

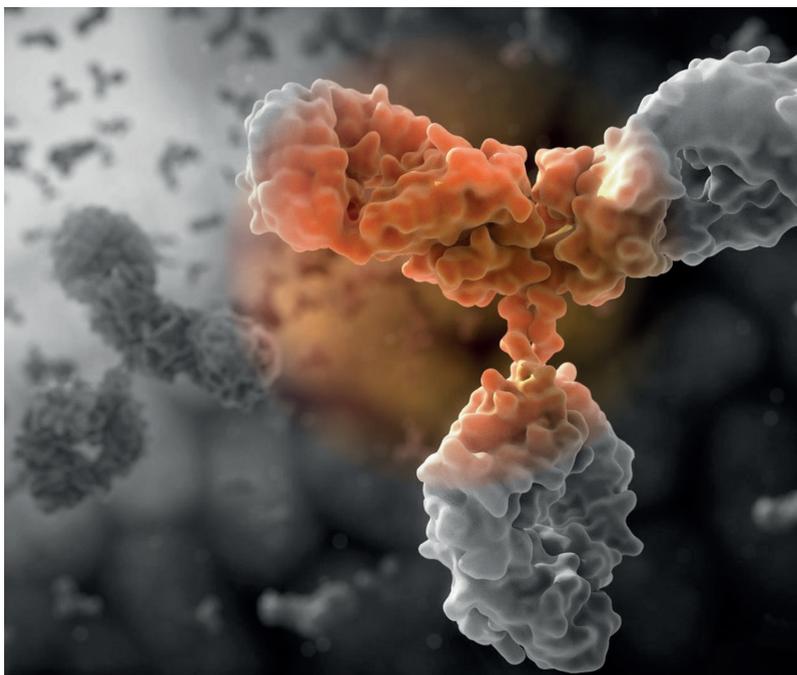


GRUPO CAHT

GRUPO COOPERATIVO ARGENTINO
DE HEMOSTASIA Y TROMBOSIS

GUÍA DE LABORATORIO PARA EL ESTUDIO DE
**ANTICUEROS
ANTIFOSFOLÍPIDOS (aPL)
EN FASE SÓLIDA**

2020



GUÍA DE LABORATORIO PARA EL ESTUDIO DE
ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS (aPL)
EN FASE SÓLIDA.

Fue editado por el Grupo CAHT en Buenos Aires, Argentina.

ISBN: 978-987-21580-8-8



Comité Editor Gabriela de Larrañaga
Lourdes Herrera
Ricardo Forastiero

Comisión Directiva
Presidente Roberto Pozner

Coordinadores Asociados Carla Giumelli
Miguel Castro Ríos

Tesorera Laura Vrdoljak

Vocales Titulares Susana Meschengieser
Ana Glembotsky
María Mercedes Zirpoli

Suplentes Luis Aversa
Eliana Annetta

Revisores de Cuenta Titulares Ludmila Elhelou
Patricia Do Nascimento

Suplente Emanuel Sueldo

Diseño Gráfico Laura Sus

GRUPO COOPERATIVO ARGENTINO
DE HEMOSTASIA Y TROMBOSIS

GUÍA DE LABORATORIO PARA EL ESTUDIO DE
**ANTICUERPOS
ANTIFOSFOLÍPIDOS (aPL)
EN FASE SÓLIDA**
2020

PREFACIO

El síndrome antifosfolípido es una enfermedad sistémica y multifacética, tanto desde el punto de vista clínico como del diagnóstico de laboratorio. Su historia lleva ya más de 100 años y aún hoy en día hay muchos aspectos controversiales, en particular en el diagnóstico de la patología por parte del laboratorio. El desarrollo del conocimiento a lo largo de los años es resumido en el Capítulo 1, mostrando los reportes clínicos tromboembólicos y obstétricos y además el desarrollo de ensayos específicos a comienzos de la década del '80. Esto dio lugar a la definición del síndrome antifosfolípido a principios de dicha década. Desde los primeros tiempos, se observó que los anticuerpos pueden ser demostrados en dos grupos principales de pacientes: aquellos con infecciones y aquellos con manifestaciones clínicas de trombosis y/o morbilidad obstétrica. Las diferencias y similitudes entre los epitopes antigénicos reconocidos por los distintos anticuerpos antifosfolípidos que son detectados en estos dos grupos se presentan en el Capítulo 2. En el Capítulo 3, se mencionan las variables que afectan los ensayos inmunológicos de laboratorio. El primer ensayo inmunológico "específico" para el diagnóstico del síndrome antifosfolípido fue el de anticuerpos anticardioplipina y sus principales características están resumidas en el Capítulo 4. Simultáneamente con este ensayo, se publicaron distintos reportes en la literatura acerca de la posibilidad de detectar anticuerpos contra otros fosfolípidos, más allá de la cardioplipina. El Capítulo 5 muestra algunos resultados en ensayos inmunológicos para detectar anticuerpos contra fosfolípidos neutros y aniónicos y su relevancia clínica. Desde principios de la década del '90 hubo un cambio sustancial en el conocimiento del síndrome antifosfolípido al revelar que los anticuerpos antifosfolípidos reconocían en realidad a proteínas plasmáticas con alta afinidad por fosfolípidos de carga negativa. Entre ellas están la protrombina humana y la beta 2-glicoproteína I. Los Capítulos 6 y 7 resumen el conocimiento adquirido en los últimos

30 años en lo referente a anticuerpos con especificidad contra estas proteínas. Recientemente, se ha demostrado que el dominio 1 de la beta 2-glicoproteína I y el complejo protrombina-fosfatidilserina son *targets* antigénicos que se relacionan con el riesgo al desarrollo de los rasgos clínicos del síndrome antifosfolípido. El Capítulo 8 muestra la importancia que tienen los controles de la calidad y los puntos de corte de los ensayos en fase sólida en el desempeño del laboratorio para contribuir en el diagnóstico certero de este síndrome. Por último, en los años más recientes se hizo mucho hincapié en el perfil completo de los distintos anticuerpos antifosfolípidos que se pueden evaluar en el laboratorio y el rol que tienen los distintos perfiles en la estratificación del riesgo clínico en pacientes asintomáticos y aquellos con historia de eventos tromboembólicos. Este aspecto está mencionado en el Capítulo 9. Esperamos esta guía sea de utilidad para los colegas del Grupo CAHT y agradecemos en especial a los autores.

COMITÉ EDITOR

Gabriela de Larrañaga

Lourdes Herrera

Ricardo Forastiero

ÍNDICE

1	Historia de los anticuerpos antifosfolípidos y el síndrome antifosfolípido.	
	Ricardo Raúl Forastiero.	15
<hr/>		
2	Tipos de anticuerpos antifosfolípidos y epitopes antigénicos.	
	Gabriela Fernanda de Larrañaga.	29
<hr/>		
3	Preanalítica en ensayos de fase sólida.	
	Silvia Daniela Perés.	41
<hr/>		
4	Anticuerpos anticardiolipina.	
	Eleonora Beatríz Rossi.	55
<hr/>		
5	Anticuerpos antifosfolípidos (no aCL).	
	Lourdes Herrera.	67
<hr/>		
6	Anticuerpos anti-beta 2 glicoproteína I y anti-dominio 1 de la beta 2 glicoproteína I.	
	Sandra N. Suarez.	75
<hr/>		
7	Anticuerpos anti-protrombina y anti-fosfatidilserina/protrombina.	
	Laura Luisa Fornasiero.	87
<hr/>		

8 Control de la calidad y puntos de corte en ensayos en fase sólida.

Yolanda Patricia Adamczuk.

103

9 Perfiles de aPL con riesgo clínico.

Ricardo Raúl Forastiero.

115

Tipos de anticuerpos antifosfolípidos y epitopes antigénicos

Gabriela Fernanda de Larrañaga.

Bioquímica, Dra. en Bioquímica Humana de la UBA. Hospital de Infecciosas “Francisco Javier Muñíz”.

Laboratorio de Hemostasia y Trombosis. Buenos Aires, Argentina.

Los anticuerpos antifosfolípidos (aPL) son una familia de anticuerpos, que pueden o no estar presentes a lo largo del tiempo, desde días hasta años. Aquellos anticuerpos que desaparecían en pocos días, se los asoció con infecciones, mientras que los que perduraban en el tiempo se los relacionó con enfermedades autoinmunes, o enfermedades trombóticas y/o morbilidad obstétrica, en lo que se denominó síndrome antifosfolípido (APS). Sin embargo, clasificar a los aPL como “infecciosos” o “no infecciosos”

es una mirada errónea y poco asertiva de los que significan o son estos anticuerpos⁽¹⁻⁴⁾.

El APS desde el punto de vista del laboratorio requiere el hallazgo de manera constante (en dos ocasiones como mínimo), de por lo menos uno de los siguientes aPL: anticuerpos anticardiolipina (aCL) IgG o IgM y/o anticuerpos anti- β_2 GPI (a β_2 GPI) IgG o IgM y/o anticoagulante lúpico (LA). Los dos primeros son ensayos en fase sólida y el último, el LA, es un ensayo en fase fluida que evalúa la inhibición de los ensayos de coagulación fosfolípido dependientes^(1, 2, 5). La confusión proviene de que podemos obtener resultados en el laboratorio de estos anticuerpos en APS pero también en otras condiciones clínicas, no siempre vinculadas a clínica trombotica y/o morbilidad obstétrica, usando los mismos tests comerciales o desarrollados de manera casera⁽¹⁻⁴⁾. Esto es lo que genera, junto a la inadecuada clasificación de pacientes, numerosos trabajos publicados con enfoques erróneos.

Los aPL deben ser clasificados en **aloanticuerpos** y **autoanticuerpos**. Existen numerosos estudios que han demostrado las diferencias entre estos anticuerpos, en su patogenicidad, las subclases, la afinidad y los verdaderos epitopes.

Una de las grandes diferencias entre los aloanticuerpos y los autoanticuerpos es la **especificidad antigénica**. Los **aloanticuerpos** son anticuerpos dirigidos generalmente contra fosfolípidos, cualquier fosfolípido, siendo los más conocidos contra la cardiolipina (CL). Los **autoanticuerpos** en cambio son anticuerpos dirigidos contra complejos proteína-fosfolípido, como el anticuerpo contra el complejo cardiolipina- β_2 glicoproteína I (β_2 GPI) (aCL dependientes de β_2 GPI). También se vió que ciertos aPL, capaces de inhibir pruebas de coagulación fosfolípido dependientes (LA) requieren de proteínas como la β_2 GPI o la protrombina (PT). Posteriormente se demostró que la β_2 GPI y la PT son en realidad los verdaderos epitopes de los aPL autoinmunes^(1, 6-9).

Los **aPL aloinmunes** se caracterizan por ser anticuerpos generalmente dirigidos contra fosfolípidos únicamente (fosfolípidos aniónicos, catiónicos, neutros), pueden o no desaparecen con el tiempo, pero **no** están relacionados con clínica trombotica y/o morbilidad obstétrica. Se los encuentra asociados a infecciones tanto virales como bacterianas, infecciones agudas o crónicas^(1, 9, 10). Su mecanismo se encuentra asociado a anticuerpos desarrollados como **epifenómeno** y se ha demostrado que no producen activación del mecanismo de la coagulación y/o celular y/o activación de complemento.

Pongamos algunos ejemplos: en sífilis, es muy común encontrar aCL que desaparecen en función de la remisión de la enfermedad. El LA y los a β_2 GPI generalmente son negativos y no se han asociado a eventos trombóticos y/o morbilidad obstétrica. Los pacientes con infección por el virus de inmunodeficiencia humano (HIV), en cambio, suelen tener aCL, a β_2 GPI y LA positivos persistentes a través del tiempo, en baja prevalencia y con bajos títulos, pero son pocos los estudios donde los relacionan con clínica trombótica^(10, 11). Es más, al entrar en la era de los tratamientos antirretrovirales de alta eficiencia, estos datos se han ido modificando, ha bajado la prevalencia y los pocos casos asociados a trombosis son solamente casos aislados que no representan al total de la población con HIV. Posiblemente los tratamientos de alto impacto han regulado el sistema inmune de diversas maneras y una de ellas es el control en la producción de anticuerpos⁽¹¹⁾. En el caso de tuberculosis, hepatitis por virus C (HCV), citomegalovirus, micoplasma, fiebre Q, parvovirus, etc, es común encontrar aCL, que desaparecen con el tiempo y generalmente son a títulos bajos de tipo IgM. Rara vez aparece un LA y menos aún a β_2 GPI⁽¹⁰⁾. Algunos trabajos muestran una relación entre eventos trombóticos en pacientes HCV⁺ aPL⁺ en comparación con HCV⁺ aPL⁻, aunque otros estudios no han encontrado tal asociación⁽¹⁰⁾.

El único caso que merece la pena hacer mención aparte, dentro de las infecciones es la lepra, sobre todo la lepra lepromatosa que cursa con LA, aCL, a β_2 GPI, persistentes en el tiempo y con altos títulos en IgG e IgM⁽¹²⁾. Existen publicaciones que demuestran que estos anticuerpos son aloanticuerpos y no producen activación celular y/o activación de la cascada de coagulación. Es más, su asociación con el fenómeno de Lucio (vasculitis trombótica) es cuestionada⁽¹³⁾. Los trabajos demostraron que son aloanticuerpos en base a estudios *in vivo*, donde se aislaron los anticuerpos y se desafiaron en modelos de trombosis en ratón, aunque existen datos recientes que sostienen lo contrario. Estos últimos estudios son hechos en base a datos estadísticos, *case reports* o estudios *in vitro*, por lo que la fuerza de la asociación pierde credibilidad frente a resultados *in vivo*⁽¹³⁻¹⁶⁾.

Los autoanticuerpos, en cambio, sí están asociados a fenómenos trombótico y/o complicaciones obstétricas, tanto en estudios estadísticos, meta-análisis como en estudios *in vitro* e *in vivo*^(17, 18).

Especificidad antigénica

Cuando nos referimos al APS, los antígenos más importantes hacia los cuales se desarrollan los anticuerpos son la β_2 GPI y la PT y son los más conocidos y validados^(1, 6-9, 19).

Pero esto no implica que no existan otros *targets*. De hecho, se han reportado otras proteínas que unen fosfolípidos, implicadas en APS íntimamente ligadas al sistema de coagulación y fibrinólisis como: proteína C, proteína S, anexina A2, anexina A4, inhibidor del factor tisular, inhibidor del activador tisular de plasminógeno, trombina y algunas pocas publicaciones involucran a los Factores XII, XI, VII/VIIa, precalicreína, quininógenos de alto peso molecular, complemento, etc⁽⁹⁾.

Uno podría pensar que los aPL implicados en el desarrollo del APS son realmente heterogéneos y es por esto que es difícil aún hoy, después de tantos trabajos publicados, poder identificar claramente y de **manera sencilla** los verdaderos aPL capaces de producir clínica trombótica y/o morbilidad obstétrica, sin dejar afuera algunos aPL que claramente pueden producir clínica pero que ni están incorporados en los criterios de Sidney, ni están estandarizados de manera rutinaria^(2, 3). Quizá la especificidad antigénica actualmente se vea reflejada solo en parte por los aPL más comunes que son los del criterio de Sidney (aCL, LA, $\alpha\beta_2$ GPI), pero definitivamente quedarán algunos fuera de estudio, por lo menos hasta el presente^(5, 9).

La β_2 GPI es una proteína con 5 dominios (I-V). Existe una familia de $\alpha\beta_2$ GPI, la cual es muy heterogénea en sus actividades biológicas, avidéz y que contienen diferentes epitopes sobre la molécula. A partir de grandes estudios hechos con pacientes con APS claramente definidos, se pudo determinar que los anticuerpos de estos pacientes mayoritariamente eran contra el **dominio I de la β_2 GPI**. En cambio, los aloanticuerpos, como los vistos en lepra, pegan en otros dominios de la β_2 GPI^(1, 2, 20).

La mayoría de los anticuerpos anti-protrombina (aPT) poseen la capacidad de prolongar los ensayos de coagulación fosfolípido dependientes, esto es poseen la capacidad ser LA⁽⁸⁾. Pero otros solo son capaces de ser expuestos mediante un ensayo de ELISA⁽⁹⁾. Los anticuerpos anti-fosfatidilserina/protrombina (aPS/PT) son un claro ejemplo de un subconjunto de aPL que no están incluidos dentro del criterio de Sidney y que su inclusión sigue siendo materia de debate^(1, 2, 9).

De la misma manera, los $\text{a}\beta_2\text{GPI}$ son los responsables de la reactividad en los ensayos de aCL y/o LA, pero también se han encontrado solo $\text{a}\beta_2\text{GPI}$ por ELISA con aCL y LA negativos siendo pacientes con APS. Esto habla de lo heterogéneos de los $\text{a}\beta_2\text{GPI}$. Y esto no es solamente por la diversidad de ensayos y reactivos, sino por la diversidad de aPL que forman parte del APS. Algunos autores discuten el significado de encontrar solo una prueba positiva para aPL. Se atribuye más a errores metodológicos que a la realidad de una sola expresión de aPL^(1, 9).

Volviendo a las infecciones, es muy raro encontrar $\text{a}\beta_2\text{GPI}$ durante las infecciones, comparado con pacientes con APS o enfermedades autoinmunes⁽¹¹⁾. El grupo claramente diferente donde se encuentran $\text{a}\beta_2\text{GPI}$ persistentes y en altos títulos es en lepra lepromatosa⁽¹²⁾. Se pudo demostrar que notoriamente eran de subtipo IgG_3 a diferencia de los pacientes con APS que tenían subtipo IgG_2 . Además, estos anticuerpos claramente pegaban en diferentes dominios de la $\beta_2\text{GPI}$, a diferencia de los pacientes con APS que predominan los anticuerpos contra el dominio I. Parvovirus B19 también demostró un patrón de aPL muy parecido a lepra. Otra observación importante es que los aCL provenientes de pacientes con enfermedades infecciosas es que difieren en la subclase de IgG encontradas respecto de los aCL en APS. En el caso de las infecciones los aCL son generalmente IgG_1 e IgG_3 , mientras que en APS son predominantemente IgG_2 e IgG_4 ⁽⁹⁾.

La gran diferencia: mecanismo de acción

Existen múltiples mecanismos propuestos sobre los aPL relacionados al APS, o sea los que realmente son trombogénicos. Se han demostrado efectos procoagulantes mediante la inhibición de anticoagulantes naturales e inhibición del sistema fibrinolítico y efectos proinflamatorios y protrombóticos mediante la activación celular (endotelio, plaquetas, monocitos, entre otras) y activación del sistema complemento^(14, 18). En cambio, en infecciones como sífilis, los aPL no han demostrado una vinculación con estos mecanismos.

No hay dudas que los aPL de pacientes con APS son patogénicos, ya que pudieron evidenciarse en modelos murinos de trombosis y pérdidas de embarazo^(14, 18). Pero hay que recordar siempre que estos mecanismos son

multifactoriales⁽¹⁰⁾.

Se ha demostrado un rol importante de la expresión celular de factor tisular (TF), y aumento en los niveles circulantes de TF para explicar, aunque sea en parte, la patogenia de los aPL de tipo autoinmune tanto en APS como en pacientes que no cumplen todos los criterios. Los aPL de tipo autoinmunes al unirse a células endoteliales expresan moléculas de adhesión⁽¹⁴⁾. En contraposición, los aPL de pacientes con lepra no exhiben este aumento en el TF soluble, así como tampoco expresan marcadores de activación en el mecanismo de coagulación⁽¹³⁾.

También se demostró que los pacientes con APS poseen niveles elevados de citoquinas proinflamatorias como interleuquina 6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral (TNF). Sin embargo, los pacientes con lepra poseen un aumento en el TNF, pero con niveles normales de IL-6 (perturbación endotelial sin activación de la coagulación). Estas diferencias explican claramente los mecanismos involucrados en la patogenia de los aPL de tipo autoinmunes y las vistas en los aPL relacionados a infecciones como lepra^(14,21).

En resumen, los aPL que se pueden evidenciar en el laboratorio son verdaderamente heterogéneos y no siempre están ligados a eventos trombótico y/u obstétricos. Se podrían definir 2 grandes grupos: aPL aloinmunes y aPL autoinmunes.

Los aPL de tipo autoinmunes que pegan dominio I de la β_2 GPI exhiben unión a receptores celulares y en consecuencia gatillan eventos de activación celular. En cambio los aloanticuerpos vistos en lepra pegan en otros dominios de la β_2 GPI y los aloanticuerpos vistos en otras infecciones como, sífilis que pegan directamente fosfolípidos de membrana, no producen activación celular⁽¹³⁾.

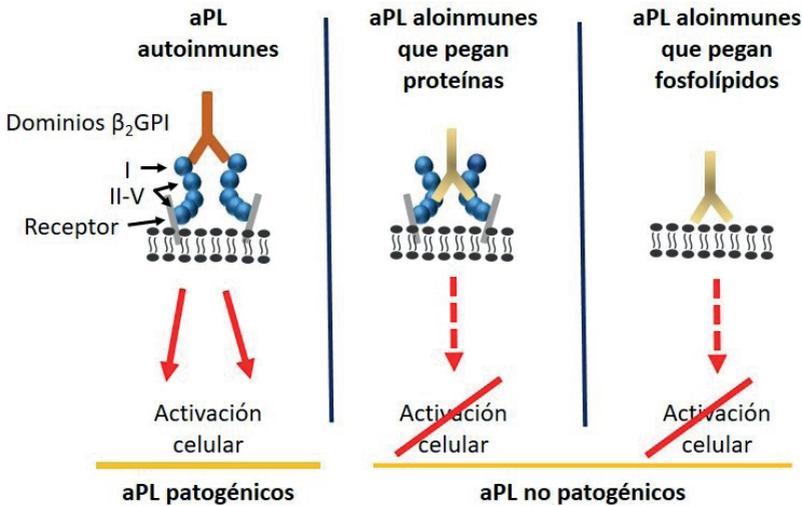
Una de las publicaciones más contundentes sobre la patogenicidad de los aPL pudo demostrarse con un modelo *in vivo* de trombosis, al cual se exponía a aPL de pacientes con APS o aPL de pacientes con lepra. Claramente el primer grupo demostró un desarrollo de trombosis y activación celular que el segundo grupo no pudo demostrar⁽¹³⁾.

La **Figura 1** resulta el esquema más adecuado para interpretar a estos anticuerpos en su rol patogénico.

En modelos animales se ha podido demostrar el desarrollo de fenómenos de autoinmunidad como APS luego de inmunización con péptidos sintéticos o ciertos patógenos, que comparten homología con la β_2 GPI. En humanos, se ha observado también el desarrollo de autoinmunidad luego de gatillos con

infecciones. Sin embargo, se debe tener en cuenta que esta asociación en humanos solo se logra en sujetos genéticamente predispuestos⁽¹⁰⁾.

Figura 1. Esquema que muestra la diferencia entre los aPL patogénicos y aquellos del grupo no patogénicos en el mecanismo de activación celular



Conclusiones

El término de aPL involucra un número heterogéneo de anticuerpos, implicados o no con infecciones o fenómenos de autoinmunidad. Es sumamente útil poder diferenciar aquellos que son aloinmunes de los que son autoinmunes. Los autoinmunes son patogénicos, persisten a través del tiempo y los clínicamente más activos han demostrado claros mecanismos de activación celular. En cambio, los aloanticuerpos pueden ser persistentes o no durante el tiempo, generalmente son contra proteínas-fosfolípidos

2 | Tipos de anticuerpos antifosfolípidos y epitopes antigénicos



o solamente contra fosfolípidos, pero definitivamente no producen la activación celular o de mecanismos trombóticos capaces de poder relacionarlos a clínica alguna. El reto seguramente queda en el laboratorio, pues deberá poner sus energías en buscar ensayos que verdaderamente sean sensibles y específicos para determinar aquellos aPL que se relacionan con una condición clínica trombótica.

Referencias

1. Pengo V, Bison E, Denas G, Jose SP, Zoppellaro G, Banzato A. Laboratory Diagnostics of Antiphospholipid Syndrome. *Sem Thromb Hemost* 2018; 44: 439-44.
2. Devreese KMJ, Ortel TL, Pengo V, de Laat B. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid A. Laboratory criteria for antiphospholipid syndrome: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2018; 16: 809-13.
3. Lackner KJ, Muller-Calleja N. Laboratory criteria for antiphospholipid syndrome: comment. *J Thromb Haemost* 2018; 16: 2115-6.
4. Devreese KMJ, Ortel TL, Pengo V, de Laat B. Laboratory criteria for antiphospholipid syndrome: reply. *J Thromb Haemost* 2018; 16: 2117-9.
5. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T y col. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4: 295-306.
6. Koike T, Tsutsumi A, Ichikawa K, Matsuura E. Antigenic specificity of the "anticardiolipin" antibodies. *Blood* 1995; 85: 2277-80.
7. Roubey RA, Eisenberg RA, Harper MF, Winfield JB. "Anticardiolipin" autoantibodies recognize beta 2-glycoprotein I in the absence of phospholipid. Importance of Ag density and bivalent binding. *J Immunol* 1995; 154: 954-60.
8. Arvieux J, Darnige L, Caron C, 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.

- 
9. Forastiero R, Martinuzzo M. Antigen specificity and clinical relevance of antiphospholipid syndrome-related autoantibodies. *Curr Rheumatol Rev* 2005; 1: 177-87.
 10. Abdel-Wahab N, Talathi S, Lopez-Olivo MA, Suarez-Almazor ME. Risk of developing antiphospholipid antibodies following viral infection: a systematic review and meta-analysis. *Lupus* 2018; 27: 572-83.
 11. de Larranaga GF, Forastiero RR, Carreras LO, Alonso BS. Different types of antiphospholipid antibodies in AIDS: a comparison with syphilis and the antiphospholipid syndrome. *Thromb Res* 1999; 96: 19-25.
 12. de Larranaga GF, Forastiero RR, Martinuzzo ME y col. High prevalence of antiphospholipid antibodies in leprosy: evaluation of antigen reactivity. *Lupus* 2000; 9: 594-600.
 13. Forastiero R, Martinuzzo M, de Larranaga G, Vega-Ostertag M, Pierangeli S. Anti-beta2glycoprotein I antibodies from leprosy patients do not show thrombogenic effects in an in vivo animal model. *J Thromb Haemost* 2011; 9: 859-61.
 14. Muller-Calleja N, Lackner KJ. Mechanisms of Cellular Activation in the Antiphospholipid Syndrome. *Sem Thromb Hemost* 2018; 44: 483-92.
 15. Nunzie E, Ortega Cabrera LV, Macanchi Moncayo FM, Ortega Espinosa PF, Clapasson A, Massone C. Lucio Leprosy with Lucio's phenomenon, digital gangrene and anticardiolipin antibodies. *Leprosy Rev* 2014; 85: 194-200.
 16. Silva DSD, Teixeira LAC, Beghini DG y col. Blood coagulation abnormalities in multibacillary leprosy patients. *PLoS Neg Trop Dis* 2018; 12: e0006214.
 17. Fujieda Y, Amengual O, Atsumi T. Pathogenic role of antiphospholipid antibodies: an update. *Lupus* 2018; 27: 2012-3.

- 
- 18. Sacharidou A, Shaul PW, Mineo C. New Insights in the Pathophysiology of Antiphospholipid Syndrome. *Sem Thromb Hemost* 2018; 44: 475-82.
 - 19. Matsuura E, Igarashi Y, Yasuda T, Triplett DA, Koike T. Anticardiolipin antibodies recognize beta 2-glycoprotein I structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface. *J Exp Med* 1994; 179: 457-62.
 - 20. Radin M, Cecchi I, Roccatello D, Meroni PL, Sciascia S. Prevalence and Thrombotic Risk Assessment of Anti-beta2 Glycoprotein I Domain I Antibodies: A Systematic Review. *Sem Thromb Hemost* 2018; 44: 466-74.
 - 21. Forastiero RR, Martinuzzo ME, de Larranaga GF. Circulating levels of tissue factor and proinflammatory cytokines in patients with primary antiphospholipid syndrome or leprosy related antiphospholipid antibodies. *Lupus* 2005; 14: 129-36.