

Gli anticorpi antifosfolipidi: il laboratorio, la patogenesi e la clinica (cosa è utile sapere degli anticorpi antifosfolipidi)

Antiphospholipid antibody: laboratory, pathogenesis and clinical manifestations

A. Tincani, C. Casu, S. Cartella, T. Ziglioli, R. Cattaneo

Servizio di Reumatologia e Immunologia Clinica, Cattedra di Reumatologia, Università degli Studi di Brescia, Spedali Civili

SUMMARY

Antiphospholipid antibodies (aPL) represent a heterogeneous group of antibodies that recognize various antigenic targets including beta2 glycoprotein I (β 2GPI), prothrombin (PT), activated protein C, tissue plasminogen activator, plasmin and annexin A2. The most commonly used tests to detect aPL are: lupus anticoagulant (LAC), a functional coagulation assay, anticardiolipin antibody (aCL) and anti- β 2GPI antibody (anti- β 2GPI), which are enzyme-linked immunoassay (ELISA).

Clinically aPL are associated with thrombosis and/or with pregnancy morbidity. Apparently aPL alone are unable to induce thrombotic manifestations, but they increase the risk of vascular events that can occur in the presence of another thrombophilic condition; on the other hand obstetrical manifestations were shown to be associated not only to thrombosis but mainly to a direct antibody effect on the trophoblast.

Reumatismo, 2010; 62(1):65-75

INTRODUZIONE

Gli anticorpi Antifosfolipidi (aPL) sono diretti verso una serie di proteine plasmatiche che legano con elevata affinità i fosfolipidi anionici (1). I principali bersagli antigenici sono la beta2 Glicoproteina I (β 2GPI) e la protrombina (PT) (2), la proteina C attivata (3), l'attivatore tissutale del plasminogeno (4) e l'annexina A2 (5). Gli aPL correlano con un ampio spettro di manifestazioni cliniche, classicamente trombosi venose e/o arteriose e complicanze ostetriche che rientrano nella definizione della cosiddetta Sindrome da Anticorpi Antifosfolipidi (APS). In queste condizioni gli aPL rivestono un dimostrato e riconosciuto ruolo patogenetico. Esistono inoltre condi-

zioni, probabilmente correlate alla sindrome, ma non incluse negli attuali criteri classificativi perché non sufficientemente specifiche, tra le quali la "pre-APS", la APS sieronegativa e la APS microangiopatica.

È necessario comunque ricordare che gli aPL possono occasionalmente essere riscontrati anche in soggetti asintomatici, possono essere conseguenti all'assunzione di farmaci o a episodi infettivi, oppure possono associarsi a condizioni cliniche diverse dalla APS come le malattie autoimmuni sistemiche.

METODI DI RILEVAZIONE ANTICORPI ANTIFOSFOLIPIDI

Lupus Anticoagulant (LAC)

Il test LAC misura la capacità da parte degli anticorpi antifosfolipidi di prolungare il tempo di coagulazione nei test fosfolipide-dipendenti.

Negli ultimi 13 anni il test è stato eseguito secondo i criteri proposti dallo Scientific Subcommittee

Indirizzo per la corrispondenza:

Dott.ssa Angela Tincani
Servizio di Reumatologia e Immunologia Clinica
Cattedra di Reumatologia
Università degli Studi di Brescia, Spedali Civili
Piazza del Mercato, 15 - 25121 Brescia BS
E-mail: tincani@bresciaumatologia.it

Tabella I - Raccomandazioni per l'esecuzione del test LAC (modificato da Brandt JT et al. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1185-90).

1. Utilizzo di campioni di plasma con residuo di piastrine inferiore a $1 \times 10^9/L$
2. Verifica dell'allungamento del tempo di coagulazione con almeno 2 test fosfolipide-dipendenti:
 - Tempo di Tromboplastina Parziale Attivata (aPTT)
 - Tempo di Coagulazione al Caolino (KCT)
 - Test al Veleno di Vipera Russel diluito (dRVVT)
3. Test di mixing: aggiunta di plasma normale per verificare la mancata correzione del prolungamento del tempo di coagulazione ed escludere deficit di fattori della coagulazione
4. Test di conferma: correzione del tempo di coagulazione con l'aggiunta di fosfolipidi
5. Esclusione di altre coagulopatie

of Standardization of Lupus Anticoagulants/phospholipids dependent Antibodies (6) (Tab. I).

Recentemente lo stesso comitato di esperti ha aggiornato le raccomandazioni, per l'esecuzione dei test (7), inserendo i suggerimenti di seguito riportati.

- Sono state date indicazioni dettagliate in merito alla selezione dei pazienti, in particolare il test andrebbe eseguito in coloro che presentano una significativa probabilità di avere l'APS o in caso di inspiegato prolungamento dell'aPTT.
- È raccomandato l'impiego di due soli test di screening per ridurre il rischio di risultati falsi-positivi: il dRVVT come test di prima scelta, mentre il secondo test dovrebbe essere un aPTT altamente sensibile eseguito con silice come attivatore e con un basso contenuto di PL.
- Il campione di plasma normale da utilizzare nel test di mixing dovrebbe essere preparato *ad hoc* mediante una doppia centrifugazione per garantire un basso residuo piastrinico ($<10^7 \text{ ml}^{-1}$) e per preservare l'attività di tutti i fattori della coagulazione. In corso di gravidanza il range del tempo di coagulazione utilizzato per il LAC andrebbe modificato poiché l'aPTT è ridotto a causa dell'aumento fisiologico del fattore VIII, e il dRVVT subisce modifiche per ragioni ancora sconosciute.
- È stato consigliato di non utilizzare test "integrati" di screening e conferma in pazienti in trattamento cronico con antagonisti della vitamina K.
- La refertazione dei dati dovrebbe prevedere di esprimere i risultati in termini quantitativi e di dare un commento che indichi la presenza/assenza del LAC. In casi borderline dovrebbe essere consigliata la ripetizione del test entro una settimana.

Al fine di ottenere una maggiore sensibilità del LAC in coloro che stanno effettuando un trattamento con anticoagulanti, è consigliabile posticipare l'esecuzione del test 2 settimane dopo la sospensione del trattamento o quando l'INR sia inferiore a 1,5. In alternativa se l'INR è compreso tra 1,5 e 3, è consigliata la diluizione del plasma 1:1 con plasma normale prima dell'esecuzione del test. Nei pazienti in terapia con eparina sono disponibili kits commerciali che impiegano neutralizzatori di eparina (la maggior parte dei dRVVT). È comunque prudente attribuire una qualche relatività ai tests eseguiti in trattamento anticoagulante.

Anticorpi anticardiolipina (aCL)

Gli anticorpi anticardiolipina sono autoanticorpi specifici per fosfolipidi di carica elettrica negativa o per complessi fosfolipidi-proteine.

Il test degli anticorpi aCL, descritto nel 1983 come metodo radio-immunologico, dopo pochi anni è stato convertito in metodo immunoenzimatico (ELISA) e viene tuttora eseguito come tale.

Nel 1990 è stato osservato che il legame di anticorpi aCL altamente purificati al loro antigene copulato alla piastra, richiedeva la presenza di una componente del plasma, identificata nella $\beta 2\text{GPI}$. Questa osservazione ha focalizzato l'attenzione sugli anticorpi diretti verso la sola $\beta 2\text{GPI}$ con conseguente sviluppo di metodiche per il rilevamento diretto di tali anticorpi. Negli studi clinici gli anticorpi anti- $\beta 2\text{GPI}$ sono risultati più specifici per le patologie autoimmuni rispetto al test classico degli anticorpi anti-cardiolipina, che rileva anticorpi anche diretti verso i fosfolipidi come ad esempio nella lue (8).

La standardizzazione del test ELISA per aCL è sempre stata molto dibattuta, pertanto sono stati individuati, dopo studi collaborativi internazionali, alcuni minimi requisiti che i laboratori dovrebbero rispettare nella esecuzione del test (Tab. II) (9-11). Questi prevedono la esecuzione dei campioni in duplicato, visto l'ampio coefficiente di variazione del test, la determinazione del cut-off in ogni laboratorio esaminando un numero adeguato di sieri da soggetti normali, il calcolo del cut-off in percentili, visto che i risultati di tali esami non presentano una distribuzione normale, etc.

Gli studi collaborativi hanno sottolineato il fatto che disporre di materiale di riferimento comune, migliora significativamente la riproducibilità del metodo tra Centri diversi. Questo è stato dimostrato dal gruppo collaborativo Europeo utilizzando anticorpi monoclonali anti- 2GPI (HCAL, IgG e

Tabella II - Raccomandazioni per standardizzare il test aCL-ELISA.

1. Testare i campioni in duplicato
2. Determinare i valori normali in ogni laboratorio esaminando un numero adeguato di sieri da soggetti normali (50 o più), confrontabili per età e sesso con i pazienti
3. Esprimere il calcolo del cut-off in percentili
4. Esprimere i risultati in unità internazionali (GPL o MPL ovvero $\mu\text{g/ml}$ di anticorpo), introducendo in ogni test una curva di calibrazione di almeno 5 punti, creata usualmente con gli standard di Harris
5. Valutazione semi-quantitativa dei risultati (per intervalli)

EY2C9, IgM) prodotti a scopo di ricerca e messi a disposizione dal Prof Takao Koike per migliorare la stabilità dei risultati (12). Dopo la dimostrazione originale i due anticorpi monoclonali sono stati introdotti come “riferimento” anche in varie preparazioni commerciali del test.

Recentemente, per rispondere alle esigenze dei laboratori che richiedono metodi sempre più veloci e che impieghino sempre meno personale, sono stati creati nuovi metodi automatizzati per testare gli aCL. La concordanza dei risultati ottenuti tra i metodi ELISA e quelli automatizzati è risultata abbastanza buona (>90%); le maggiori discrepanze riguardano gli aCL bassi positivi e quindi non così rilevanti nella pratica clinica di pazienti con APS. Risulta perciò importante considerare anche queste nuove possibilità nel bagaglio di mezzi di cui disponiamo, che aiutano nella diagnostica quotidiana, ciascuno con le sue limitazioni (13).

Anticorpi anti β 2-glicoproteina I (anti- β 2GPI)

Dal 1990 è noto che nel test degli aCL, la presenza della β 2GPI risulta essere il principale fattore limitante. Negli anni successivi è stato dimostrato che anticorpi anti- β 2GPI erano un fattore di rischio indipendente per trombosi e complicanze ostetriche (14-17). Perciò la positività degli anti- β 2GPI è stata inclusa nei nuovi criteri classificativi della sindrome da anticorpi antifosfolipidi, nonostante la scarsa standardizzazione del test dovuta all'utilizzo di differenti metodologie nei diversi laboratori. La metodica utilizzata per la ricerca degli anticorpi anti β 2GPI ha alcuni vantaggi tecnici rispetto a quella degli aCL. In primo luogo risulta meno influenzata dalla presenza di anticorpi di origine infettiva diretti contro la cardioplipina. In secondo luogo non sono necessari “cofattori” ed, infine, l'antigene in causa è una proteina, quindi per sua natura, a differenza della cardioplipina, è solubile in acqua e ben ancorabile alla fase solida.

Il test per la ricerca degli anticorpi anti- β 2GPI di isotipo IgG e/o IgM viene eseguito su siero o plasma rispettando le raccomandazioni (18) formulate dall'APL European Forum per la standardizzazione della metodica effettuata con kits commerciali o metodiche home-made, raccomandazioni che, di fatto, sono del tutto simili a quelle sopra descritte per gli aCL. A differenza di questi ultimi, tuttavia, per gli anti- β 2GPI non ci sono unità di misura riconosciute e condivise a livello internazionale. I risultati possono essere espressi in unità ottiche oppure in unità arbitrarie, introducendo in ogni test una curva di calibrazione.

Anche in questo caso, gli anticorpi monoclonali HCAL e EY2C9, che reagiscono con la β 2GPI, possono essere impiegati per consentire una migliore standardizzazione del metodo e incrementare la stabilità dei risultati (19). La loro introduzione, qualora divenisse regola costante, permetterebbe di formulare i risultati in quantità (per esempio nanogrammi) di monoclonale legato.

È importante anche valutare con estrema attenzione i risultati dell'isotipo IgM sia degli aCL sia degli anti- β 2GPI. Nella zona dei bassi positivi infatti, la presenza di fattore reumatoide o di crioglobuline potrebbe causare false positività (20, 21).

Negli ultimi anni, oltre allo sviluppo di metodi automatizzati come quelli citati per gli aCL, sono emersi studi che prevedono l'utilizzo di frammenti di β 2GPI per trovare autoanticorpi diretti contro differenti parti della molecola proteica (domini) in differenti condizioni cliniche (22). In questo senso, sarebbe quindi interessante determinare se l'ELISA e i vari metodi automatizzati mostrano gli stessi “domini” di β 2GPI agli anticorpi presenti nei campioni testati.

Anticorpi antifosfolipidi che non rientrano nei criteri della APS

Esistono anticorpi diretti contro altri fosfolipidi o proteine del plasma. Tra questi vi sono gli anti-protrombina (aPT) (2), gli anti-fosfatidiletanolamina, gli anti-annessina V, gli anti-proteina C (3), gli anti-proteina S, gli anti-fattore attivatore del plasminogeno (23, 24) e gli anti-fattore XII della coagulazione (25). Poiché il loro ruolo non è ancora completamente chiaro, sono stati esclusi dai criteri classificativi della APS.

Recenti studi su tests ELISA suggeriscono che IgG dirette contro la protrombina (PT) umana o contro il complesso PT/fosfatidilserina possano rappresentare fattori di rischio per trombosi, in particolare venose (26, 27). Tali dati sono in accordo con i

risultati dei modelli in vitro che mostrano la capacità da parte degli aPT IgG di interferire con la via anticoagulante della proteina C (28) e di promuovere la generazione della trombina (29). Sono stati sviluppati molti test ELISA per la ricerca di aPT, usando sia la PT umana (31, 39), sia il complesso PT/fosfatidilserina come antigeni in fase solida (28).

Altri studi hanno indagato la correlazione tra una positività per anticorpi anti-fosfatidiletanolamina (aPE) e la presenza di segni clinici caratteristici di APS (32). La fosfatidiletanolamina è un fosfolipide zwitterionico che può essere rilevato, tramite metodo ELISA (o altre metodiche), in pazienti con una sindrome sieronegativa per LAC, aCL e anti- β 2GPI (33). La sola presenza di aPE, in particolare l'isotipo IgM (34), sembra essere un fattore di rischio indipendente sia per lo sviluppo di trombosi inspiegabili (35, 36) sia per lo sviluppo di ricorrenti perdite di gravidanza (37). Quindi anche gli aPE potrebbero rappresentare una valida alternativa da ricercare nei pazienti APS sieronegative.

Ulteriori studi mostrano un'associazione tra IgG dirette contro l'annessina V, rilevate con un test ELISA, ed il verificarsi di complicanze ostetriche (28). Ciò potrebbe essere spiegato considerando che l'annessina V rappresenta la principale sostanza anticoagulante presente nella placenta (38).

Bisogna tuttavia considerare che il valore di test ELISA per la ricerca di anticorpi non β 2GPI dipendenti rimane incerto poiché, nonostante i citati studi di associazione, non si conosce ancora esattamente il loro potenziale patogenetico, il loro significato clinico e non sono disponibili procedure standardizzate per la loro rilevazione.

RUOLO PATOGENETICO

Numerose evidenze sperimentali suggeriscono che gli anticorpi antifosfolipidi possono contribuire direttamente alla patogenesi della APS (41). Vi sono infatti, elementi che dimostrano come questi anticorpi siano in grado di determinare, mediante meccanismi patogenetici diversi, sia una diatesi trombotica sia manifestazioni ostetriche (39).

Meccanismi predisponenti la trombosi

Nell'APS le complicanze trombotiche possono verificarsi in qualsiasi distretto: arterioso o venoso, coinvolgendo vasi di grande e piccolo calibro. Questo significa che a differenza di altre condizioni trombofiliche, nell'APS lo stato di ipercoagulabi-

lità non è "letto vascolare" specifico. Infatti, la presenza degli anticorpi antifosfolipidi risulta in una diatesi trombotica diffusa suggerendo una globale e generale disregolazione della bilancia emostatica (40). Gli esperimenti condotti su modelli animali suggeriscono come gli aPL non siano in grado di indurre manifestazioni trombotiche senza la compresenza di altri fattori di rischio (41, 12). A questo riguardo è stata suggerita l'ipotesi del doppio insulto: gli aPL (primo insulto) aumentano il rischio di eventi trombotici che avvengono in presenza di un'altra condizione trombofilica (secondo insulto) (42).

Reazioni Emostatiche

Proteina C

La proteina C attivata (APC) svolge il suo effetto anticoagulante mediante il legame e l'inattivazione dei fattori VIIIa e Va. È stata suggerita l'ipotesi che il complesso anti β 2GPI- β 2GPI possa competere con il complesso APC per il sito di legame sui fosfolipidi o addirittura possa inibirne completamente l'interazione (43).

Fibrinolisi

Gli anticorpi antifosfolipidi possono interferire anche con la via fibrinolitica, aumentando l'attività dell'inibitore I dell'attivatore del plasminogeno (PAI-I). Si è osservato che gli aPL in presenza di β 2GPI incrementano l'attività del PAI-I, mediante l'inibizione della β 2GPI. Infatti, sembra che quest'ultima, protegga l'attivatore tissutale del plasminogeno dall'azione del PAI-I (44, 45).

Anticorpi antiprotrombina

La protrombina è un altro possibile target degli aPL, infatti anche gli anticorpi antiprotrombina possono competere con il legame della APC ai fosfolipidi a carica elettrica negativa, in particolare alla fosfatidilserina (43). Si ritiene che la clearance dei complessi protrombina-anticorpi possa essere responsabile dell'ipoprotrombinemia della APS, talvolta riscontrata in pazienti con aPT positivi.

Induzione fenotipo cellulare pro-adesivo e pro-infiammatorio

Piastrine

Un possibile ruolo dell'incremento dell'attivazione piastrinica è stato suggerito dalla dimostrazione di aumentati livelli di prodotti di degradazione del trombossano di derivazione piastrinica nelle urine dei soggetti con APS rispetto ai controlli (39). Si è osservato come il legame del complesso β 2GPI-an-

ticorpo ad alcuni recettori piastrinici sia in grado di determinare attivazione piastrinica e conseguente induzione di trombociti A2. Questo meccanismo, per esempio, è stato dimostrato per l'unico membro dei recettori per LDL presente sulle piastrine: l'apoER2 (40) e per la glicoproteina Iba (subunità recettoriale della GPIb-IX-V il cui principale ligando è il fattore di von Willebrand) (46).

Toll-like receptor (TLR)

Pierangeli et al. suggeriscono che almeno uno dei meccanismi patogenetici degli aPL sia correlato al TLR-4. In particolare il legame del complesso aPL/ β_2 GPI al TLR-4 determina l'attivazione delle cellule endoteliali mediante traslocazione del fattore di trascrizione nucleare NF- κ B e fosforilazione del p38MAPK. Questo porta ad up-regolazione di citochine pro-infiammatorie, di molecole di adesione cellulare e del fattore tissutale (TF), analogamente a quanto si verifica in seguito al legame del LPS (lipopolisaccaride batterico) (47).

Complemento

Recentemente anche il sistema del complemento è stato coinvolto nei meccanismi patogenetici della APS.

È stato proposto che gli antifosfolipidi inducano una attivazione del complemento generando in questo modo prodotti di "degradazione" chemotattici per cellule infiammatorie, inducendo la trombosi e il danno tissutale (48). Oku et al hanno osservato che l'ipocomplementemia è comune nei pazienti con APS primaria, riflettendo l'attivazione e il consumo del complemento (49).

Annessina A2

Zhang et al. dimostrano che A2, espressa sulla superficie delle cellule endoteliali non stimolate, lega ad alta affinità la β_2 GPI. Gli anticorpi antifosfolipidi diretti verso la β_2 GPI determinano attivazione delle cellule endoteliali mediante cross-linking con A2 legata alla β_2 GPI. Gli eventi intracellulari che ne derivano comprendono la fosforilazione di p38 MAPK, attivazione di NF- κ B e induzione di ossido nitrico sintetasi (NOS). Questa attivazione porta all'up-regolazione di TF e di citochine pro-infiammatorie (50).

Perdite fetali e complicanze ostetriche

Le manifestazioni ostetriche sono state associate alla APS sin dalla sua prima descrizione. Inizialmente si riteneva che il meccanismo patogenetico fosse fondato sulla trombosi placentare. Questa ipotesi

era basata sull'osservazione di estesi infarti e trombosi placentari in gravidanze di donne con anticorpi antifosfolipidi, esitate in aborti o morti endouterine (51). Non tutte le placente di donne con perdite fetali e aPL hanno segni di trombosi o infarti. Questo suggerisce l'ipotesi che gli aPL possano agire anche mediante altri meccanismi. Studi su modelli animali dimostrano come gli aPL siano in grado di determinare perdite fetali attraverso un effetto diretto dell'anticorpo sul trofoblasto (52, 53) che porta ad un difetto di placentazione, non necessariamente associato a fenomeni trombotici (39).

Placentazione difettiva e legame diretto dell'anticorpo al trofoblasto

È stato dimostrato che la β_2 GPI può legare la fosfatidilserina esposta sulla membrana cellulare esterna del trofoblasto durante la formazione del sincizio, offrendo in questo modo degli epitopi per gli anticorpi anti- β_2 GPI circolanti. Questi anticorpi inducono una perturbazione della membrana cellulare che porta alla riduzione della secrezione della gonadotropina corionica e della invasività del trofoblasto tramite l'anomala espressione di caderina ed integrina, l'inibizione della proliferazione e l'induzione dell'apoptosi (52).

In aggiunta, è stata dimostrata l'espressione di β_2 GPI sulla membrana delle cellule del trofoblasto che spiegherebbe il tropismo placentare degli anticorpi antifosfolipidi (53).

Il complemento

Un importante ruolo patogenetico sul versante ostetrico della sindrome è stato recentemente attribuito all'attivazione del complemento, in particolare è stato dimostrato il coinvolgimento sia della via classica che di quella alterna nei meccanismi di danno.

È stato proposto che la fosfatidilserina esposta sulla superficie cellulare durante la differenziazione ed invasione del trofoblasto possa rappresentare il bersaglio degli aPL. In questo modo gli aPL, potrebbero attivare il complemento mediante la via classica, con conseguente formazione di prodotti di degradazione, che mediano il danno placentare causando perdita fetale o ritardo di crescita. A supporto di questa ipotesi, Salmon et al ipotizzano che l'eparina prevenga la perdita fetale inibendo l'attivazione del complemento sul trofoblasto. Infatti, *in vitro* l'eparina inibisce l'aumento del C3a indotta da aPL e l'incremento del deposito di C3b nel tessuto deciduale attraverso il blocco del clivaggio del C3. Inoltre durante la attivazione del complemento viene cli-

vato un altro fattore, il C5 nel frammento C5a, che sembrerebbe anche esso implicato nel danno fetale, attraverso l'induzione dell'espressione del TF (40).

Annessina V

Uno dei meccanismi protrombotici a livello placentare mediati dagli aPL coinvolge l'Annessina V; questa è una proteina plasmatica anticoagulante che lega i fosfolipidi anionici esposti sulla superficie del trofoblasto in stretto contatto con il sangue andando a formare uno scudo che di fatto protegge la placenta dai fatti trombotici mediante l'inibizione del fattore X e della protrombina. Studi in vitro hanno dimostrato che aPL possono spiazzare l'annexina V sia dal trofoblasto che dall'endotelio, favorendo l'attivazione della cascata della coagulazione (52). È stata inoltre documentata una ridotta distribuzione di annexina V sulla superficie intervillosa placentare, in pazienti con aPL.

LA CLINICA DEGLI ANTICORPI ANTIFOSFOLIPIDI

La persistente presenza di aPL condiziona diversi quadri clinici che vanno dalla ben definita APS alle forme intermedie di malattia, che presentano al-

cune manifestazioni suggestive ma non specifiche per la sindrome, fino ad arrivare ai casi in cui i soggetti portatori possono essere totalmente asintomatici.

Sindrome da anticorpi antifosfolipidi

La APS è definita dall'associazione di manifestazioni trombotiche (arteriose e/o venose) e/o complicanze ostetriche alla positività di almeno uno dei tre test classici per la ricerca di aPL (LAC, aCL e anti-b2GPI) (Tab. III). Per una corretta diagnosi gli aPL devono confermarsi persistentemente positivi, in almeno 2 determinazioni, eseguite a distanza di non meno di 12 settimane l'una dall'altra (54). Le manifestazioni trombotiche in corso di APS presentano una grande variabilità poiché ogni organo e tessuto può essere interessato dalla formazione di trombi: sia i grossi vasi che il microcircolo, sia il distretto venoso che quello arterioso. Nella definizione di APS ostetrica sono incluse diverse manifestazioni patologiche della gravidanza: aborti precoci, perdite fetali, pre-eclampsia precoce e severa con insufficienza placentare, restrizione della crescita fetale e persino la sindrome HELLP (Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelets) (Tab. III) recentemente classificata tra le sindromi da anticorpi anti-fosfolipidi microangiopatiche.

Tabella III - Criteri classificativi della Sindrome da Anticorpi antifosfolipidi.

<i>Criteri clinici</i>
<ol style="list-style-type: none"> 1. Trombosi vascolari: uno o più episodi di trombosi arteriose, venose o dei piccoli vasi, in qualsiasi organo o tessuto, confermate da tecniche di imaging, doppler o dall'istopatologia. In quest'ultimo caso le trombosi devono essere presenti senza concomitanti segni di infiammazione della parete vasale. 2. Patologia ostetrica: <ol style="list-style-type: none"> a) Una o più morti fetali oltre la 10^a settimana il feto deve presentare un normale sviluppo morfologico documentabile da indagini con ultrasuoni o diretta osservazione oppure b) Uno o più parti prima della 34^a settimana, accompagnati da preeclampsia o insufficienza placentare severa oppure c) Tre o più aborti prima della 10^a settimana vanno escluse cause dovute ad anomalie anatomiche, ormonali o cromosomiche materne oppure ad alterazioni cromosomiche di origine paterna.
<i>Criteri laboratoristici</i>
<ol style="list-style-type: none"> 1. Anticorpi anticardiolipina (aCL) β2GPI dipendenti di classe IgG e/o IgM a titolo medio-alto, misurati con metodica ELISA standardizzata in due o più occasioni ad almeno 12 settimane di intervallo. 2. Anticorpi β2glicoproteina I di classe IgG e/o IgM a titolo medio-alto, misurati con metodiche ELISA standardizzata in due o più occasioni ad almeno 12 settimane di intervallo, oppure 3. Lupus Anticoagulant risultato positivo in due rilevazioni a 12 o più settimane di intervallo, rilevato secondo il metodo raccomandato dal Sottocomitato del Lupus Anticoagulant/Phospholipid Dependent Antibodies della Società Internazionale di Trombosi ed Emostasi, consistente nei seguenti passaggi: <ol style="list-style-type: none"> a) Prolungamento di un test di coagulazione dipendente dai fosfolipidi (KCT, aPTT, DRVVT, ecc.); b) Mancata correzione con mixing di plasma normale; c) Correzione ottenuta con aggiunta di fosfolipidi; d) Esclusione di altre coagulopatie.

Il tipo e l'entità delle manifestazioni cliniche sembrerebbe dipendere dal profilo e dal titolo anticorpale, infatti individuare il profilo degli aPL nel paziente potrebbe essere d'aiuto nelle scelte terapeutiche (55). Ad esempio il test degli aCL ha un'elevata sensibilità, ma una bassa specificità determinata dal fatto che tali anticorpi possono risultare positivi anche per l'assunzione di certi farmaci o per infezioni intercorrenti (56). In questo caso gli anticorpi legano direttamente la cardiolipina e la loro presenza non implica generalmente eventi trombotici, si tratta quindi di "falsi" positivi che possono indurre alla formulazione di diagnosi errate. Nell'APS gli aCL di isotipo IgG sembrano associarsi maggiormente ad un coinvolgimento arterioso (stroke cerebrale ed infarto del miocardio) che venoso (trombosi venose profonde) (57). Per quanto riguarda gli anti- β 2GPI probabilmente solo alcuni anticorpi diretti verso particolari domini della β 2GPI hanno un effetto patogenetico (58). Questa ipotesi potrebbe spiegare perché gli studi su questa categoria di anticorpi non forniscano sempre risultati concordi (26, 28). In fine è ampiamente dimostrata la stretta associazione tra la positività del LAC e gli eventi trombotici (60).

Le difficoltà connesse alla standardizzazione delle metodiche di laboratorio e la riconosciuta variabilità dei test (12) pongono dei limiti interpretativi dei risultati e quindi all'impiego degli aPL come fattori di rischio trombotico/ostetrico nei pazienti portatori. Ciascun clinico è pertanto tenuto ad attribuire il giusto "valore" al singolo risultato, basandosi sulla esperienza maturata nella interpretazione dei dati del laboratorio. Comunque, la simultanea positività degli aCL e anti- β 2GPI (stesso isotipo) potrebbe essere d'aiuto nell'individuare aPL con reale valore clinico.

APS probabile

Nel corso degli ultimi anni sono emersi quadri clinici spesso associati ad aPL ma non così specifici da soddisfare i criteri classificativi per APS. Pertanto, sono stati definiti nuovi subset di malattia che comprendono: "pre-APS", sindrome microangiopatica e APS sieronegativa.

Nel lavoro di revisione dei criteri classificativi della APS (57) sono stati definiti anche i sintomi non criterio associati agli aPL, e cioè la livedo reticularis, la malattia cardiaca valvolare, la piastrinopenia, la nefropatia e le manifestazioni neurologiche non ischemiche (61). La situazione clinico-laboratoristica di questi pazienti potrebbe predisporli ad eventi trombotici e per tale motivo viene definita

come pre-APS e frequentemente viene praticato un trattamento profilattico con antiaggreganti o anti-coagulanti.

La sindrome microangiopatica associata ad aPL, acronimo 'MAPS', comprende un gruppo di malattie caratterizzate dall'assenza di trombosi dei grossi vasi e dalla presenza di anemia emolitica microangiopatica. L'esame microscopico in questi pazienti individua microtrombi disseminati, costituiti da piastrine agglutinate, che occludono le arteriole ed i capillari del microcircolo. Fanno parte del gruppo delle MAPS: la Porpora Trombotica Trombocitopenica (PTT), la Sindrome Uremico-Emolitica (SEU), la Sindrome HELLP e la Sindrome Catastrofica (CAPS) (pazienti senza occlusione dei grossi vasi). La diagnosi differenziale delle diverse forme di microangiopatia è spesso difficile per la presenza di caratteristiche cliniche e sierologiche comuni. Infatti in letteratura, sono diverse le segnalazioni di pazienti con aPL che vanno incontro a quadri di associazione tra PTT e sindrome HELLP, sindrome HELLP e CAPS, CAPS che si complica con coagulazione intravascolare disseminata (CID) (62). Queste segnalazioni suggeriscono un *continuum* tra PTT, SEU, sindrome HELLP e CAPS (63).

Sono definite APS sieronegative le condizioni cliniche caratterizzate dalla presenza di tipiche manifestazioni della APS in assenza di positività per aPL alle classiche metodiche di laboratorio (64). Diverse sono le ipotesi formulate allo scopo di spiegare questa apparente contraddizione:

- a) i valori di aCL e LAC possono transitoriamente scendere sotto i livelli soglia per un consumo legato all'evento trombotico;
- b) alcune forme di APS possono essere determinate da anticorpi leganti fosfolipidi diversi dalla cardiolipina;
- c) alcuni tipi di antifosfolipidi, recentemente individuati, possono essere rilevati solo con metodiche diverse da quelle comunemente impiegate; ad esempio gli anticorpi anti-cardiolipina o anti- β 2GPI di isotipo IgA in molti casi non sono inclusi nei kit commerciali.

aPL in soggetti asintomatici

L'osservazione di soggetti con positività persistente degli aPL, ma senza segni o sintomi di malattia, ha suggerito l'ipotesi che in realtà la positività degli aPL sia solo un fattore predisponente per eventi trombotici e/o ostetrici. Sono necessari altri fattori di rischio per determinare l'insorgenza della malattia. I fattori di rischio aggiuntivi sono ad

esempio: ipertensione, aterosclerosi, ipercolesterolemia, immobilità, interventi chirurgici, obesità fumo, uso di contraccettivi orali, trombofilia congenita, ecc. Al momento non esistono indicazioni al trattamento profilattico di trombosi in soggetti sani portatori di aPL; è comunque consigliabile una profilassi primaria in presenza di fattori di rischio modificabili o un attento monitoraggio nel tempo qualora siano presenti rischi non modificabili (65). La positività di aPL in corso di gravidanza rappresenta oltre che un rischio trombotico anche un'importante causa di perdite fetali, parti pretermine ed altre complicanze ostetriche. In questo caso rientra nella pratica clinica l'impiego a scopo profilattico della cardioaspirina, nonostante non esistano dati sufficienti a dimostrarne l'efficacia (66). La sola profilassi con cardioaspirina non sembra invece sufficiente durante il puerperio, un periodo ad elevato rischio trombotico anche per donne aPL negative. In tale occasione è consigliabile l'impiego di eparina a basso peso molecolare. Al fine di evitare errori classificativi, nei criteri revisionati della APS sono state inserite delle avvertenze in relazione ai soggetti anziani nei quali si è osservato un aumento della prevalenza degli aPL (67), ma che d'altra parte presentano anche un più elevato rischio cardiovascolare attribuibile all'invecchiamento e alle comorbidità. Quindi, è utile eseguire una stratificazione dei pazienti in base al rischio considerando l'eventuale presenza di altri fattori classicamente responsabili di trombosi. Per questo l'approccio profilattico deve essere deciso caso per caso tenendo conto dell'età del soggetto, dei fattori di rischio cardiovascolare, della presenza di malattie concomitanti e del profilo degli aPL.

Quando si devono cercare gli antifosfolipidi?

Il consiglio tradizionale è di cercare gli anticorpi antifosfolipidi in tutti i pazienti che presentino sintomi compatibili con i criteri clinici classificativi di Miyakis o sintomi meno specifici come quelli non-criterio.

In particolare la ricerca degli aPL andrebbe eseguita in tutti quei soggetti, di giovane età, che abbiano sviluppato eventi trombotici in assenza di cause note.

Gli aPL vanno però ricercati anche al di fuori della APS e delle sue varianti.

La presenza di questi anticorpi rientra infatti nei criteri classificativi del Lupus Eritematoso Sistemico; per tale motivo la loro ricerca deve far parte della routine di inquadramento di questa malattia.

In altre malattie autoimmuni sistemiche così come in quelle d'organo è stata riscontrata la positività per aPL, è quindi consigliabile testare questi anticorpi in tutte le donne affette da tali patologie che intendano affrontare una gravidanza o al contrario intraprendere una terapia estrogenica.

L'esecuzione dei test di ricerca degli aPL è giustificata anche nei pazienti in terapia con antagonisti del TNF-alfa poiché, oltre alla produzione di ANA e l'insorgenza di malattie autoimmuni (sindrome lupus-simile, vasculite leucocitoclastica e LES) è stato documentato, lo sviluppo e/o l'incremento di una risposta verso i fosfolipidi che predispongono ad eventi cardiovascolari (68, 69).

Perché questi pazienti sviluppino aPL non è chiaro, ma potrebbe essere in relazione con infezioni, anche non clinicamente importanti, correlate allo stato di immunosoppressione.

RIASSUNTO

Gli anticorpi antifosfolipidi sono una famiglia di autoanticorpi diretti verso proteine plasmatiche che legano con elevata affinità i fosfolipidi anionici. I principali antigeni bersaglio sono la beta2glicoproteina I (β 2GPI) e la protrombina (PT), la proteina C attivata, l'attivatore tissutale del plasminogeno e l'annessina A2. Dal punto di vista clinico gli aPL sono strettamente associati ad un gruppo di malattie con manifestazioni ostetriche e/o trombotiche. È stato dimostrato che gli aPL possono esercitare un effetto diretto sulle cellule (endotelio, trofoblasto, etc.) modificandone le caratteristiche biologiche. Questo effetto da un lato sarebbe responsabile di un'alterata placentazione con conseguenti complicanze gravidiche, dall'altro indurrebbe uno stato protrombotico, che, in presenza di un secondo insulto, sarebbe in grado di causare occlusioni vascolari.

La ricerca degli aPL assume una significativa utilità diagnostica qualora venga effettuata nel contesto clinico appropriato escludendo la presenza di eventuali altri fattori di rischio ostetrico e/o trombotico.

Parole chiave - Anticorpi antifosfolipidi, lupus anticoagulant, anti β 2GPI, anticardiolipina, ipotesi patogenetiche.

Key words - *Antiphospholipid antibodies, lupus anticoagulant, anti β 2GPI, anticardiolipin, pathogenetic hypothesis.*

BIBLIOGRAFIA

1. Galli M, Comfurius P, Maassen C, Hemker HC, de Baets MH, van Breda-Vriesman PJ, et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* 1990; 335: 1544-47.
2. Bevers EM, Galli M, Barbui T, Comfurius P, Zwaal RFA. Lupus anticoagulant IgG's (LA) are not directed to phospholipids only, but to a complex of lipid-bound human prothrombin. *Thromb Haemost* 1991; 66: 629-32.
3. Oosting JD, Derksen RH, Bobbink IW, Hackeng TM, Bouma BN, de Groot PG. Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with prothrombin, protein C, or protein S: an explanation for their pathogenic mechanism? *Blood*. 1993; 81: 2618-25.
4. Chen XX, Gu YY, Li SJ, Qian J, Hwang KK, Chen PP et al. Some plasmin-induced antibodies bind to cardiolipin, display lupus anticoagulant activity and induce fetal loss in mice. *J Immunol*. 2007; 178: 5351-56.
5. Cesarman-Maus G, Rios-Luna NP, Deora AB, Huang B, Villa R, Cravioto Mdel C et al. Autoantibodies against the fibrinolytic receptor, annexin A2, in antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2006; 107: 4375-82.
6. Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1185-90.
7. Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand J. H, Ortel T L, Galli M, et al. Update of the guidelines for Lupus Anticoagulant detection. *Journal of Thromb Haemost* 2009; 7: 1737-40.
8. Tincani A, Balestrieri G, Spatola L, Cinquini M, Meroni PL, Roubey RA. Anticardiolipin and anti-beta 2glycoprotein I immunoassays in the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1998; 396-402.
9. Tincani A, Allegri F, Sanmarco M, Cinquini M, Taglietti M, Balestrieri G, et al. Anticardiolipin antibody assay: a methodological analysis for a better consensus in routine determinations a cooperative project of the European Antiphospholipid Forum. *Thromb Haemost* 2001; 86: 575-83.
10. Harris EN, Pierangeli SS. Revisiting the anticardiolipin test and its standardization. *Lupus* 2002; 11: 269-75.
11. Wong RC, Gillis D, Adelstein S, Baumgart K, Favalaro EJ, Hendle MJ, et al. Consensus guidelines on anticardiolipin antibody testing and reporting. *Pathology* 2004; 36: 63-8.
12. Tincani A, Allegri F, Balestrieri G, Reber G, Sanmarco M, Meroni P, et al. Minimal requirements for antiphospholipid antibodies ELISAs proposed by the European Forum on antiphospholipid antibodies. *Thromb Res* 2004; 114: 553-8.
13. Andreoli L, Rizzini S, Allegri F, Meroni P, Tincani A. Are the current attempts at standardization of antiphospholipid antibodies still useful? Emerging technologies signal a shift in direction. *Semin Thromb Hemost* 2008; 34: 356-60.
14. Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T. Anti-beta 2-glycoprotein I antiprothrombin antibodies, and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2003; 102: 2717-23.
15. Reber G, de Moerloose P. Anti-beta 2-glycoprotein I antibodies-when and how should they be measured? *Thromb Res* 2004; 114: 527-31.
16. Faden D, Tincani A, Tanzi P, Spatola L, Lojcono A, Tarantini M, et al. Anti-beta 2-glycoprotein I antibodies in a general obstetric population: preliminary results on the prevalence and correlation with pregnancy outcome. Anti-beta 2-glycoprotein I antibodies are associated with some obstetrical complications, mainly preeclampsia-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1997; 73: 37-42.
17. Lee RM, Branch DW, Silver RM. Immunoglobulin A anti-beta 2-glycoprotein I antibodies in women who experience unexplained recurrent spontaneous abortion and unexplained fetal death. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 185: 748-53.
18. Reber G, Tincani A, Sanmarco M, de Moerloose P, Boffa MC. Proposals for the measurement of anti-beta2-glycoprotein I antibodies. Standardization group of the European Forum on Antiphospholipid Antibodies. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1860-2.
19. Ichikawa K, Tsutsumi A, Atsumi T, Matsuura E, Kobayashi S, Hughes GR et al. A chimeric antibody with the human gamma1 constant region as a putative standard for assays to detect IgG beta2-glycoprotein I-dependent anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I antibodies. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 2461-70.
20. Bahar AM, Kwak JY, Beer AE, Kim JH, Nelson LA, Beaman KD, et al. Antibodies to phospholipids and nuclear antigens in non-pregnant women with unexplained spontaneous recurrent abortion. *J Reprod Immunol* 1993; 24: 213-22.
21. Spadaro A, Riccieri V, Terracina S, Rinaldi T, Taccari E, Zoppini A. Class specific rheumatoid factors and antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2000; 9: 56-60.
22. Iverson GM, von Mhlen CA, Staub HL, Lassen AJ, Binder W, Norman GL. Patients with atherosclerotic syndrome, negative in anti-cardiolipin assays, make IgA autoantibodies that preferentially target domain 4 of beta2-GPI. *J Autoimmun* 2006; 27: 266-271.
23. Cugno M, Cabibbe M, Galli M, Caccia S, Russo R et al. Antibodies to tissue-type plasminogen activator (tPA) in patients with antiphospholipid syndrome: evidence of interaction between the antibodies and the catalytic domain of tPA in 2 patients. *Blood* 2004; 103: 2121-6.
24. Cugno M, Dominguez M, Cabibbe M, Bisiani G, Galli M, Angles-Cano E et al. Antibodies to tissue-type plasminogen activator in plasma from patients with primary antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol*. 2000; 108: 871-5.
25. Bertolaccini ML, Mepani K, Sanna G, Hughes GR, Khamashta MA. Factor XII autoantibodies as a novel marker for thrombosis and adverse obstetric history in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2007; 66: 553-6.

26. Galli M, Borrelli G, Jacobsen EM, et al. Clinical significance of different antiphospholipid antibodies in the WAPS (warfarin in the Antiphospholipid syndrome) study. *Blood* 2007; 110: 1178-83.
27. Atsumi T, Ieko M, Bertolaccini ML, Ichikawa K, Tsutsumi A, Matsuura E, et al. Association of autoantibodies against the phosphatidylserine-prothrombin complex with manifestations of the antiphospholipid syndrome and the presence of lupus anticoagulant. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1982-93.
28. Galli M, Willems GM, Rosing J, Janssen RM, Govers-Riemslog JW, Comfurius P et al. Anti-prothrombin IgG, from patients with anti-phospholipid antibodies inhibits the inactivation of factor Va by activated protein C. *Br J Haematol* 2005; 129: 240-7.
29. Field SL, Hogg PJ, Daly EB, Day YP, Murray B, Owens D et al. Lupus anticoagulants from immune complexes with prothrombin and phospholipid that can augment thrombin production in flow. *Blood* 1999; 94: 3421-31.
30. Arvieux J, Darnige L, Reber G, Bensa JC, Colomb MG. Development of an ELISA for autoantibodies to prothrombin showing their prevalence in patients with lupus anticoagulants. *Thromb Haemost* 1995; 74:1120-5.
31. Galli M, Beretta G, Daldossi M, Bevers EM, Barbui T. Different anticoagulant and immunological properties of anti-prothrombin antibodies in patients with antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 1997; 77: 486-91.
32. Sanmarco M, Boffa MC. Antiphosphatidylethanolamine antibodies and the antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2009; 18: 920-3.33. Sanmarco M. Clinical significance of antiphosphatidylethanolamine antibodies in the so-called "seronegative antiphospholipid syndrome". *Autoimmun Rev* 2009; 20.
34. Vlachoyiannopoulos PG, Beigbeder G, Dueymes M, Youinou P, Hunt JE, Krilis SA. Antibodies to phosphatidylethanolamine in antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus: their correlation with anticardiolipin antibodies and beta 2 glycoprotein-I plasma levels. *Autoimmunity* 1993; 16: 245-9.
35. Sanmarco M, Alessi MC, Harle JR, Sapin C, Aillaud MF, Gentile S. Antibodies to phosphatidylethanolamine as the only antiphospholipid antibodies found in patients with unexplained thromboses. *Thromb Haemost* 2001; 58: 800-5.
36. Sanmarco M, Gayet S, Alessi MC, Audrain M, de Maistre E, Gris JC. Antiphosphatidylethanolamine antibodies are associated with an increased odds ratio for thrombosis. A multicenter study with the participation of the European Forum on antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 2007; 97:949-54.
37. Sugi T, Katsunuma J, Izumi S.I., McIntyre J.A. and Makino T. Prevalence and heterogeneity of antiphosphatidylethanolamine antibodies in patients with recurrent early pregnancy losses, *Fertil Steril* 1999; 71: 1060-5.
38. Lanir N, Aharon A, Brenner B. Procoagulant and anticoagulant mechanisms in human placenta. *Semin Thromb Hemost* 2003; 29: 175-84.
39. Meroni PL, Riboldi P. Pathogenic mechanisms mediating antiphospholipid syndrome. *Curr Opin Rheumatol.* 2001; 13: 377-82.
40. Salmon JE, Groot PG. Pathogenic role of antiphospholipid antibodies. *Lupus* 2008; 17: 405-11.
41. Pierangeli SS, Gharavi AE, Harris En. Experimental thrombosis and antiphospholipid Antibodies: New insight. *Journal of Autoimmunity.* 2000; 15: 241-247.
42. Raschi E, Broggin V, Grossi C, Borghi MO, Pierangeli SS, Meroni PL. Mechanisms of Action of Antiphospholipid Antibodies. *Handbook of Systemic Autoimmune Diseases. Antiphospholipid Syndrome in Systemic Autoimmune Disease* 2009; 4: 55-67.
43. Giannakopoulos B, Passam F, Rahgozar S, Krilis SA. Current concepts on the pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2007; 109: 422-30.
44. Ieko M, Sawada KI, Koike T, Notoya A, Mukai M, Kohno M et al. *Semin Thromb Hemost.* 1999, 25: 503-7.
45. Ieko M, Ichikawa K, Atsumi T, Takeuchi R, Sawada KI, Yasukouchi T et al. Effects of beta2-glycoprotein I and monoclonal anticardiolipin antibodies on extrinsic fibrinolysis. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26: 85-90.
46. Shi T, Giannakopoulos B, Yan X, Yu P, Berndt MC, Andrews RK et al. Antibeta2-Glycoprotein I antibodies in complex with beta2-glycoprotein I can activate platelets in a dysregulated manner via glycoprotein Ib-IX-V. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 2558-67.
47. Pierangeli SS, Vega-Ostertag ME, Raschi E, Liu X, Romay-Penabad Z, De Micheli V et al. Toll-like receptor and antiphospholipid mediated thrombosis: in vivo studies. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 1327-33.
48. Pierangeli SS, Girardi G, Vega-Ostertag M, Liu X, Espinola RG, Salmon J. Requirement of activation of complement C3 and c5 for antiphospholipid antibody-mediated thrombophilia. *Arthritis Rheum* 2005, 52:2120-4.
49. Oku K, Atsumi T, Bohgaki M, Amengual O, Kataoka H, Horita T et al. Complement activation in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 1030-5.
50. Pierangeli SS, Chen PP, Raschi E, Scurati S, Grossi C, Borghi MO et al. Antiphospholipid Antibodies and the Antiphospholipid Syndrome: Pathogenic Mechanism. *Semin Thromb Hemost* 2008; 34: 236-50.
51. Di Simone N, meroni PL, D'Asta M, D'Alessio MC, Caruso A. Pathogenic role of anti-b2-glycoprotein I antibodies on human placenta: functional effects related to implantation and roles of heparin. *Hum Reprod Update* 2007; 13: 189-96.
52. Meroni PL, Gerosa M, Raschi E, Scurati S, Grossi C, Borghi Mo. Updating on the pathogenic mechanism 5 of the antiphospholipid antibodies-associated pregnancy loss. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2008; 34: 332-7.
53. Espinosa G, Cervera R. Antiphospholipid Syndrome. *Arthritis Res Ther* 2008; 10: 230.
54. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi D, Branch DW, Brey RL, Cervera R et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite an-

- tiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4: 295-306.
55. Pengo V, Ruffatti A. Laboratory diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Reumatismo* 2007; 59: 187-91.
 56. Shoenfeld Y, Blank M, Cervera R, Font J, Raschi E, Meroni PL. Infectious origin of the antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 2-6.
 57. Pengo V, Biasiolo A, Pegoraro C, Cucchini U, Noventa F, Iliceto S. Antibody profiles for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2005; 93: 1147-52.
 58. de Laat B, Derksen RH, Urbanus RT, de Groot PG. IgG antibodies that recognize epitope Gly40-Arg43 in domain I of beta 2-glycoprotein I cause LAC, and their presence correlates strongly with thrombosis. *Blood* 2005; 105: 1540-5.
 59. Martinuzzo ME, Forastiero RR, Carreras LO. Anti-2-Glycoprotein-I antibodies detection and association with thrombosis. *Br J Haematol* 1995; 89: 397-402.
 60. Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T. Lupus anticoagulants are stronger risk factors for thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature. *Blood* 2003; 101: 1827-32.
 61. Asherson RA. New subsets of the antiphospholipid syndrome in 2006: "PRE-APS (probable APS)" and microangiopathic antiphospholipid syndromes ("MAPS"). *Autoimmun Rev* 2006; 6: 76-80.
 62. Asherson RA; Espinosa G, Cervera R, Gomez-Puerta JA, Musuruana J, Bucciarelli S et al. Disseminated intravascular coagulation in catastrophic antiphospholipid syndrome: clinical and haematological characteristics of 23 patients. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 943-6.
 63. Asherson R, Cervera R, Merrill J. Thrombotic microangiopathic antiphospholipid syndromes: a continuum of conditions? *Future Rheumatol* 2006; 1: 1-9.
 64. Hughes GR, Khamashta MA. Seronegative antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 1127.
 65. Levine JS, Branch DW, Rauch J. The antiphospholipid syndrome. *N Eng J med*. 2002; 346: 752-63.
 66. James AH, Brancazio LR, Price T. Aspirin and reproductive outcomes. *Obstet Gynecol Surv* 2008; 63:49-57.
 67. Meroni PL, Mari D, Monti D, Coppola R, Capri M, Salvio S et al. Anti-beta 2 glycoprotein I antibodies in centenarians. *Exp Gerontol* 2004; 39:1459-65.
 68. Ferraccioli GF, Gremese E. Autoantibodies and thrombophilia in RA: TNFalpha and TNFalpha blockers. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 613-5.
 69. Jonsdottir T, Forslid J, van Vollenhoven A, Harju A, Brannemark S, Klareskog L, et al. Treatment with tumour necrosis factor alpha antagonists in patients with rheumatoid arthritis induces anticardiolipin antibodies. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 1075-8.