandra et al. Redefining the Scl-70 indirect immunofluorescence pattern: autoantibodies to DNA topoisomerase I yield a specific compound immunofluorescence pattern. *Rheumatology*, v. 48, n. 6, p. 632-637, 2009.

DOUVAS, A. S.; ACHTEN, M.; TAN, E. M. Identification of a nuclear protein (Scl-70) as a unique target of human antinuclear antibodies in scleroderma. *J Biol Chem*, v. 254, n. 20, p. 10514-10522, 1979.

DÜZGÜN, Nurşen et al. Antinucleosome antibodies and systemic lupus erythematosus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1109, n. 1, p. 421-428, 2007.

EDNER W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. *J Clin Pathol* 2000; 53: 424- 32.

EHRENSTEIN MR, KATZ DR, GRIFFITHS MH, et al. Human IgG anti-DNA antibodies deposit in kidneys and induce proteinuria in SCID mice. *Kidney Int* 1995; 48: 705–711.

FITCH-ROGALSKY, Christie et al. Clinical and serological features of patients referred through a rheumatology triage system because of positive antinuclear antibodies. *PloS one*, v. 9, n. 4, p. e93812, 2014.

FLORA, Pauline K.; GREGORY, Christopher D. Recognition of apoptotic cells by human macrophages: inhibition by a monocyte/macrophage-specific monoclonal antibody. *European journal of immunology*, v. 24, n. 11, p. 2625-2632, 1994.

FRANCA, Natalia R. et al. Quasi-homogeneous ANA-HEp-2 pattern reflects an autoantibody profile intermediate to the homogeneous and dense fine speckled nuclear patterns. In: *ARTHRITIS AND RHEUMATISM. COMMERCE PLACE, 350 MAIN ST, MALDEN 02148, MA USA: WILEY-BLACKWELL*, 2011. p. S901-S902.

FRANCESCANTONIO, Paulo Luiz Carvalho et al. IV Brazilian guidelines for autoantibodies on HEp-2 cells. *Revista brasileira de reumatologia*, v. 54, p. 44-50, 2014.

GABRIELLI, Armando; AVVEDIMENTO, Enrico V.; KRIEG, Thomas. Scleroderma. *New England Journal of Medicine*, v. 360, n. 19, p. 1989-2003, 2009.

GE, Hui; SI, Yuanzheng; ROEDER, Robert G. Isolation of cDNAs encoding novel transcription coactivators p52 and p75 reveals an alternate regulatory mechanism of transcriptional activation. *The EMBO journal*, v. 17, n. 22, p. 6723-6729, 1998a.

GE, Hui; SI, Yuanzheng; WOLFFE, Alan P. A novel transcriptional coactivator, p52, functionally interacts with the essential splicing factor ASF/SF2. *Molecular cell*, v. 2, n. 6, p. 751-759, 1998b.

GOMEZ-PUERTA, J. A.; BURLINGAME, R. W.; CERVERA, Richard. Anti-chromatin (anti-nucleosome) antibodies. *Lupus*, v. 15, n. 7, p. 408-411, 2006.

GÓMEZ-PUERTA, José A.; BURLINGAME, Rufus W.; CERVERA, Ricard. Anti-chromatin (anti-nucleosome) antibodies: diagnostic and clinical value. *Autoimmunity reviews*, v. 7, n. 8, p. 606-611, 2008.

GULDNER, Hans-Herbert et al. Scl 70 autoantibodies from scleroderma patients recognize a 95 kDa protein identified as DNA topoisomerase I. *Chromosoma*, v. 94, p. 132-138, 1986

HAUGBRO K, NOSSENT JC, WINKLER T, et al. Anti-dsDNA antibodies and disease classification in antinuclear antibody positive patients: the role of analytical diversity. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 386-94.

HÉNAULT, Jill et al. DNA topoisomerase I binding to fibroblasts induces monocyte adhesion and activation in the presence of anti-topoisomerase I autoantibodies from systemic sclerosis patients. *Arthritis & Rheumatism*, v. 54, n. 3, p. 963-973, 2006.

HILDEBRANDT, Sabine et al. The igg, igm, and iga isotypes of anti-topoisomerase i and anticentromere autoantibodies. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, v. 33, n. 5, p. 724-727, 1990.

HO, Khanh T.; REVELLE, John D. The clinical relevance of autoantibodies in scleroderma. *Arthritis Res Ther*, v. 5, p. 1-14, 2003

INFANTINO, Maria et al. Only monospecific anti-DFS70 antibodies aid in the exclusion of antinuclear antibody associated rheumatic diseases: an Italian experience. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, v. 57, n. 11, p. 1764-1769, 2019a.

INFANTINO, Maria et al. The long-awaited 'pseudo-DFS pattern'. *Expert Review of Clinical Immunology*, v. 15, n. 5, p. 445-445, 2019b.

ISENBERG D. Anti-dsDNA antibodies: still a useful criterion for patients with systemic lupus erythematosus? *Lupus* 2004, 13: 881–885

ISENBERG, D. A. et al. Fifty years of anti-ds DNA antibodies: are we approaching journey's end?. 2007.

JOHNSON, Sindhu R. et al. Validation of potential classification criteria for systemic sclerosis. *Arthritis care & research*, v. 64, n. 3, p. 358-367, 2012.

KEISERMAN B, RONCHETTI MR, MONTICIELO OA, et al. Concomitance of IgM and IgG anti-dsDNA Antibodies Does Not Appear to Associate to Active Lupus Nephritis. *The Open Rheumatology Journal* 2013; 7, 101-104.

KRIPPNER, H. et al. Antibodies to histones of the IgG and IgM class in systemic lupus erythematosus. *Clinical and experimental immunology*, v. 58, n. 1, p. 49, 1984.

KUBO, Masahide et al. Prevalence and antigen specificity of anti-histone antibodies in patients with polymyositis/dermatomyositis. *Journal of investigative dermatology*, v. 112, n. 5, p. 711-715, 1999.

KUWANA, Masataka et al. An immunodominant epitope on DNA topoisomerase I is conformational in nature: heterogeneity in its recognition by systemic sclerosis sera. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, v. 42, n. 6, p. 1179-1188, 1999.

LEE, Adrian YS; ANG, Eugene BH. A clinical overview of autoantibodies in general practice rheumatology. *British Journal of General Practice*, v. 64, n. 626, p. e599-e601, 2014.

LIU, Chih Long et al. Specific post-translational histone modifications of neutrophil extracellular traps as immunogens and potential targets of lupus autoantibodies. *Arthritis research & therapy*, v. 14, n. 1, p. 1-14, 2012.

LUNDGREN, Mia C. et al. The antinuclear antibody dense fine speckled pattern and possible clinical associations: An indication of a proinflammatory microenvironment. *Journal of Immunological Methods*, v. 488, p. 112904, 2021.

LUZHETSKAYA, Olesya P.; SEDYKH, Sergey E.; NEVINSKY, Georgy A. How human H1 histone recognizes DNA. *Molecules*, v. 25, n. 19, p. 4556, 2020.

MAHLER, Michael et al. Anti-DFS70/LEDGF antibodies are more prevalent in healthy individuals compared to patients with systemic autoimmune rheumatic diseases. *The Journal of rheumatology*, v. 39, n. 11, p. 2104-2110, 2012.

MARIZ, Henrique A. et al. Pattern on the antinuclear antibody–HEp-2 test is a critical parameter for discriminating antinuclear antibody–positive healthy individuals and patients with autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis & Rheumatism*, v. 63, n. 1, p. 191-200, 2011.

MARZLUFF, William F. et al. The human and mouse replication-dependent histone genes. *Genomics*, v. 80, n. 5, p. 487-498, 2002

MCGINTY, Robert K.; TAN, Song. Nucleosome structure and function. *Chemical reviews*, v. 115, n. 6, p. 2255-2273, 2015.

MERONI, Pier Luigi; SCHUR, Peter H. ANA screening: an old test with new recommendations. *Annals of the rheumatic diseases*, v. 69, n. 8, p. 1420-1422, 2010.

MO, Yin-Yuan; WANG, PuChen; BECK, William T. Functional expression of human DNA topoisomerase I and its subcellular localization in HeLa cells. *Experimental cell research*, v. 256, n. 2, p. 480-490, 2000.

MURO, Yoshinao et al. High concomitance of disease marker autoantibodies in anti-DFS70/LEDGF autoantibody–positive patients with autoimmune rheumatic disease. *Lupus*, v. 17, n. 3, p. 171-176, 2008.

NOWLING, Tamara K.; GILKESON, Gary S. Mechanisms of tissue injury in lupus nephritis. *Arthritis research & therapy*, v. 13, n. 6, p. 1-9, 2011

OCHS, Robert L. et al. Autoantibodies in interstitial cystitis. *The Journal of urology*, v. 151, n. 3, p. 587-592, 1994.

OCHS, Robert L. et al. Autoantibodies to DFS 70 kd/transcription coactivator p75 in atopic dermatitis and other conditions. *Journal of allergy and clinical immunology*, v. 105, n. 6, p. 1211-1220, 2000

OCHS, Robert L. et al. The significance of autoantibodies to DFS70/LEDGFp75 in health and disease: integrating basic science with clinical understanding. *Clinical and experimental medicine*, v. 16, p. 273-293, 2016.

ORTIZ-HERNANDEZ, Greisha L.; SANCHEZ-HERNANDEZ, Evelyn S.; CASIANO, Carlos A. Twenty years of research on the DFS70/LEDGF autoantibody-autoantigen system: many lessons learned but still many questions. *Autoimmunity Highlights*, v. 11, n. 1, p. 1-19, 2020.

PETRI, M. Orbai AM, Alarcón GS, Gordon C, et al. Derivation and validation of SLE Collaborating Clinic Classification (SLICC) criteria for SLE. *Arthritis Rheum*, v. 64, n. 8, p. 2677-2686, 2012.

PISETSKY, David S. Anti-DNA antibodies—quintessential biomarkers of SLE. *Nature Reviews Rheumatology*, v. 12, n. 2, p. 102-110, 2016.

PRADO, Félix; JIMENO-GONZÁLEZ, Silvia; REYES, José C. Histone availability as a strategy to control gene expression. *RNA biology*, v. 14, n. 3, p. 281-286, 2017

RADIC, M_Z; WEIGERT, M. Genetic and structural evidence for antigen selection of anti-DNA antibodies. *Annual review of immunology*, v. 12, n. 1, p. 487-520, 1994.

REKVIK, Ole Petter. The dsDNA, anti-dsDNA antibody, and lupus nephritis: what we agree on, what must be done, and what the best strategy forward could be. *Frontiers in immunology*, v. 10, p. 1104, 2019.

RIBOLDI, Piersandro et al. Anti-DNA antibodies: a diagnostic and prognostic tool for systemic lupus erythematosus?. *Autoimmunity*, v. 38, n. 1, p. 39-45, 2005.

SACK, Ulrich et al. Autoantibody detection using indirect immunofluorescence on HEp-2 cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1173, n. 1, p. 166-173, 2009.

SANCHEZ-HERNANDEZ, Evelyn S. et al. The nuclear dense fine speckled (DFS) immunofluorescence pattern: not all roads lead to DFS70/LEDGFp75. *Diagnostics*, v. 13, n. 2, p. 222, 2023.

SANTOS, Wilton Ferreira Silva et al. The influence of demography and referral medical specialty on the detection of autoantibodies to HEP-2 cells in a large sample of patients. *Advances in Rheumatology*, v. 62, 2022.

SATOH, Minoru et al. Clinical implication of autoantibodies in patients with systemic rheumatic diseases. *Expert review of clinical immunology*, v. 3, n. 5, p. 721-738, 2007

SCHIFFER LE, HUSSAIN N, WANG X, et al. Lowering anti-dsDNA antibodies – what’s new? *Lupus* 2002; 11:885 – 894.

SCHWARTZ MM, KORBET SM, LEWIS EJ. The prognosis and pathogenesis of severe lupus glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23:1298–1306.

SINGH, Dharendra P. et al. Lens epithelium-derived growth factor: increased resistance to thermal and oxidative stresses. *Investigative ophthalmology & visual science*, v. 40, n. 7, p. 1444-1451, 1999.

SHINOHARA, Toshimichi; SINGH, Dharendra P.; CHYLACK JR, LEO T. Age-related cataract: immunity and lens epithelium-derived growth factor (LEDGF). *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, v. 16, n. 2, p. 181-191, 2000.

SMEENK, R. J. Methodological update detection of antibodies to dsDNA: current insights into its relevance. *Clin Exp Rheumatol*, v. 20, n. 3, p. 294-300, 2002.

SUH-LAILAM BB, CHIARO TR, DAVIS KW, et al. Evaluation of a high avidity antidsDNA IgG enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Int J Clin Exp Pathol* 2011;4(8):748-754.

TAN, Eng M. Autoantibodies and Autoimmunity: A Three-Decade Perspective. A Tribute to Henry G. Kunkel a. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 815, n. 1, p. 1-14, 1997.

TESINA, Petr et al. Multiple cellular proteins interact with LEDGF/p75 through a conserved unstructured consensus motif. *Nature communications*, v. 6, n. 1, p. 7968, 2015.

VAN VENROOIJ, W. J. et al. Scl-86, a marker antigen for diffuse scleroderma. *The Journal of clinical investigation*, v. 75, n. 3, p. 1053-1060, 1985.

VILLALTA, Danilo et al. Anti-dsDNA antibody isotypes in systemic lupus erythematosus: IgA in addition to IgG anti-dsDNA help to identify glomerulonephritis and active disease. *PLoS one*, v. 8, n. 8, p. e71458, 2013.

VORDENBÄUMEN, Stefan et al. High diagnostic accuracy of histone H4-IgG autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*, v. 57, n. 3, p. 533-537, 2018.

WATANABE, Akihiro et al. Anti-DFS70 antibodies in 597 healthy hospital workers. *Arthritis & Rheumatism*, v. 50, n. 3, p. 892-900, 2004.

WIJK, Allan S. et al. Antinuclear antibodies: a contemporary nomenclature using HEp-2 cells. *Journal of autoimmunity*, v. 35, n. 3, p. 276-290, 2010.

WINFIELD, J. B. et al. Avidity of anti-DNA antibodies in serum and IgG glomerular eluates from patients with systemic lupus erythematosus. Association of high avidity antinative DNA antibody with glomerulonephritis. *The Journal of clinical investigation*, v. 59, n. 1, p. 90-96, 1977.

YU F, WU LH, TAN Y, et al. Tubulointerstitial lesions of patients WITH lupus nephritis classified by the 2003 International Society of Nephrology and Renal Pathology Society system. *Kidney Int* 2010; 77: 820–829.

YUNG S, CHAN TM. Autoantibodies and resident renal cells in the pathogenesis of lupus nephritis—getting to know the unknown. *Clin Dev Immunol* 2012:139365

YUNG S, CHEUNG KF, ZHANG Q, et al. Anti-dsDNA antibodies bind to mesangial annexin II in lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21:1912–1927.

ZENG, Yanli et al. Avaliação dos isotipos de anticorpos anti-nucleossomo (ANuA) para o diagnóstico e predição da atividade do lúpus eritematoso sistêmico e da nefrite lúpica. *Medicina Clínica e Experimental*, p. 1-13, 2022.

ZIRWAS, Matthew J.; KRESS, Douglas W.; DENG, Jau-Shyong. The utility of antihistone antibody screening in the diagnosis of drug-induced lupus erythematosus. *Archives of dermatology*, v. 140, n. 4, p. 494-495, 2004.