

LAVORO ORIGINALE

L'evoluzione da sindrome da anticorpi antifosfolipidi primaria a lupus eritematoso sistemico: possono gli anticorpi anti-nucleosomi essere predittivi?*

Primary antiphospholipid syndrome evolving into systemic lupus erythematosus: may antinucleosome antibodies be predictive?

L. Andreoli¹, F. Pregnolato², R.W. Burlingame³, V. Fanelli², F. Allegri¹, A. Radice⁴, C. Corace⁵, R.A. Sinico⁵, A. Tincani¹, P.L. Meroni²

¹U.O. Reumatologia e Immunologia Clinica, Spedali Civili e Università degli Studi di Brescia;

²Allergologia, Immunologia Clinica e Reumatologia, Dipartimento di Medicina Interna, Università di Milano, IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milano; ³INOVA Diagnostics, San Diego, CA, USA;

⁴Istituto di Microbiologia e ⁵Unità di Nefrologia e Immunologia Clinica, Dipartimento di Medicina, Ospedale San Carlo Borromeo, Milano

SUMMARY

Objective: It was reported by several groups that patients diagnosed as primary antiphospholipid syndrome (PAPS) had developed a full-blown systemic lupus erythematosus (SLE) even after many years of follow-up. Little is known about clinical and/or serological factors that may help predict such evolution. Antinucleosome antibodies (anti-NCS) were described to appear in early stages of SLE, in particular before anti-dsDNA antibodies. The aim of the study is to evaluate the prevalence of anti-NCS in a large cohort of PAPS patients.

Methods: IgG and IgM anti-NCS antibodies were detected using a home made assay with H1-stripped chromatin as antigen. Sera from 106 PAPS patients were tested; 52 of them were also tested during the follow-up, at least 2 years apart from the basal sample.

Results: Medium-high titre anti-NCS were found in nearly half of the patients (49/106, 46%), more frequently in those presenting features of "lupus like disease". Most of patients displayed an unchanged pattern of anti-NCS over time. We describe three cases of PAPS patients that developed SLE after many years of follow-up; high titre and low titre anti-NCS were present in two and one of them respectively several years before evolving into SLE.

Conclusions: A significant proportion of PAPS patients displayed medium-high titre anti-NCS, suggesting that the autoimmune response against chromatin may be a relevant event not only in patients with SLE. Further studies are warranted to explore the predictive value of anti-NCS with respect to the evolution from PAPS to SLE.

Reumatismo, 2008; 60(3):185-191

*Lavoro premiato al XLIV Congresso SIR, Venezia 2007.

INTRODUZIONE

La sindrome da anticorpi antifosfolipidi è stata originariamente descritta in pazienti con lupus eritematoso sistemico (LES) (1) e solo successivamente, con l'estendersi della ricerca di anticorpi an-

tifosfolipidi (aPL) a pazienti affetti da patologia trombotica e/o ostetrica, è stata definita anche come forma primaria (PAPS) (2), cioè non associata a segni o sintomi caratteristici di malattia autoimmune sistemica. Tuttavia, nella pratica clinica quotidiana, può risultare spesso difficile distinguere queste due forme. Infatti, è comune osservare dei pazienti classificati come PAPS che presentano caratteristiche cliniche "minori" o sierologiche tipiche del LES (ad esempio: fotosensibilità, artralgie, anticorpi anti-nucleo (ANA) positivi a titolo medio-alto, livelli di complemento sierico lievemente ridotti), ma in assenza di manifestazioni d'organo maggiori o, comunque, di almeno 4 criteri classi-

Indirizzo per la corrispondenza:

Dott.ssa Laura Andreoli

U.O. Reumatologia e Immunologia Clinica

Spedali Civili

Piazzale Spedali Civili 1 - 25123 Brescia

E-mail: andreoli@bresciareumatologia.it

ficativi secondo l'American College of Rheumatology (ACR) (3). Tali pazienti vengono spesso denominati come malattia "lupus like" (LL).

Nel 1993 venivano proposti dei criteri di esclusione per la diagnosi di PAPS per poter meglio classificare i pazienti (4). In ogni caso, sono stati riportati in letteratura numerosi casi di PAPS che sono evoluti in LES anche molti anni dopo dalla diagnosi iniziale (5-7). Distinguere tra PAPS e LES da un punto di vista nosografico potrebbe essere un obiettivo non perseguibile, in quanto sono sempre di più le evidenze che supportano la natura "sistemica" della sindrome "primaria" (8) e il coinvolgimento di processi infiammatori complemento-mediati, simili a quelli nel LES, anche nelle manifestazioni tipiche della sindrome, quali la patologia ostetrica (9) e la formazione del trombo (10). L'evoluzione da PAPS a LES potrebbe essere dunque solo una questione di tempo, ma pure il limite di 5 anni, suggerito recentemente per giudicare stabile una diagnosi di PAPS (11), sembra non corrispondere pienamente a ciò che viene osservato nelle diverse casistiche.

Attualmente, non vi sono dati che identifichino in maniera certa quali siano le caratteristiche che pongono un paziente con PAPS a rischio di sviluppare un LES, né ci si può esprimere sulla probabilità o sulla tempistica con cui tale evento può accadere. Modelli murini di lupus (12) hanno evidenziato che anticorpi anti-nucleosomi (anti-NCS) compaiono in circolo precocemente, e in particolare prima degli anticorpi anti-dsDNA che sono universalmente ritenuti marker di LES. Gli anti-NCS, infatti, riconoscono epitopi più grossolani localizzati sulla superficie delle strutture nucleosomiche (13) ed è dunque verosimile che costituiscano la prima linea di risposta verso l'antigene cromatina. Numerosi studi condotti in anni recenti hanno ampiamente indagato il significato degli anti-NCS nel LES, evidenziando come questi anticorpi siano un marker specifico e sensibile, di particolare utilità in quei soggetti negativi per anti-dsDNA; inoltre, il loro titolo sembra correlare con l'attività di malattia e soprattutto con l'interessamento renale (14). Il fatto che lo sviluppo di anti-NCS sia un evento precoce nei modelli animali di lupus ha suggerito che tali anticorpi potessero rappresentare un marker precoce di malattia anche negli umani. Basandosi su questa ipotesi, un recente lavoro ha studiato il profilo degli anti-NCS in una piccola casistica di pazienti con PAPS, dimostrando il loro possibile ruolo nel predire l'evoluzione a LES (15).

Il presente studio si propone di valutare la prevalenza degli anti-NCS in una ampia casistica multicen-

trica di pazienti con PAPS e di descrivere quei casi che sono evoluti in LES nel corso del follow-up. Presentiamo un aggiornamento a febbraio 2008 dei dati elaborati a settembre 2007 per la pubblicazione sul numero speciale di *Journal of Autoimmunity*. Il numero speciale era dedicato alle diverse manifestazioni dell'autoimmunità e raccoglieva lavori tratti dalle relazioni del convegno "The mosaic of autoimmunity", tenutosi in Israele a febbraio 2008 (16).

MATERIALI E METODI

Pazienti

Centosei pazienti con diagnosi di PAPS effettuata secondo i criteri di Sydney (17) sono stati inclusi nello studio, selezionandoli casualmente tra quelli seguiti presso i centri di Reumatologia degli Spedali Civili di Brescia e dell'Istituto Auxologico di Milano. I pazienti sono stati definiti come PAPS+LL nel caso in cui non venissero soddisfatti almeno 4 dei criteri ACR per il LES ma fossero presenti almeno due tra le seguenti caratteristiche: ANA positivi a titolo maggiore o uguale di 1:320, anticorpi anti-dsDNA positivi, anticorpi anti-ENA positivi, leucopenia, linfopenia, C3 e/o C4 persistentemente ridotti, artralgie e fotosensibilità. Almeno un campione di siero per ciascun paziente è stato raccolto con il consenso informato dell'interessato e conservato a -20°C. Per 52 pazienti è stato raccolto anche un secondo campione a distanza di almeno 2 anni dal primo.

Metodi

Gli anti-NCS di classe IgG ed IgM sono stati testati mediante metodica immunoenzimatica (ELISA) home-made, come precedentemente descritto (16). Riassumendo brevemente, la metodica è stata così allestita: l'antigene cromatina (H1-stripped chromatin, fornito da INOVA Diagnostics, San Diego, CA, USA) è stato diluito in calcio carbonato 0,05 M, pH 9,6, e copulato overnight a 4°C; il giorno successivo, le piastre venivano lavate 3 volte con tampone di lavaggio e poi seminate con tampone di bloccaggio e lasciate riposare per 16-18 ore a 4°C. Lo stesso tampone è stato utilizzato per diluire i campioni in esame e i sieri di riferimento noti per IgG ed IgM (diluiti al raddoppio da 1:50 a 1:3200 per costruire una curva di riferimento a 7 punti). Dopo un ulteriore ciclo di lavaggio, le piastre venivano seminate in duplicato per ciascun campione e messe ad incubare per 1 ora a 37°C. Intervallate da opportuni lavaggi, seguivano l'incubazione del coniugato per 1 ora a 37°C e la semina del substrato.

La reazione colorimetrica, fatta sviluppare a 37°C, veniva bloccata quando il primo punto della curva di riferimento raggiungeva circa le 2.000 densità ottiche (OD). A tale punto veniva assegnato un valore di 200 unità arbitrarie (AU/ml) e i valori di OD venivano convertiti in AU/ml usando una curva di interpolazione a 4 parametri. Il livello discriminante per la positività ad anti-NCS è stato stimato mediante un gruppo di 60 individui sani, donatori volontari di sangue, comparabili per sesso ed età alla popolazione in studio. Il cut-off è stato definito come il 99° percentile dei valori riscontrati nei sani. Sono stati dunque identificati un valore di 7 AU/ml per le IgG e di 8 AU/ml per le IgM. Una zona di positività a basso titolo è stata fissata tra il cut-off e le 15 AU/ml (corrispondente a due volte circa il cut-off). Valori di anti-NCS superiori alle 15 AU/ml sono stati considerati a titolo medio-alto.

Sono stati inoltre testati come gruppi patologici di controllo: 30 LES con positività per anti-dsDNA, 20 soggetti con malattie infettive, 20 pazienti con Artrite Reumatoide (AR). Per quanto concerne altri autoanticorpi presi in esame nello studio, sono state utilizzate le seguenti metodiche:

- anticorpi anticardiolipina (aCL) e anti-β₂glicoproteina I (anti-β₂GPI): metodiche immunoenzimatiche home-made, come precedentemente descritto (18, 19);
- Lupus Anticoagulant: secondo le linee guida internazionali (20);
- ANA: immunofluorescenza indiretta su cellule HEp-2;
- anti-dsDNA: metodica radioimmunologica (test di Farr) (21);
- anti-ENA: controimmuno-elettroforesi (22).

Analisi statistica

L'associazione tra variabili categoriali è stata ricercata applicando il test del Chi quadrato con correzione di Yates.

Valori di p inferiori allo 0.05 sono stati ritenuti statisticamente significativi.

RISULTATI

Le caratteristiche demografiche, cliniche e serologiche dei 106 pazienti con PAPS inclusi nello stu-

Tabella 1 - Caratteristiche demografiche, criteri clinici e di laboratorio per la Sindrome da Antifosfolipidi (APS). aCL: anticorpi anti-cardiolipina; anti-β₂GPI: anticorpi anti-β₂glicoproteina I (*Percentuali calcolate sul totale delle pazienti di sesso femminile, n=92).

	Numero di pazienti	% sul totale
DEMOGRAFIA		
Maschi	14	13,3%
Femmine	92	86,7%
Età media alla diagnosi (anni)	36	-
Età mediana (anni) alla diagnosi (range)	33 (19-70)	-
Mesi di follow-up (mediana/range)	61 (6-280)	-
Mesi di follow-up al 1° campione testato (mediana/range)	35 (0-131)	-
Mesi di follow-up al 2° campione testato (mediana/range) (52 pazienti)	71 (24-250)	-
CRITERI CLINICI PER APS		
Trombosi arteriose	27	25,7%
Trombosi venose	46	43,4%
Aborti spontanei prima della 10ª settimana di gestazione (3 eventi consecutivi)	10	10,9%*
Morti endouterine dopo la 10ª settimana di gestazione (almeno un evento)	40	43,5%*
Nati vivi prematuri (prima della 34ª settimana) per preeclampsia	10	10,9%*
Pazienti con eventi sia trombotici che ostetrici	20	21,7%*
CRITERI DI LABORATORIO PER APS		
aCL positivi (IgG e/o IgM)	89	84,8%
anti-β ₂ GPI positivi (IgG e/o IgM)	80	76,2%
Lupus Anticoagulant positivo	91	85,8%
Un singolo test positivo	9	8,5%
Due test positivi	27	25,7%
Tutti e tre i test positivi	70	66,7%

Tabella II - Risultati degli anti-NCS IgG e IgM in base ai range di positività a basso e medio-alto titolo.

ANTI-NCS	IgG pos medio-alto (>15 AU/ml)	IgG pos debole (7-15 AU/ml)	IgG neg (<7 AU/ml)	Totale
IgM pos medio-alto (>15 AU/ml)	18 (17,1%)	9 (8,6%)	6 (5,7%)	33 (31,4%)
IgM pos debole (8-15 AU/ml)	4 (3,8%)	7 (6,7%)	12 (11,4%)	23 (21,9%)
IgM neg (<8 AU/ml)	12 (11,4%)	14 (12,4%)	24 (22,9%)	50 (46,7%)
Totale	34 (32,4%)	30 (27,6%)	42 (40%)	106 (100%)

dio sono riassunte nella tabella I. L'intera coorte è stata suddivisa in 2 gruppi in base alla presenza di malattia LL: 59 (55.7%) venivano classificati come PAPS, mentre i restanti 47 come PAPS+LL (44.3%). I due gruppi non presentavano differenze significative in termini di distribuzione maschi/femmine, età media alla diagnosi, mesi di follow-up, prevalenza di manifestazioni cliniche minori quali artralgie o fotosensibilità, presenza di alterati dati di laboratorio (leucopenia, linfopenia, trombocitopenia, riduzione del C4); al contrario, invece, nel gruppo di PAPS+LL si riscontravano più frequentemente (Chi quadrato, $p < 0.05$) riduzione del C3, positività per ANA con titolo maggiore o uguale a 1:320, positività per anti-dsDNA (anche se a titolo basso, inferiore a 2 volte il limite di normalità) e positività per anticorpi anti-ENA (quasi esclusivamente anti-Ro/SSA).

Per quanto riguarda la prevalenza di anti-NCS nei gruppi patologici di controllo elencati nel capitolo dedicato ai metodi, i 20 soggetti con malattie infettive e i 20 affetti da AR sono risultati tutti negativi per anti-NCS; dei 30 pazienti con LES e positivi per anti-dsDNA, 26 sono risultati positivi per anti-NCS a titolo medio-alto, mentre gli altri erano negativi. Prendendo in considerazione i 106 pazienti con PAPS, 82 (77.4%) di essi sono risultati positivi per IgG e/o IgM anti-NCS, di cui 49

(46.2%) a titolo medio-alto, mentre i restanti 33 (31.2%) a titolo basso. I pazienti risultati negativi sia per IgG che per IgM erano 24 (22.6%). La tabella II mostra in dettaglio la distribuzione degli anti-NCS IgG e IgM in base ai range di positività.

Considerando i pazienti suddivisi come PAPS e PAPS+LL, abbiamo osservato che la positività a titolo medio-alto per anti-NCS si associava in maniera significativa alla presenza di malattia LL, mentre le positività a basso titolo erano principalmente rappresentate nel gruppo dei soggetti con PAPS.

Per circa metà dei pazienti è stato possibile testare un secondo campione a distanza di almeno 2 anni dal primo, osservando così il trend degli anti-NCS nel tempo. La tabella III descrive le variazioni intercorse tra le due determinazioni per almeno uno dei due isotipi testati. La maggior parte dei pazienti ha mostrato stabilità nel pattern autoanticorpale, mentre solo alcuni di essi (11 su 52, 21.1%) si sono positivizzati o negativizzati nel corso del follow-up.

Dal punto di vista clinico, invece, sono stati osservati tre casi di pazienti che, a distanza di numerosi anni dalla diagnosi di PAPS, hanno sviluppato manifestazioni d'organo che hanno configurato una evoluzione a malattia lupica conclamata e, in particolare, due casi di glomerulonefrite proliferativa

Tabella III - Fluttuazioni di IgG e/o IgM anti-NCS nel corso del follow-up di 52 pazienti (pos = positivo; neg = negativo).

Variazione di ANTI-NCS	PAPS (n=24) n. (%)	PAPS+LL (n=28) n. (%)	Totale (n=52) n. (%)
Pattern immutato	19 (79,2%)	14 (50%)	33 (63,5%)
Da pos medio-alto a pos debole	2 (8,3%)	6 (21,5%)	8 (15,4%)
Da pos debole a neg	1 (4,2%)	3 (10,7%)	4 (7,7%)
Da pos medio-alto a neg	0	2 (7,1%)	2 (3,8%)
Da neg a pos debole	2 (8,3%)	3 (10,7%)	5 (9,6%)

Tabella IV - Caratteristiche dei pazienti che sono evoluti a LES.

	Paziente 1, femmina	Paziente 2, maschio	Paziente 3, femmina
Età alla diagnosi di PAPS	27	38	29
Criteri clinici per APS	Trombosi venose profonde recidivanti, morti endouterine	Trombosi venosa profonda	Morti endouterine, trombosi venosa profonda (insorta in corso di terapia antiaggregante, 6 mesi prima dell'esordio di LES)
Evoluzione a LES (anni dopo la diagnosi di PAPS)	20	15	13
Criteri per la diagnosi di LES	Nefrite lupica classe IV, fotosensibilità, ANA positivi a titolo elevato, anti-dsDNA positivi a titolo medio-alto	Artrite polistazionale, fotosensibilità, leucopenia, ANA positivi a medio titolo	Nefrite lupica classe IV, leucopenia, anemia emolitica, ANA positivi a titolo elevato, anti-dsDNA positivi a titolo medio-alto
Anti-NCS prima dell'esordio di LES	IgG a titolo medio-alto (8 anni prima dell'esordio di LES)	IgG e IgM a titolo elevato (4 anni prima dell'esordio di LES)	IgG a basso titolo (9 anni prima dell'esordio di LES)
Anti-dsDNA prima dell'esordio di LES	Positivi borderline	Negativi	Negativi

diffusa e un caso di artrite polistazionale. Tutti e tre i soggetti presentavano anti-NCS positivi molti anni prima dello sviluppo di LES. Le caratteristiche dei tre pazienti sono riassunte in tabella IV.

DISCUSSIONE

La descrizione della forma primaria della sindrome da antifosfolipidi risale a più di 20 anni fa e contempla manifestazioni trombotiche vascolari e/o ostetriche non inquadrabili nell'ambito di una malattia autoimmune sistemica conclamata; tale definizione considerava dunque la malattia più che altro come un disturbo della coagulazione, apparentemente non correlato a processi di infiammazione. Questa visione, probabilmente generata dalla necessità di distinguere la PAPS come entità nosografica distinta dal LES, andrebbe rivalutata alla luce delle evidenze scientifiche che si sono accumulate nel corso degli anni. Infatti, è stato dimostrato che gli aPL sono autoanticorpi prevalentemente diretti contro la β_2 GPI, una proteina a carica positiva, molto diffusa in circolo, che si lega ai fosfolipidi a carica negativa. Quando gli anticorpi si legano alla β_2 GPI che si trova adesa a membrane cellulari o nel contesto di immunocomplessi circolanti, essi possono scatenare risposte pro-infiammatorie potenzialmente implicate nelle manifesta-

zioni della sindrome da antifosfolipidi (23). Inoltre, è stato dimostrato sia in vitro sia in modelli animali che gli aPL, in particolare gli anti- β_2 GPI, sono in grado di fissare il complemento, un altro importante meccanismo di amplificazione dei processi infiammatori (10, 24). A sostegno di questi dati sperimentali che suggeriscono un nesso tra antifosfolipidi e infiammazione, vi è poi l'esperienza clinica che ci documenta come pazienti con PAPS possano sviluppare un LES nel tempo, anche se, attualmente, non ci sono indicazioni su quali marcatori possano predire tale evoluzione.

Nel nostro lavoro viene descritto per la prima volta che un numero consistente di pazienti con PAPS presenta positività per anti-NCS, anticorpi che, al momento attuale, sono ampiamente riconosciuti come marker di LES. È importante sottolineare che in questo studio sono stati inseriti pazienti con diagnosi di PAPS secondo i criteri recentemente aggiornati (17) e che la maggior parte di essi mostrava positività a più di un test per aPL. Nessun paziente soddisfaceva almeno 4 criteri ACR per la diagnosi di LES; tuttavia, in accordo con altri lavori, abbiamo individuato pazienti con malattia lupus-like, cioè quei soggetti che presentano 2 o 3 caratteristiche cliniche o laboratoristiche comprese nei criteri per il LES. La prevalenza di anti-NCS da noi riscontrata (77%) è decisamente maggiore rispetto a quella riportata in altri gruppi meno nu-

merosi di PAPS (15, 25, 26). Tali differenze possono essere legate proprio alla maggiore numerosità della nostra coorte che può dunque offrire una valutazione più realistica; tuttavia, non possono essere escluse variabili legate alle metodiche utilizzate, considerando in particolare che nel nostro studio è stata utilizzata una metodica home-made. Pur tenendo presente queste osservazioni, è comunque vero che, innalzando il cut-off a 2 volte il valore ottenuto sui campioni normali (15 AU/ml), osserviamo lo stesso una prevalenza significativa di anti-NCS, nell'ordine del 50% circa.

I nostri dati suggeriscono che gli anti-NCS potrebbero aggiungersi al mosaico dei fenomeni autoimmuni che caratterizzano la sindrome e, in particolare, quei pazienti con maggiore probabilità di evolvere a LES. Su quest'ultimo punto non possiamo purtroppo trarre delle conclusioni: il follow-up di 52 pazienti per un tempo mediano di 71 mesi non ha prodotto informazioni significative, con l'eccezione di 3 pazienti che risultavano positivi per anti-NCS svariati anni prima della diagnosi formale di LES, un dato che suggerisce come l'evoluzione da PAPS a LES possa essere un evento tardivo nella storia naturale di questi pazienti. Il no-

do cruciale su cui è possibile interrogarsi è come mai i pazienti con aPL possano ad un certo punto iniziare a produrre anticorpi diretti contro gli antigeni nucleari. In effetti, gli aPL sono in grado di riconoscere la β_2 GPI esposta sui corpi apoptotici; questo complesso antigenico potrebbe essere dunque presentato come "immunogeno" al sistema immunitario, favorendo alla lunga la produzione di autoanticorpi rivolti verso il materiale nucleare e in particolare verso la cromatina (27, 28). Questo meccanismo potrebbe spiegare l'elevata prevalenza di anti-NCS che abbiamo riscontrato nei pazienti con PAPS. A loro volta, poi, gli immunocomplessi nucleosomi-anti-NCS potrebbero costituire un fattore stimolante le cellule dendritiche plasmacitoidi con una conseguente iperproduzione di interferone di tipo I (29), spostando così l'equilibrio citochinico-infiammatorio verso una evoluzione a LES. Resta ancora da esplorare se tutto questo possa essere rilevante nella definizione dello sviluppo di un LES in pazienti con diagnosi, anche di vecchia data, di PAPS; è comunque certo che lo studio a lungo termine di ampie coorti di pazienti sarà in grado di chiarire meglio la storia naturale della malattia.

RIASSUNTO

È descritto che la sindrome da antifosfolipidi primaria (PAPS) può evolvere in lupus eritematoso sistemico (LES) anche numerosi anni dopo l'esordio di malattia; dati sperimentali suggeriscono che gli anticorpi anti-nucleosomi (anti-NCS) vengano sviluppati nelle prime fasi della malattia lupica e dunque possano essere dei marcatori più precoci di altri (in particolare degli anti-DNA). Prendendo in considerazione un'ampia coorte di PAPS, abbiamo riscontrato una consistente prevalenza di positività per anti-NCS di classe IgG e/o IgM a titolo medio-alto (46% dei pazienti); inoltre, abbiamo descritto tre casi di soggetti che presentavano positività per anti-NCS molti anni prima di sviluppare un LES.

Parole chiave - Anticorpi anti-nucleosomi, anticorpi anti-cromatina, sindrome da antifosfolipidi primaria, lupus eritematoso sistemico.

Key words - *Antinucleosome antibodies, antichromatin antibodies, primary antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus.*

BIBLIOGRAFIA

- Hughes G. The anticardiolipin syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1985; 25: 285-6.
- Alarcón-Segovia D, Sánchez-Guerrero J. Primary antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 1989; 16: 482-8.
- Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1725-34.
- Piette JC, Wechsler B, Frances C, Papo T, Godeau P. Exclusion criteria for primary antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 1993; 20: 1802-3.
- Seisedos L, Muñoz-Rodríguez J, Cervera R, Font J, Ingelmo M. Primary antiphospholipid syndrome evolving into systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1997; 6: 285-6.
- Gomez-Puerta JA, Martin H, Amigo MC, Aguirre MA, Camps MT, Cuadrado MJ, et al. Long-term follow-up in 128 patients with primary antiphospholipid syndrome: do they develop lupus? *Medicine (Baltimore)* 2005; 84: 225-30.
- Tarr T, Lakos G, Bhattoa HP, Szegedi G, Shoenfeld Y, Kiss E. Primary antiphospholipid syndrome as the forerunner of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2007; 16: 324-8.

8. Shoenfeld Y. APS-More systemic disease than SLE. *Clin Rev Allergy Immunol* 2007; 32: 129-30.
9. Holers VM, Girardi G, Mo L, Guthridge JM, Molina H, Vilpando CG, et al. Complement C3 activation is required for anti-phospholipid antibody-induced fetal loss. *J Exp Med* 2002; 195: 211-20.
10. Fischetti F, Durigotto P, Pellis V, Debeus A, Macor P, Bulla R, et al. Thrombus formation induced by antibodies to beta2-glycoprotein I is complement dependent and requires a priming factor. *Blood* 2005; 106: 2340-6.
11. Asherson RA, Piette JC, Cervera R. "Primary", "Secondary", "Seronegative", "Catastrophic" and other subsets of the antiphospholipid syndrome. In: Asherson RA, Cervera R, Piette J-C, Shoenfeld Y eds. The antiphospholipid syndrome II: Autoimmune thrombosis. Elsevier Science 2002: 285-96.
12. Amoura Z, Chabre H, Koutouzov S, Lotton C, Cabrespines A, Bach J-F, Jacob L. Nucleosome restricted antibodies are detected before anti-dsDNA and/or antihistone antibodies in serum of MRL-Mp lpr/lpr and +/+ mice, and are present in kidney eluates of lupus mice with proteinuria. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 1684-8.
13. Burlingame RW, Rubin RL, Balderas RS, Theofilopoulos AN. Genesis and evolution of antichromatin autoantibodies in murine lupus implicates T-dependent immunization with self antigen. *J Clin Invest* 1993; 91: 1687-96.
14. Burlingame RW. Recent advances in understanding the clinical utility and underlying cause of antinucleosome (antichromatin) autoantibodies. *Clinical and Applied Immunology Reviews* 2004; 4: 351-66.
15. Simón JA, 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: 177-81.
16. Andreoli L, Pregnotato F, Burlingame RW, Allegri F, Rizzini S, Fanelli V, et al. Antinucleosome antibodies in primary antiphospholipid syndrome: A hint at systemic autoimmunity? *J Autoimmun* 2008; 30: 51-7.
17. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4: 295-306.
18. Tincani A, Allegri F, Sanmarco M, Cinquini M, Taglietti M, Balestrieri G, et al. Anticardiolipin antibody assay: a metodological analysis for a better consensus in routine determination-an operative project of the European Antiphospholipid Forum. *Thromb Haemost* 2001; 86: 575-83.
19. Balestrieri G, Tincani A, Spatola L, Allegri F, Prati E, Cattaneo R, et al. Anti- β_2 glycoprotein I antibodies. A marker of antiphospholipid syndrome? *Lupus* 1995; 4: 122-30.
20. Brandt JT, Barna LK, Triplett DA. Laboratory identification of lupus anticoagulants: results of the Second International Workshop for Identification of Lupus Anticoagulants. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulants/Antiphospholipid Antibodies of the ISTH. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1597-603.
21. Pincus T, Schur PH, Rose JA, Decker JL, Talal N. Measurement of serum DNA-binding activity in systemic lupus erythematosus. *N Eng J Med* 1969; 281: 701-5.
22. Bernstein RM, Bunn CC, Hughes GRV. Identification of autoantibodies to acid antigens by counterimmunoelectrophoresis. *Ann Rheum Dis* 1982; 41: 554-5.
23. Meroni PL, Ronda N, De Angelis V, Grossi C, Raschi E, Borghi MO. Role of anti-beta2 glycoprotein I antibodies in antiphospholipid syndrome: in vitro and in vivo studies. *Clin Rev Allergy Immunol* 2007; 32: 67-74.
24. Salmon JE and Girardi G. Antiphospholipid antibodies and pregnancy loss: a disorder of inflammation. *J Reprod Immunol* 2008; 77: 51-6.
25. Cervera R, Viñas O, Ramos-Casals M, Font J, Garcia-Carrasco M, Siso A, et al. Antichromatin antibodies in systemic lupus erythematosus: a useful marker for lupus nephropathy. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 431-4.
26. Amoura Z, Koutouzov A, Chabre H, Cacoub P, Amoura I, Musset L, et al. Presence of antinucleosome antibodies in a restricted set of connective tissue diseases. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 76-84.
27. Manfredi AA, Rovere P, Galati G, Heltai S, Bozzolo E, Soldini L, et al. Apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus. I. Opsonization by Antiphospholipid Antibodies. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 205-14.
28. Manfredi AA, Rovere P, Heltai S, Galati G, Nebbia G, Tincani A, et al. Apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus. II. Role of beta2-glycoprotein I. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 215-23.
29. Pascual V, Farkas L and Banchereau J. Systemic lupus erythematosus: all roads lead to type I interferons. *Curr Opin Immunol* 2006; 18: 676-82.