

Clinica della sindrome da anticorpi antifosfolipidi e diagnosi di anticoagulante tipo lupus

M. Galli

Divisione di Ematologia, Ospedali Riuniti, Bergamo

Riassunto

La sindrome da anticorpi antifosfolipidi (APS) è definita dall'associazione tra manifestazioni trombotiche (venose e/o arteriose) e/o complicanze della gravidanza e almeno uno dei 3 più comuni anticorpi antifosfolipidi (aPL) (anticoagulante tipo lupus, LAC; anticorpi anticardiolipina, aCL, IgG e/o IgM; anticorpi anti- β 2glicoproteina I, a β 2GPI, IgG e/o IgM).

La presenza degli aPL è fondamentale per la diagnosi corretta di APS. Studi clinici hanno dimostrato che il LAC è più fortemente associato al rischio di trombosi venose ed arteriose rispetto agli aCL e a β 2GPI. Sta, inoltre, emergendo il concetto che il LAC- β 2GPI-dipendente sia l'anticorpo più rilevante rispetto al rischio di trombosi. Al contrario, il LAC- β 2GPI-indipendente (ovvero, quello che dipende dalla protrombina) non aumenta il rischio trombotico dei pazienti.

Sul piano terapeutico i soggetti asintomatici aPL-positivi non richiedono la profilassi antitrombotica, poiché il loro rischio di primo evento è < 1% pazienti/anno. Si consiglia la profilassi in caso di

intervento chirurgico, immobilità prolungata o altre situazioni di aumentato rischio di trombosi e l'eliminazione o la correzione, per quanto possibile, dei fattori acquisiti di rischio trombotico. La recidiva di trombosi venosa profonda (TVP) dei pazienti con APS ha una prevalenza compresa tra il 22 ed il 69%. Il tipo di trombosi è spesso predittivo del successivo evento. L'anticoagulazione a lungo termine con warfarina ad intensità moderata (PT INR 2,0 e 3,0) riduce il rischio di recidiva trombotica dell'80-90%. Ancora incerto è il trattamento più adeguato della recidiva di TVP in corso di terapia con warfarina. Possibili opzioni sono: eparina a basso peso molecolare o non-frazionata, warfarina ad alta intensità (PT INR 3,0-4,0), oppure warfarina con antiaggregante piastrinico. I pazienti che hanno avuto un evento arterioso hanno un rischio annuo di recidiva intorno all'11%, indipendentemente dal tipo di profilassi secondaria con warfarina ad intensità intermedia (PT INR 1,4-2,8) o aspirina (325 mg/die).

Summary

Antiphospholipid Syndrome: clinical features and diagnosis

The antiphospholipid antibodies syndrome (APS) is defined by the combination of thrombotic events (venous and / or arterial) and /or pregnancy-related complications and at least one of the 3 most common antiphospholipid antibodies (aPL) (lupus anticoagulant, LAC; anticardiolipin antibodies, aCL-Ab, IgG and / or IgM; antibodies versus β 2-glycoprotein I, a β 2GPI, IgG and /or IgM. The presence of aPL is essential for the correct diagnosis of APS.

Clinical studies have shown that LAC is more stron-

gly associated with risk of arterial and venous thrombosis rather than to CL and β 2GPI antibodies. The LAC- β 2GPI-dependent antibody seems to be the most important antibody in the risk of thrombosis, on the contrary the LAC- β 2GPI-independent antibody (LAC prothrombin dependent) does not increase the thrombotic risk in patients.

Asymptomatic APL-positive subjects do not require antithrombotic prophylaxis, because their risk of first event is <1% patients per year. Prophylaxis is recommended in case of surgery, prolonged immobility or in other situations of increased risk of thrombosis, and the removal or correction of the acquired thrombotic

risk factors if possible.

The recurrence of deep vein thrombosis (DVT) in patients with APS has a prevalence between 22 and 69%. The type of thrombosis is often predictive of the subsequent events. The long-term anticoagulation with moderate-intensity warfarin (PT INR 2,0 and 3,0) reduces the risk of thrombotic recurrence by 80 to 90%. It is still uncertain what is the most suitable treatment of the recurrence of DVT while under warfarin therapy. Possible options are: low molecular weight

heparin or unfractionated heparin, high-intensity warfarin (PT INR 3,0-4,0) or warfarin with anti-platelet drugs. Patients who had an arterial thrombosis have a yearly risk of recurrence around 11%, independently from the type of secondary prophylaxis with intermediate-intensity warfarin (PT INR 1,4-2,8) or aspirin (325 mg / day).

Key-words: Antiphospholipid Syndrome, diagnostic criteria, Lupus anticoagulant, β 2-glycoprotein I, Anticardiolipin antibodies.

Definizione di sindrome da anticorpi antifosfolipidi

La presenza degli anticorpi antifosfolipidi (aPL) in pazienti con trombosi venose e/o arteriose e complicanze ostetriche viene definita sindrome da anticorpi antifosfolipidi (APS)¹. Ne sono state descritte due forme: "primaria", in assenza di una patologia sottostante² e secondaria, specie nell'ambito del lupus eritematoso sistemico³. Nel 2006 sono stati aggiornati i criteri per la diagnosi di APS¹. Le trombosi possono verificarsi in qualunque sede e, con la sola eccezione delle tromboflebiti superficiali, la loro diagnosi deve basarsi su metodi oggettivi o studi di istopatologia. In quest'ultimo caso, non si devono trovare segni di flogosi nella parete vasale.

Gli aPL sono un'ampia famiglia di immunoglobuline di isotipo G, M, oppure, anche se meno frequentemente, A, a lungo considerate dirette contro i fosfolipidi a carica netta negativa. I primi anticorpi identificati sono l'anticoagulante lupico (LAC)⁴ e gli anticorpi anticardiolipina (aCL)⁵. In realtà, all'inizio degli anni '90 alcuni laboratori hanno dimostrato che il LAC e gli aCL non riconoscono i fosfolipidi, bensì proteine plasmatiche legate ad appropriate superfici anioniche. Tra di esse, la β 2-glicoproteina I (β 2GPI) e la protrombina (PT) sono gli antigeni più comuni e studiati. La β 2GPI è necessaria per la reattività della maggior parte degli aCL nei tests ELISA⁶⁻⁸, mentre il LAC è un inibitore acquisito della coagulazione che allunga i tests fosfolipide-dipendenti⁹, causato da specifici sottogruppi di a β 2GPI ed aPT¹⁰⁻¹².

I criteri di laboratorio definiti a Sapporo prevedono la positività persistente nel tempo di aCL, e/o a β 2GPI e/o LAC. Gli aPT sono, invece, stati esclusi. Gli aCL e gli a β 2GPI debbono essere di isotipo G oppure M, avere titolo medio-alto (ovvero, > 40 unità e > 99 percentile, rispettivamente) ed essere misurati mediante tests ELISA. Il LAC viene diagnosticato secondo i criteri proposti dallo *Scientific Subcommittee of Standardization of Lupus Anticoagulants/Phospholipid-dependent Antibodies*¹³. Questi criteri sono attualmente in corso di aggiornamento¹⁴: in particolare, vengono date indicazioni dettagliate in merito alla selezione dei pazienti, alla modalità di gestione preanalitica dei campioni, al

tipo e numero di tests coagulativi da utilizzare nella fase di "screening", alla modalità di esecuzione dei tests di *mixing* e di "correzione", alla refertazione e trasmissione dei risultati dei tests.

Secondo i criteri di Sapporo si pone diagnosi di APS in presenza di almeno un criterio clinico ed uno di laboratorio.

Gli antigeni degli aPL e la fisiopatologia della trombosi

La β 2GPI è costituita da 345 aminoacidi organizzati in 5 *domains*, ha un peso molecolare di circa 50 kDa, una concentrazione plasmatica di circa 0,15-0,3 mg/mL, ed è sintetizzata dal fegato. Studi cristallografici hanno dimostrato una struttura a "J" formata dall'allineamento dei primi quattro *domain*, mentre il quinto è aberrante¹⁵. Quest'ultimo *domain* contiene numerosi residui di lisina, che sono responsabili dell'interazione elettrostatica della molecola con i fosfolipidi anionici delle membrane¹⁶. I primi due *domains* sono, invece, principalmente coinvolti nell'interazione con gli a β 2GPI¹⁷. Recentemente, è stato proposto un adattamento della struttura della β 2GPI, che presenta una forma a "S" piuttosto che a "J", a causa della rotazione tra i *domain* II e III¹⁸. Queste differenze potrebbero dipendere dalle condizioni di forza ionica e pH in cui gli esperimenti sono stati condotti. Le funzioni biologiche della β 2GPI sono ancora piuttosto oscure. Infatti, sembra in grado di modulare il metabolismo delle lipoproteine, di avere un effetto antiaggregante piastrinico, di interferire con alcune reazioni coagulative e di facilitare l'eliminazione delle cellule apoptotiche¹⁹⁻²². In realtà, pazienti congenitamente carenti di β 2GPI non soffrono di nessuna manifestazione clinica di rilievo²³ e i topi "*knock out*" per il gene della β 2GPI sono relativamente normali²⁴.

La PT è una glicoproteina di 579 aminoacidi, sintetizzata dal fegato, ha un peso molecolare di 72 kDa ed una concentrazione plasmatica di circa 0,1 mg/mL²⁵. La regione aminoterminale contiene 10 residui glutamici γ -carbossilati necessari per l'interazione calcio-mediata con i fosfolipidi anionici. Tra gli aminoacidi 40 e 270 sono contenuti due "*kringle*" *domains*, mentre la parte carbossiterminale contiene il *domain* serin-pro-

teasico in forma di zimogeno. Questo viene attivato (così da avere la trombina) mediante il clivaggio in posizione Arg271 e Arg259 da parte del complesso protrombinasico, che consiste dei fattori Xa e Va assemblati su una superficie fosfolipidica. Gli aPL riconoscono diversi epitopi della PT²⁶. In particolare, gli aPT reagiscono con la protrombina intera, la pretrombina 1 (il segmento carbossiterminale della PT), e la DIP- α -trombina (il segmento carbossiterminale della pretrombina 1); gli anticorpi, invece, non reagiscono con il frammento 1 (il segmento aminotermale della PT) e il frammento 2 (il segmento aminotermale della pretrombina 1).

La maggior parte degli aPL non riconosce il proprio antigene in soluzione, bensì legato ad una superficie anionica (non necessariamente fosfolipidica). Non è ancora del tutto chiaro se ciò sia dovuto al riconoscimento di epitopi criptici – resi disponibili solo dopo il legame dell'antigene ad appropriate superfici anioniche – oppure alla bassa affinità anticorpale. Diversi gruppi²⁷⁻³⁰ hanno dimostrato che la maggior parte degli a β 2GPI ed aPT sono a bassa affinità. In entrambi i casi, infatti, la porzione F(ab)2 dell'anticorpo interagisce con due molecole adiacenti di antigene, causando una sostanziale riduzione della costante di dissociazione dell'antigene dalla superficie. I complessi trimolecolari stabili così formati interferiscono con la formazione dei complessi fosfolipide-dipendenti della coagulazione. Ciò spiega l'attività LAC esercitata da sottogruppi di anticorpi a β 2GPI ed aPT. La β 2GPI, infatti, è un debole inibitore dell'attivazione della PT¹¹ e del fattore X³¹. Gli a β 2GPI ne amplificano ed accelerano l'effetto sull'attivazione protrombinica¹¹, mentre ne diminuiscono quello sulla generazione del fattore Xa³¹. D'altro canto, gli aPT inibiscono direttamente l'attivazione della PT, riducendone la disponibilità¹⁰ e, in presenza di protrombina, calcio e fosfolipidi anionici, anche quella del fattore X³². Perciò, gli a β 2GPI ed aPT agiscono sulle medesime reazioni della coagulazione con meccanismi completamente diversi e con effetti in parte opposti.

Nella maggior parte dei pazienti, l'attività LAC è causata da una combinazione di a β 2GPI ed aPT³³. Il contributo dei due anticorpi può essere distinto aggiungendo al plasma vescicole fosfolipidiche composte da sola cardiolipina oppure da una miscela di fosfatidilserina e fosfatidilcolina: nel primo caso viene neutralizzata solo l'attività LAC espressa dagli a β 2GPI, mentre nel secondo caso entrambi gli anticorpi vengono neutralizzati³⁴. Un altro modo per discriminare tra i due tipi di anticorpi è stato descritto dal gruppo di Pengo e collaboratori³⁵, i quali hanno dimostrato che riducendo la concentrazione di calcio nel sistema coagulativo l'attività LAC β 2GPI-dipendente viene amplificata. Recentemente, de Laat e collaboratori hanno dimostrato che l'attività LAC β 2GPI-dipendente è causata da anticorpi diretti contro la sequenza Gly40-Arg43 espressa dal primo dominio della β 2GPI³⁶ ed è retro-

spettivamente associata ad un aumentato rischio di trombosi venose^{36,37}. Poiché è stato sviluppato un test ELISA in grado di identificare gli anticorpi diretti contro questa sequenza³⁶, è verosimile che in un prossimo futuro studi prospettici potranno confermare questa associazione. L'interazione degli anticorpi anti-sequenza Gly40-Arg43 con il sistema anticoagulante dell'annessina V³⁸ e della proteina C³⁹ può, almeno in parte, spiegare il rischio trombotico di questi pazienti.

Altri antigeni degli aPL sono la proteina S, la proteina C (attivata), i chininogeni ad alto e basso peso molecolare, i fattori XII e VII/VIIa della coagulazione, l'annessina V, le lipoproteine a bassa densità ossidate, l'attivatore tissutale del plasminogeno, la frazione C4 ed il fattore H del complemento⁴⁰⁻⁴⁷. Poiché la maggior parte di queste proteine è coinvolta nei meccanismi di controllo della coagulazione del sangue, si può ipotizzare che anticorpi capaci di interferire con la loro concentrazione e/o attività possano spostare in senso protrombotico il normale equilibrio emostatico. Negli ultimi anni sono stati identificati alcuni recettori cellulari, un recettore *Toll like* sulle cellule endoteliali⁴⁸, l'annessina A2 sulle cellule endoteliali e sui monociti⁴⁹ e l'apo ER' sulle piastrine⁵⁰, a cui la β 2GPI è in grado di legarsi. de Groot e Derksen⁵¹ hanno ipotizzato che, a seguito del legame, gli anticorpi a β 2GPI possano formare dei complessi trimolecolari sulla superficie cellulare, innescando, così, un processo di attivazione delle cellule, che sposta in senso protrombotico l'equilibrio emostatico.

Diversi modelli murini di APS suggeriscono che gli aPL possano svolgere un ruolo causativo nello sviluppo delle trombosi e delle complicanze ostetriche. Infatti, l'immunizzazione con la β 2GPI⁵² o con gli aPL⁵³ comporta un aumentato riassorbimento fetale (l'equivalente murino della poliabortività), mentre la somministrazione di un anticorpo monoclonale umano derivato da un paziente con la sindrome provoca trombosi nei topi⁵⁴. Topi sottoposti ad infusione endovenosa di aPL e successivamente a danno della vena femorale sviluppano trombi nella sede di ingiuria vascolare, che sono di dimensioni maggiori rispetto agli animali di controllo⁵⁵. In un modello di aterosclerosi murina (topi *knock out* per il gene del recettore delle LDL) l'immunizzazione con aCL umani accelera i processi di aterosclerosi⁵⁶, fornendo un'ulteriore prova della patogenicità degli aPL.

Una relazione causa-effetto diretta tra gli aPL e le complicanze trombotiche e ostetriche non è ancora stata data negli esseri umani.

Epidemiologia della trombosi

Poiché gli aPL sono eterogenei, non sempre associati con le manifestazioni cliniche della sindrome, e la loro diagnosi di laboratorio poco standardizzata, il modo migliore per selezionare i tests più utili nella pratica quotidiana dovrebbe essere basato sui risultati de-

gli studi clinici. A questo proposito, abbiamo condotto una revisione sistematica della letteratura per sostenere l'inclusione del LAC, degli aCL, degli a β 2GPI ed aPT come criteri di laboratorio della APS^{57,58}.

Per quanto riguarda il LAC e gli aCL abbiamo selezionato studi clinici prospettici, "cross-sectional", caso-controllo e ambispettivi, perché forniscono informazioni diverse e complementari sulla durata degli aPL ed il rischio trombotico. Tale selezione è stata impossibile per gli a β 2GPI ed aPT, poiché la maggior parte degli studi era retrospettiva. La revisione sistematica ha stabilito che il LAC è un forte fattore di rischio per trombosi, indipendentemente dal tipo e sede della trombosi, presenza del lupus eritematoso sistemico e tests di laboratorio usati per identificare l'inibitore. Al contrario, gli aCL ed a β 2GPI mostravano associazioni significative solo in situazioni selezionate, e non emergeva un ruolo per gli aPT.

Terapia della trombosi

I soggetti asintomatici aPL-positivi non richiedono la profilassi antitrombotica, poiché il loro rischio di primo evento è < 1% pazienti/anno⁵⁹. Si consiglia la profilassi in caso di intervento chirurgico, immobilità prolungata o altre situazioni di aumentato rischio di trombosi e l'eliminazione o la correzione, per quanto possibile, dei fattori acquisiti di rischio trombotico^{60,61}.

La recidiva di trombosi venosa profonda (TVP) dei pazienti con APS ha una prevalenza compresa tra il 22 ed il 69% ed un'incidenza annua > 10% in caso di sospensione della profilassi antitrombotica secondaria entro 6 mesi dal primo evento venoso⁶²⁻⁶⁴. Il tipo di trombosi è spesso predittivo del successivo evento; infatti, nel 70% dei casi una TVP è seguita da un'altra TVP. L'anticoagulazione a lungo termine con warfarina ad intensità moderata (PT INR 2,0 e 3,0) riduce il rischio di recidiva trombotica dell'80-90%⁶⁵. Ancora incerto è il trattamento più adeguato della recidiva di TVP in corso di terapia con warfarina. Possibili opzioni sono: eparina a basso peso molecolare o non-frazionata, warfarina ad alta intensità (PT INR 3,0-4,0), oppure warfarina con antiaggregante piastrinico⁶⁵. I pazienti che hanno avuto un evento arterioso (più comunemente si tratta di ischemia cerebrale) hanno un rischio annuo di recidiva (venosa o arteriosa) intorno all'11%, indipendentemente dal tipo di profilassi secondaria con warfarina ad intensità intermedia (PT INR 1,4-2,8) o aspirina (325 mg/die)^{66,67}.

Conclusione

Il significato biologico e clinico dei diversi aPL resta ancora in parte da chiarire. Questa incertezza riconosce numerose ragioni - tra le quali l'eterogeneità antigenica, la policlonalità anticorpale, e l'insufficiente standardizzazione diagnostica - e spiega perché non sia ancora stata data una convincente dimostrazione dell'effetto protrombotico degli aPL *in vivo*. Di conseguen-

za, anche i risultati della maggior parte degli studi clinici sull'APS non sono conclusivi e rendono necessaria l'esecuzione di nuovi studi ben disegnati per stabilire quali, tra i diversi anticorpi, siano utili fattori di rischio trombotico.

Bibliografia

1. 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. *J Thromb Haemost* 2006; 4:295-306.
2. Asherson RA, Khamashta MA, Ordi-Ros J, Derksen RH, Machin SJ, Barquinero J, et al. The "primary" antiphospholipid syndrome; major clinical and serological features. *Medicine (Baltimore)* 1989; 68:366-74.
3. Alarcon-Segovia D, Deleze M, Oria CV, Sanchez-Guerrero J, Gomez-Pacheco L. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome in SLE. A prospective analysis of 500 consecutive patients. *Medicine* 1989; 68:353-65.
4. Mueller JF, Ratnoff O, Heinle RW. Observations on the characteristics of an unusual circulating anticoagulant. *J Lab Clin Med* 1951; 38:254-61.
5. Pierangeli SS, Harris EN. Antibodies to cardiolipin and other phospholipids. In: Asherson RA, Cervera R, Piette J-C, Shoenfeld Y, eds. *The Antiphospholipid Syndrome II. Autoimmune thrombosis*. Amsterdam: Elsevier; 2002. p. 29-43.
6. Galli M, Comfurius P, Maassen C, Hemker HC, de Baets MH, van Breda-Vriesman PJC, et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* 1990; 335:1544-7.
7. McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Antiphospholipid antibodies are directed against a complex antigen that include a lipid-binding inhibitor of coagulation: b2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:4120-7.
8. Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K, Koike T. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet* 1990; 336:177-8.
9. Triplett DA, Boffa MC. Lupus anticoagulant: detection, standardization and heterogeneity. In: Asherson RA, Cervera R, Piette J-C, Shoenfeld Y, eds. *The Antiphospholipid Syndrome II. Autoimmune thrombosis*. Amsterdam: Elsevier; 2002. p. 23-8.
10. 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.
11. Galli M, Comfurius P, Barbui T, Zwaal RFA, Bevers EM. Anticoagulant activity of b2-glycoprotein I is potentiated by a distinct subgroup of anticardiolipin antibodies. *Thromb Haemost* 1992; 68:297-300.
12. 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.
13. Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. *Thromb*

- Haemost 1995; 74:1185-90.
14. Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, et al. Update of the guidelines for measuring the presence of Lupus Anticoagulant. (in stampa).
 15. Bouma B, de Groot PG, van den Elsen JM, Ravelli RB, Schouten A, Simmelink MJ, et al. Adhesion mechanism of human beta(2)-glycoprotein I to phospholipids based on its crystal structure. *Embo J* 1999; 18:5166-74.
 16. Hunt J, Krilis S. The fifth domain of beta2-glycoprotein I contains a phospholipid binding site (Cys281-Cys288) and a region recognized by anticardiolipin antibodies. *J Immunol* 1994; 152:653-9.
 17. McNeeley PA, Dlott JS, Furie RA, Jack RM, Ortel TL, Triplett DA, et al. b2-glycoprotein I-dependent anticardiolipin antibodies preferentially bind the amino terminal domain of b2-glycoprotein I. *Thromb Haemost* 2001; 86:590-5.
 18. Hammel M, Kriechbaum M, Gries A, Kostner GM, Lagner P, Preassl R. Solution structure of human and bovine beta(2)-glycoprotein I revealed by slamm-angle X-ray scattering. *J Mol Biol* 2002; 321:85-97.
 19. Wurm H, Beubler E, Plz E, Holasek A, Kostner G. Studies on the possible function of beta 2-glycoprotein-I: influence in the triglyceride metabolism in the rat. *Metabolism* 1982; 31:484-6.
 20. Nimpf J, Wurm H, Kostner GM. Interaction of beta 2-glycoprotein-I with human blood platelets: influence upon the ADP-induced aggregation. *Thromb Haemost* 1985; 54:397-401.
 21. Nimpf J, Bevers EM, Boman PH, Till U, Wurm H, Kostner GM, et al. Prothrombinase activity of human platelets is inhibited by beta 2-glycoprotein-I. *Bioch Biophys Acta* 1986; 884:142-9.
 22. Balasubramanian K, Chandra J, Schroit AJ. Immune clearance of phosphatidylserine-expressing cells by phagocytes. The role of beta(2)-glycoprotein I in macrophage recognition. *J Biol Chem* 1997; 272:3113-7.
 23. Bancsi LFJMM, van der Linden IK, Bertina RG. b2-glycoprotein I deficiency and the risk of thrombosis. *Thromb Haemost* 1992; 67:649-53.
 24. Sheng YH, Reddel SW, Herzog H, Wang YX, Brighton T, France MP, et al. Impaired thrombin generation in beta(2)-glycoprotein I null mice. *J Biol Chem* 2001; 276:13817-21.
 25. Kalafatis M, Swords NA, Rand MD, Mann KG. Membrane-dependent reactions in blood coagulation: role of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Bioch Biophys Acta* 1994; 1227:113-29.
 26. Galli M, Barbui T. Antiprothrombin antibodies: detection and clinical significance in the antiphospholipid syndrome. *Blood* 1999; 93:2149-57.
 27. Willems GM, Janssen MP, Pelsers MM, Comfurius P, Galli M, Zwaal RFA, et al. Role of divalency in the high-affinity binding of anticardiolipin antibody-b2-glycoprotein I complexes to lipid membranes. *Biochemistry* 1996; 35:13833-42.
 28. Willems GM, Janssen MP, Comfurius P, Galli M, Zwaal RFA, Bevers EM. Kinetics of prothrombin-mediated binding of lupus anticoagulant antibodies to phosphatidylserine-containing phospholipid membranes: an ellipsometric study. *Biochemistry* 2002; 41:14357-63.
 29. Arnout J, Wittevrongel C, Vanrusselt M, Hoylaerts M, Vermynen J. Beta-2-glycoprotein I dependent lupus anticoagulants form stable bivalent antibody-beta-2-glycoprotein I complexes on phospholipid surfaces. *Thromb Haemost* 1998; 79:79-86.
 30. Field SL, Chesterman CN, Dai YP, Hogg PJ. Lupus antibody bivalency is required to enhance prothrombin binding to phospholipid. *J Immunol* 2001; 166:6118-25.
 31. Shi W, Chong BH, Hogg PJ, Chesterman CN. Anticardiolipin antibodies block the inhibition by b2-glycoprotein I of the factor Xa generating activity. *Thromb Haemost* 1993; 70:342-5.
 32. Permpkul P, Rao LVM, Rapaport SI. Functional and binding studies of the roles of prothrombin and b2-glycoprotein I in the expression of lupus anticoagulant activity. *Blood* 1994; 83:2878-92.
 33. Horbach DA, van Oort E, Derksen RH, de Groot PG. The contribution of anti-prothrombin antibodies to lupus anticoagulant activity: discrimination between functional and non-functional anti-prothrombin antibodies. *Thromb Haemost* 1998; 79:790-5.
 34. Simmelink MJA, Derksen RH, Arnout J, de Groot PG. A simple method to discriminate between b2-glycoprotein I- and prothrombin-dependent lupus anticoagulants. *J Thromb Haemost* 2003; 1:740-7.
 35. Pengo V, Biasiolo A, Pegoraro C, Iliceto S. A two-step coagulation test to identify ab2-glycoprotein I lupus anticoagulants. *J Thromb Haemost* 2004; 2:702-7.
 36. De Laat B, Derksen RH, Urbanus RT, de Groot PG. IgG antibodies that recognize epitope Gly40-Arg43 in domain I of b2-glycoprotein I cause LAC, and their presence correlates strongly with thrombosis. *Blood* 2005; 105:1540-5.
 37. De Laat HB, Derksen RH, Urbanus RT, Roest M, de Groot PG. b2-glycoprotein I-dependent lupus anticoagulant highly correlates with thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2004; 104:3598-602.
 38. De Laat B, Wu XX, van Lummel M, Derksen RH, de Groot PG, Rand JH. Correlation between antiphospholipid antibodies that recognize domain I of beta2-glycoprotein I and a reduction in the anticoagulant activity of annexin A5. *Blood* 2007; 109:1490-4.
 39. De Laat B, Eckmann CM, van Schagen M, Meijer AB, Mertens K, van Mourik JA. Correlation between the potency of a beta2-glycoprotein I-dependent lupus anticoagulant and the level of resistance to activated protein C. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2008; 19:757-64.
 40. 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.
 41. Vaarala O, Alftan G, Jauhainen M, Leirisalo-Repo M, Aho K, Palosuo T. Cross-reaction between antibodies to oxidized lipoprotein and to cardiolipin in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1993; 341:923-5.
 42. Matsuda J, Saitoh N, Gohchi, Gotoh M, Tsukamoto M. Anti-annexin V antibody in systemic lupus erythematosus patients with lupus anticoagulant and/or anticardiolipin antibodies. *Am J Hematol* 1994; 47:56-8.
 43. Sugi T, McIntyre JA. Autotibodies to phosphatidylethanolamine (PE) recognize a kininogen-PE complex. *Blood* 1995; 86:3083-9.
 44. Jones DW, Gallimore MJ, Harris SL, Winter M. Antibodies to factor XII associated with lupus anticoagulant.

- Thromb Haemost 1999; 81:387-90.
45. Carson CW, Comp PC, Esmon NL. Thrombomodulin antibodies inhibit protein C activation and are found in patients with lupus anticoagulant and unexplained thrombosis [Abstract]. *Arthritis Rheum* 1994; 37:S296.
 46. 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.
 47. Bidot CJ, Jy W, Horstman LL, Huisheng H, Jimenez JJ, Yaniz M, et al. Factor VII/VIIa: a new antigen in the antiphospholipid antibody syndrome. *Br J Haematol* 2003; 120:618-26.
 48. Raschi E, Testoni C, Bosisio D, Borghi MO, Koike T, Mantovani A, et al. Role of the MyD88 transduction signaling pathway in endothelial activation by antiphospholipid antibodies. *Blood* 2003; 101:3495-500.
 49. Ma K, Simantov R, Zhang J, Silverstein R, Hajjar KA, McKrae KR. High affinity binding of b2-glycoprotein I to human endothelial cells is mediated by annexin II: *J Biol Chem* 2000; 275:15541-8.
 50. Lutters BC, Derksen RH, Tekelenburg WL, Lenting PJ, Arnout J, de Groot PG. Dimers of b2-glycoprotein I increase platelet deposition to collagen via interaction with phospholipids and the apolipoprotein E receptor 2'. *J Biol Chem* 2003; 278:33831-8.
 51. de Groot PG, Derksen RH. Pathophysiology of the antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2005; 3:1854-60.
 52. Garcia CO, Kanbour-Shakir A, Tang H, Molina JF, Espinoza RL, Gharavi AE. Induction of experimental antiphospholipid antibody syndrome in PL/J mice following immunization with β 2GPI. *Am J Reprod Immunol* 1997; 37:118-24.
 53. Blank M, Faden D, Tincani A, Kopolovic J, Goldberg I, Gilburd B, et al. Immunization with anticardiolipin cofactor (β 2-glycoprotein I) induces experimental antiphospholipid syndrome in naïve mice. *J Autoimmun* 1994; 7:441-55.
 54. Olee T, Pierangeli SS, Handley HH, Le DT, Wei X, Lai CJ, et al. A monoclonal IgG anticardiolipin antibody from a patient with the antiphospholipid syndrome is thrombogenic in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:8606-11.
 55. Pierangeli SS, Harris EN. In vivo models of thrombosis for the antiphospholipid syndrome. *Lupus* 1996; 5:451-5.
 56. George J, Afek A, Gilburd B, Levy Y, Blank M, Kopolovic J. Atherosclerosis in LDL-receptor knockout mice is accelerated by immunization with anticardiolipin antibodies. *Lupus* 1997; 6:723-9.
 57. Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T. Lupus anticoagulants are stronger risk factors of thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: A systematic review of the literature. *Blood* 2003; 101: 1827-32.
 58. Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T. Anti-b2-glycoprotein I, antiprothrombin antibodies and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2003; 102:2717-23.
 59. Finazzi G, Brancaccio V, Moia M, Ciaverella N, Mazzucconi MG, Schinco PC, et al. Natural history and risk factors for thrombosis in 360 patients with antiphospholipid antibodies: a four-year prospective study from the Italian Registry. *Am J Med* 1996; 100:530-6.
 60. Finazzi G. Aspirin in asymptomatic patients with confirmed positivity of antiphospholipid antibodies? No. *Intern Emerg Med* 2008; 3:197-200.
 61. Gerosa M, Chighizola G, Meroni PL. Aspirin in asymptomatic patients with confirmed positivity of antiphospholipid antibodies? Yes (in some cases). *Intern Emerg Med* 2008; 3:201-3.
 62. Khamashta MA, Cuadrado MJ, Mujic F, Taub NA, Hunt BJ, Hughes GR. The management of thrombosis in the antiphospholipid-antibody syndrome. *N Engl J Med* 1995; 332:993-7.
 63. Crowther MA, Ginsberg JS, Julian J, Denburg J, Hirsh J, Douketis J, et al. A comparison of two intensities of warfarin for the prevention of recurrent thrombosis in patients with the antiphospholipid antibody syndrome. *N Engl J Med* 2003; 349:1133-8.
 64. Finazzi G, Marchioli R, Brancaccio V, Schinco P, Wisloff F, Musial J, et al. A randomized clinical trial of high-intensity warfarin vs. conventional antithrombotic therapy for the prevention of recurrent thrombosis in patients with the antiphospholipid syndrome (WAPS). *J Thromb Haemost* 2005; 3:848-53.
 65. Crowther MA, Wisloff F. Evidence based treatment of the antiphospholipid syndrome II. Optimal anticoagulant therapy for thrombosis. *Thromb Res* 2005; 115:3-8.
 66. Lim W, Crowther MA, Eikelboom JW. Management of the antiphospholipid syndrome: a systematic review. *JAMA* 2006; 295:1050-7.
 67. Levine SR, Brey RL, Tilley BC, Thompson JL, Sacco RL, Sciaccia RR, et al., APASS Investigators. Antiphospholipid antibodies and subsequent thrombo-occlusive events in patients with ischemic stroke. *JAMA* 2004; 291: 576-84.