

Presencia de Autoanticuerpos anti-SSA/Ro y/o anti-SSB/La y su Rol en la Progresión hacia Enfermedad Autoinmune

Tania L. Rivera V., y Jill P. Buyon
New York University Hospital for Joint Diseases, Depto. de
Reumatología, Nueva York, Estados Unidos

Summary

Introduction: The presence of autoantibodies can occur years before clinical disease though their presence does not predict disease progression. Mothers enrolled in The Research Registry for Neonatal Lupus (RRNL) are an excellent opportunity to study disease progression, since all of these women are anti-Ro/La positive, and many are asymptomatic at the birth of an affected child. **Materials and Methods:** 99 mothers (32%) from the RRNL were studied, all of whom had been follow-up more than one year. They were classified in six different categories depending on the diagnosis made at the time of birth (Asymptomatic, Pauci-SLE, Pauci-SS, SS, SLE and SLE with secondary SS). The presence of the autoantibodies was confirmed by ELISA and Immunoblot assays. **Results:** 28.3% were asymptomatic at the time of birth, and 39.4% had already developed a few symptoms. Out of 67 mothers, 43.3% progressed to a clinical autoimmune disease after 8.3 years of follow-up. The most common progression of all the asymptomatic or pauci symptomatic mothers (n = 67) was towards SS (28.4%) after a follow-up of 5.4 years, and only 14.9% progressed to LES. The latter was seen later in time (8.7 years since birth). Antibody profile was neither useful as a progression biomarker nor as a diagnostic tool.

Key words: Autoantibodies, lupus, anti-SSA/Ro.

INTRODUCCIÓN

Cada vez existe mayor evidencia que demuestra que la presencia de autoanticuerpos precede por años al inicio de la enfermedad autoinmune; sin embargo, es aún imposible predecir quién desarrollará más adelante la enfermedad clínica.¹ Un estudio publicado por Harley *et al.* demostró en 130 pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico (LES) la presencia de al menos un autoanticuerpo varios años antes de presentar la primera manifestación clínica de la enfermedad. Los autoanticuerpos anti-SSA/Ro y anti-SSB/La se encontraron en un 47% y 34%, respectivamente, y en un promedio de 9,4 y 8,1 años previos al inicio de la sintomatología.² Los anticuerpos anti-Ro/anti-La se encuentran en la mayoría de los pacientes con Síndrome de Sjögren (SS) y en un 15%-45% de los pacientes lúpicos. No se sabe la frecuencia en la que se encuentran estos anticuerpos en la población general. Algunos estudios han demostrado previamente que las madres asintomáticas de hijos con Lupus Neonatal (LN) desarrollan con el tiempo síntomas de enfermedad autoinmune. En un reporte de Julkunen *et al.*³ 15 de 31 madres (48%) cuyos hijos sufrían de bloqueo cardíaco congénito (BCC) eran asintomáticas previo al nacimiento, y después de ocho años de seguimiento, sólo 7 (46,7%) permanecían aún asintomáticas. Las 8 restantes desarrollaron distintas enfermedades autoinmunes (4 LES, 2 SS, 1 hipotiroidismo autoinmune y 1 enfermedad de Graves). En un estudio realizado en Toronto por Press *et al.* se observó que el 66% de las madres de hijos con BCC (n = 42) eran asintomáticas al momento del parto, y que después de un período de seguimiento 3 desarrollaron LES y 2 SS.⁴ En cuanto al perfil de anticuerpos como predictor de progresión de enfermedad, Dr. Tseng *et al.*⁵

Correspondencia: Tania L. Rivera. 301 East 17th St, Room 1410, New York, NY, 10003. Fax: 1-212-598-6168. Correo electrónico: tania.rivera@nyumc.org. El Research Registry for Neonatal Lupus es financiado por NIAMS N01-AR-4-2271.

estudiaron 23 madres de hijos con LN (22 BCC, 1 Rash). La evaluación de los anticuerpos fue restringida a SDS-inmunoblot de la línea celular linfocítica. Para cada madre al menos dos muestras estaban disponibles, y habían sido obtenidas con al menos 13 meses de diferencia entre ellas (promedio entre cada test de 45 ± 27 meses); 22 de los 23 perfiles no cambiaron a pesar de la progresión clínica. En Chile, Pacheco *et al.*^{6,7} encontraron que en un grupo de 50 pacientes LES, 30% eran anti-Ro positivos por técnica de ELISA y 28% eran también positivos para anti-La. En este subgrupo de pacientes (anti-Ro/La positivos) la incidencia de LN fue de un 9% (2 LN en 22 embarazos). No se estudió, eso sí, a madres de LN en ausencia de enfermedad autoinmune.

Un nuevo y especial interés se ha focalizado en la activación de la vía de la citoquina antiviral Interferón (IFN) tipo I, en especial la subfamilia del IFN alfa (IFN- α),⁸ en la etiopatogenia de algunas enfermedades autoinmunes. Esta activación se ha observado en pacientes con LES y SS, y se ha visto que definiría a un subgrupo de pacientes con mayor grado de severidad de la enfermedad, compromiso renal y presencia de autoanticuerpos reactivos contra proteínas unidas a RNA (RNA-binding protein o RBP), especialmente anticuerpos anti-Ro.⁹ Los antígenos Ro y La, que se encuentran normalmente en el intracelular, durante el proceso de necrosis o apoptosis se verían expuestos hacia el extracelular, formando así complejos inmunes (CI) que en contacto con las células dendríticas plasmocitoides (PDC) son capaces de estimular la producción de IFN tipo I.¹⁰⁻¹²

El Registro Nacional de Lupus Neonatal de Estados Unidos (Research Registry for Neonatal Lupus o RRNL), establecido en septiembre de 1994 en Nueva York,¹³ ha identificado a la fecha 309 casos de madres de hijos con LN. En todas ellas se ha detectado la presencia de autoanticuerpos anti-SSA/Ro (contra 52 kD Ro y 60 kD Ro), y/o anti-SSB/La (contra 48 kD La). Las madres son consideradas como candidatas potenciales para ser enroladas en el RRNL si han tenido hijos con alguna manifestación de LN. Este síndrome se ha definido como la presencia de BCC, rash neonatal característico, o enfermedad hepática, en presencia de autoanticuerpos maternos anti-SSA/Ro y/o anti-SSB/La. Lo más frecuente es la detección durante el embarazo, ya que el 70% de los casos de LN se manifiesta *in utero* por BCC. Este Registro ofrece la oportunidad única de estudiar el desarrollo de la enfermedad, ya que muchas madres son totalmente asintomáticas al momento del parto, y sólo se han detectado los anticuerpos a raíz del diagnóstico de LN.^{13,14}

OBJETIVOS

El objetivo del estudio fue evaluar el desarrollo de una enfermedad autoinmune en mujeres asintomáticas o poco sintomáticas en las que se ha detectado la presencia de autoanticuerpos anti-Ro y/o anti-La.

MATERIAL Y METODO

Estudio retrospectivo de madres enroladas en el Registro de Lupus Neonatal de Estados Unidos.

Individuos

Se realizó la evaluación clínica y de laboratorio de 99 madres (32%) y de sus 414 hijos pertenecientes al RRNL. Se incluyó sólo a quienes se les habían realizado seguimiento por un período mayor a un año. Esto se hizo para asegurar un seguimiento suficiente como para evidenciar algún cambio en la sintomatología, ya que los autoanticuerpos pueden estar presentes años antes de las primeras manifestaciones clínicas de la enfermedad autoinmune.

Definición del diagnóstico

Como el RRNL es un registro nacional, la determinación del diagnóstico inicial y el seguimiento de las madres se realizaron mediante revisión de cuestionarios enviados por correo, entrevistas telefónicas y revisión de los documentos médicos recibidos.¹³ Los cuestionarios fueron enviados periódicamente por correo, e incluían preguntas relacionadas con LES y SS, por ejemplo: presencia de rash cutáneo posterior a exposición solar, dolor articular, inflamación articular, sensación de sequedad de ojos, de boca, test de Schirmer positivo realizado por su médico.

Los pacientes se **clasificaron en seis grupos** según los síntomas y/o criterios objetivos de enfermedad.

- Grupo I:** Asintomáticos (pudiendo tener ANA, leucopenia o linfopenia).
- Grupo II:** Pauci-LES (algunos síntomas de LES, pero sin cumplir los criterios de la American College of Rheumatology (ACR),¹⁵ y sin ningún síntoma o criterio objetivo de SS, a excepción de anti-Ro/anti-La).
- Grupo III:** Pauci-SS (sin criterios suficientes de SS, pero con al menos un síntoma SICCA).
- Grupo IV:** SS probable o definitivo. El diagnóstico de SS se basó en los criterios inicialmente publicados por Vitali *et al.*¹⁶ en 1993. Se consideró **probable SS** cuando existían dos respuestas positivas en el cuestionario (sínto-

mas SICCA) más la presencia de anticuerpos anti-Ro y/o anti-La. Diagnóstico de **SS definitivo** si se documentaban criterios objetivos como a) ocular (test de Schirmer ≤ 5 mm en 5 min o Rosa Bengala u otro score de ojo seco ≥ 4), b) score ≥ 1 en biopsia de glándula salival, c) evidencia objetiva de compromiso de glándula salival (cintigrafía salivaria, sialografía parotídea, flujo salival $\leq 1,5$ ml en 1,5 minutos).

Grupo V: LES (con más de cuatro criterios definidos por la ACR).¹⁵

Grupo VI: LES con SS secundario.

Vitali *et al.* publicaron recientemente una versión revisada de la clasificación de los criterios europeos para SS basados en el Consenso Americano-Europeo.¹⁷ Estos criterios agregaron que los pacientes con SS deben tener anti-Ro y/o anti-La, o biopsia de labio inferior positiva. Aunque ha sido argumentado por Manthorpe¹⁸ el Consenso US-Europeo continúa apoyando los criterios subjetivos y el diagnóstico por medio de cuestionario, ya que en la práctica la biopsia de labio es rara vez solicitada para la confirmación diagnóstica.¹⁹ De hecho, sólo un 10% de las madres del RRNL (n = 30) afirmó en el cuestionario que se le había realizado esta biopsia a raíz del hallazgo de anticuerpos anti-Ro/anti-La.

Determinación de autoanticuerpos

En todos los casos se confirmó la presencia de anti-Ro y/anti-La mediante técnica estándar de ELISA y de Inmunoblot para la evaluación de 48 La, 52 y 60 Ro, usando extractos de la línea celular MOLT4 y/o proteínas recombinantes).^{20, 25, 26-29} Estas proteínas humanas recombinantes autoantigénicas SSA/Ro y SSB/La fueron producidas en el laboratorio usando el plasmidio pET28 en *Escherichia coli* BL21 (DE3; Novagen, Madison, WI). Con respecto a la técnica de ELISA, cada muestra fue analizada en duplicado, utilizando el promedio de la densidad óptica (OD) leída a 405 nm entre 15 a 45 minutos de terminada la reacción.

RESULTADOS

Características demográficas de las madres estudiadas

La edad promedio del total de madres fue de 33 ± 1 años (19 a 49 años). El seguimiento promedio fue de 8,3 años (rango: 1 a 11 años). La raza predominante fue la caucásica (77,8%) (Tabla 1).

Diagnósticos al ingreso

Al momento del ingreso al RRNL 28 de las 99 madres estudiadas eran asintomáticas (28,3%), 21 con algunos síntomas de LES, pero no cumplían con los criterios diagnósticos de la ACR para LES y no tenían síntomas SICCA (21,2%), 18 con dos o menos síntomas de SS (18,2%), 14 cumplían los Criterios Europeos para el diagnóstico de SS¹⁶ (14,1%), 10 cumplían con los criterios diagnósticos de la ACR para LES¹⁵ (10,1%) y 8 con LES y SS secundario (8,1%) (Tabla 2).

Progresión de la enfermedad

De las 28 madres asintomáticas, 12 evolucionaron (42,9%) con síntomas sugerentes de enfermedad autoinmune después de un seguimiento promedio de 7,3 años (1 a 10,8 años), 1 desarrolló fotosensibilidad (pauci-LES), 3 madres algún síntoma SICCA (1 xerostomía y 2 xeroftalmía), 4 SS (probable o definitivo), 3 LES (una paciente debutó con fotosensibilidad, artritis, serositis, leucopenia y trombocitopenia; otra con rash malar, fotosensibilidad y serositis a los tres años de seguimiento, y la tercera, con nefritis lúpica después de cinco años desde el ingreso al Registro). Esta última paciente tenía anticuerpos anti-dsDNA negativo al momento del parto. Las 21 madres con pauci-LES fueron seguidas por un período promedio de 5,5 años; 33,3% (n = 7) evolucionó con síntomas adicionales; 3 madres que en un comienzo presentaban artritis frecuente, posteriormente tuvieron síntomas de compromiso de la glándula lacrimal; en una se demostró con test de Schirmer; 4 (19%) desarrollaron LES (1 con DPGN nueve años después del primer seguimiento). Desafortunadamente no se determinó el título de anticuerpo anti-dsDNA al momento de ingresar al Registro. Las pacientes con SS al momento del parto (n = 14) fueron seguidas por 7,2 años, período durante el cual 4 (28,6%) manifestaron síntomas de LES. Una madre debutó con LES severo, con compromiso renal y embolia pulmonar a los 10 años de seguimiento; ella es uno de los pocos casos del Registro en el que todos los hijos se han visto afectados por LN, dos con BCC y uno con BCC y rash.

En resumen, de las 28 madres asintomáticas 42,9% (n = 12) progresó hacia algún tipo de autoinmunidad clínica después de 7,3 años, siendo más frecuentes los síntomas de compromiso glandular lacrimal y/o salival que los sugerentes de LES (25 vs 17%). Esta distribución se vio también en el grupo de las 39 pauci sintomáticas, evolucionando con uno o más síntomas de SS un 30,7% y sólo un 12,8% con síntomas de LES (Tabla 3).

Por lo tanto, del total de 67 madres susceptibles de desarrollar síntomas adicionales (ya sea por ser asintomáticas o pauci sintomáticas al ingreso), un 43,3% desarrolló autoinmunidad sintomática después de un seguimiento promedio de 8,3 años. La evolución más común fue hacia SS (28,4%), después de un seguimiento de 5,4 años, y sólo un 14,9% evolucionó hacia LES, y lo hizo más tarde (8,7 años desde el parto).

Perfil de anticuerpos anti-Ro y anti-La y su utilidad diagnóstica

Ochenta de los sueros maternos fueron testeados para anti-Ro y/o anti-La en el NYU Hospital for Joint Diseases. Un 100% fue positivo para anti-Ro y un 56,3% para anti-La. Al realizar el test de ELISA 98,8% reaccionaron con 52 kD SSA/Ro y 68,8% con 60 kD SSA/Ro. Los títulos de anticuerpos anti-Ro y anti-La no tuvieron correlación con el diagnóstico al inicio, con la evolución hacia enfermedad autoinmune, o con el tipo de LN.

TABLA 1.
CARACTERÍSTICAS DE MADRES ESTUDIADAS
(N = 99).

Edad promedio (años)	33 ± 1 años
Rango edad (años)	19 - 49
Raza (%)	
Caucásica	77,8 (77)
Negra	9,1 (9)
Asiática	5,1 (5)
Hispana	7,1 (7)
Diagnóstico LN (%)*	
Rash	29,7 (30)
BCC	60,4 (61)
Rash y BCC	8,9 (9)
Compromiso hepático	1,0 (1)

LN = Lupus Neonatal, BCC = Bloqueo Cardíaco Congénito.

* Hubo más de un hijo afectado por madre estudiada.

TABLA 2.
CLASIFICACIÓN DE LAS MADRES SEGÚN EL DIAGNÓSTICO, AL INGRESO Y AL MOMENTO DEL ÚLTIMO SEGUIMIENTO (n = 99).

Diagnóstico al ingreso	n (%)	Diagnóstico al último seguimiento	n	Seguimiento promedio (años)
Asintomática (Grupo I)	28 (28,3)	Grupo I: Asintomática	16	4,3
		Grupo II: Pauci-LES	1	10,2
		Grupo III: Pauci-SS	3	2,4
		Grupo IV: SS	4	7,9
		Grupo V: LES	3	8,1
		Grupo VI: LES/SS	1	10,3
Pauci-LES (Grupo II)	21 (21,2)	Grupo II: Pauci-LES	14	4,8
		Grupo III: Pauci-SS	2	3,4
		Grupo IV: SS	1	6,5
		Grupo V: LES	4	7,1
		Grupo VI: LES/SS	0	N/A
Pauci-SS (Grupo III)	18 (18,2)	Grupo III: Pauci-SS	8	3,4
		Grupo IV: SS	9	6,9
		Grupo V: LES	0	N/A
		Grupo VI: LES/SS	1	7,5
SS (Grupo IV)	14 (14,1)	Grupo IV: SS	10	6,2
		Grupo V: LES	0	N/A
		Grupo VI: LES/SS	4	7,2
LES (Grupo V)	10 (10,1)	Grupo V: LES	8	5,8
		Grupo VI: LES/SS	2	9,3
LES/SS (Grupo VI)	8 (8,1)	Grupo VI: LES/SS	8	5,6

TABLA 3.
PROGRESIÓN DIAGNÓSTICA DE MADRES (n = 67).

Diagnóstico al ingreso	n (%)	Síntomas sugerentes	n (%)	Seguimiento promedio (años)
Asintomática	28 (41,8)	SS	7 (25)	5,2
		LES	5 (17,9)	9,6
Pauci-sintomáticas	39 (58,2)	SS	12 (30,8)	5,6
		LES	5 (12,8)	7,3
Total	67 (100)	SS	19 (28,4)	5,4
		LES	10 (14,9)	8,7

DISCUSIÓN

Es interesante que la mayoría de las madres estudiadas desarrolle compromiso tipo Sjögren, y lo hagan en un menor tiempo que las que finalmente serán LES (5,4 vs 8,7 años). Es importante destacar que todas aquellas madres asintomáticas que no desarrollaron ningún tipo de sintomatología (n = 16) fueron seguidas por un período más corto que las que sí lo hicieron (4,3 vs 7,1 años). Esto también es válido para aquellas pauci sintomáticas que no alcanzaron a desarrollar la enfermedad en su totalidad (4,8 las pauci-LES y 3,4 las pauci-SS). Con un seguimiento más prolongado (7,8 años) se evidenció la evolución en más de un tercio de las madres asintomáticas (42,9%).

El desarrollo de las enfermedades autoinmunes está determinado por múltiples factores. La sola presencia de autoanticuerpos no determina evolución hacia autoinmunidad en población asintomática o pauci sintomática. Está claro que existe algún factor gatillante que da inicio a la generación de autoanticuerpos, y más adelante éste (u otro) facilitará la continuidad hacia la generación de nuevos autoanticuerpos y/o síntomas.³ La teoría de que todo comenzaría con la exposición hacia el extracelular de antígenos Ro y/o La, los cuales iniciarían una cadena de eventos y liberación de citoquinas, no explica por qué muchos pacientes lúpicos no expresan anticuerpos contra estas ribonucleoproteínas, sino otra gama de autoanticuerpos. Recientes publicaciones sugieren que el Interferón alfa jugaría un rol crucial en la etiopatogenia de enfermedades autoinmunes como SS y LES. Lo que estimularía a las PDC para generar IFN alfa serían los IC formados

por ácidos nucleicos y proteínas, provenientes de células en apoptosis. Por esto, en conjunto con el Departamento de Reumatología del Hospital for Special Surgery, se está evaluando la presencia de IFN alfa en el plasma de las madres del RRNL. Se determinará su rol como biomarcador de progresión de enfermedad, y/o gravedad de la misma.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Iglesias M. ¿Son los autoanticuerpos predictores de enfermedades autoinmunes reumatológicas? *Revista Chilena de Reumatología* 2004; 20 (1):7-9.
- Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, Harley JB. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2003 (Oct. 16); 349(16): 1526-33.
- Julkunen H, Kurki P, Kaaja R, Heikkilä R, Ilkka I, Chan EK L, Wallgren E, Friman C. Isolated congenital heart block: Long-term outcome of mothers and characterization of the immune response to SS-A/Ro and to SS-B/La. *Arthritis Rheum* 1993; 36:1588-1598.
- Press J, Uziel Y, Laxer RM, Luy L, Hamilton RM, Silverman ED. Long-term outcome of mothers of children with complete congenital heart block. *Am J Med*, 1996; 100:328-332.
- Tseng C, Di Donato F, Buyon JP. Stability of immunoblot profile of anti-SSA/Ro-SSB/La antibodies over time in mothers whose children have neonatal lupus. *Lupus*, 1996; 5:212-215.
- Pacheco D, Marinovic MA, Alvarez ME, Ballesteros F, Fuentealba C. Anticuerpos anti Ro/SSA y anti La/SSB en el Lupus Eritematoso Sistémico. Manifestaciones clínicas. Efectos en embarazo y neonato. *Revista Chilena de Reumatología* 2002; 18(3):150.
- Pacheco D. Importancia clínica y patogénica de anticuerpos anti Ro y anti La en Lupus Eritematoso Sistémico. *Revista Chilena de Reumatología* 2004; 20 (1):3-6.
- Levy DE y García Sastre A. The virus battles: IFN induction of the antiviral state and mechanisms of viral evasion. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001; 12:143-56.

9. Kirou KA, Lee C, George S, Louca K, Peterson MGE, Crow MK. Activation of the interferon-alpha pathway identifies a subgroup of systemic lupus erythematosus patients with distinct serologic features and active disease. *Arthritis Rheum* 2005; 52:1491-503.
10. Lovgren T, Eloranta AL, Bave U, Alm GV, Ronnblom L. Induction of interferon-alpha production in plasmacytoid dendritic cells by immune complexes containing nucleic acid released by necrotic or late apoptotic cells and lupus IgG. *Arthritis Rheum* 2004; 50:1861-72.
11. Iruretagoyena M, Iacobelli S, Kalergis A. Células dendríticas como determinantes del equilibrio entre inmunidad y autoinmunidad. *Revista Chilena de Reumatología* 2005; 21(2):58-64.
12. Iglesias M. Las células dendríticas y su papel de centinelas en el sistema inmune. *Revista Chilena de Reumatología* 2003; 19(4):168-169.
13. Buyon JP, Hiebert R, Copel J, Craft J, Friedman D, Katholi M, Lee L, Marston K, Provost T, Reichlin M, Rider L, Rupel A, Saleeb S, Weston W, Skovron ML. Autoimmune-associated congenital heart block: Mortality, morbidity, and recurrence rates obtained from a national neonatal lupus registry. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31:1658-1666.
14. Buyon JP. Neonatal lupus syndrome. In: *Systemic Lupus Erythematosus*, 4th Ed. Lahita R. (Ed.), Elsevier Academic Press: San Diego 2004; pp. 449-484.
15. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masis AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25:1271-1277.
16. Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM, et al. Preliminary criteria for the classification of Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1993; 36:340-347.
17. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, et al. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 2002; 61:554-8.
18. Manthorpe R. Sjogren's syndrome criteria. *Ann Rheum Dis* 2002; 61:482-4.
19. Vitali C. Comment on: Manthorpe R, Sjogren's syndrome criteria. *Ann Rheum Dis* 2003; 62:94-5.
20. James JA y Harley JB. Linear Epitope Mapping of an Sm B/B' Protein. *J. Immunol* 1992; 148:2074-2079.
21. James JA y Harley JB. Basic Amino Acids Predominate in the Sequential Autoantigenic Determinants of the Small Nuclear 70K Ribonucleoprotein, *Scand J Immunol* 1994; 39:557-566.
22. James JA y Harley JB. Sequential Autoantigenic Determinants of the Small Nuclear Ribonucleoprotein Sm D Shared by Human Lupus Autoantibodies and MRL lpr/lpr Antibodies. *Clin Exp Immunol* 1994; 98:419-426.
23. James JA y Harley JB. Sequential fine specificity of the small nuclear ribonucleoprotein C. *Clin Exp Rheum* 1995; 13:299-305.
24. James JA y Harley JB. Human lupus anti-spliceosome A protein autoantibodies bind contiguous surface structures and segregate into two sequential epitope binding patterns. *J Immunol* 1996; 156:4018-26.
25. Harley JB y James JA. Autoepitopes in Lupus. *J Lab Clin Med* 1995; 126(6):509-16.
26. Buyon JP, Slade SG, Chan EKL, Tan EM, Winchester R. Effective separation of the 52-kD SSA/Ro polypeptide from the 48-kD SSB/La polypeptide by altering conditions of polyacrylamide gel electrophoresis. *J Immunological Methods* 1990; 129:207-210
27. Buyon JP, Clancy RM, Di Donato F, Miranda-Carus ME, Askanase AD, Garcia J, Qu Y, Hu K, Chan EKL, Boutjdir M. Cardiac 5-HT4 serotonergic receptors, 52 kD SSA/Ro and autoimmune-associated congenital heart block. *J Autoimmunity* 2002; 19:79-86.
28. Clancy RM, Buyon JP, Ikeda K, Nozawa K, Argyle DA, Friedman DM, Chan EK. Maternal antibody responded to the 52-kD SSA/Ro p200 peptide and the development of fetal conduction defects. *Arthritis and Rheum* 2005 (Oct); 52(10):3079-86.
29. Fisher DE, Reeves WH, Wisniewolski R, Lahita RG, Chiorazzi N. Temporal shifts from Sm to ribonucleoprotein reactivity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1985; 28:1348-1355.