



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

DOTTORATO DI RICERCA IN

SCIENZE CLINICHE

CICLO XXIX

COORDINATORE Prof. ANNUNZIATO FRANCESCO

**Il ruolo delle microparticelle nella sindrome da
anticorpi antifosfolipidi**

Settore Scientifico Disciplinare MED / 09

Dottorando

Dott. *Ciucciarelli Lucia*

Tutore

Prof. *Prisco Domenico*

Coordinatore

Prof. *Annunziato Francesco*

Anni 2013/2016

INDICE

	Pag.
Sintesi	2
La sindrome da anticorpi antifosfolipidi	6
Le microparticelle	17
Scopo dello studio	19
- Materiali e metodi	20
Popolazione	20
La citofluorimetria	23
Preparazione delle microparticelle e marcatura	24
Analisi citofluorimetria	25
Analisi statistica	27
- Risultati	28
Valutazione delle microparticelle totali VPD450 ⁺	28
Distribuzione dei differenti sottotipi di microparticelle	30
Correlazione tra natura delle microparticelle e caratteristiche cliniche	32
Discussione	34
Conclusioni	37
Bibliografia	38

Sintesi

La sindrome da anticorpi antifosfolipidi (APS) è una patologia acquisita, autoimmune, caratterizzata dalla presenza di trombosi venose e/o arteriose recidivanti e/o disordini gravidici, associati con la positività, confermata in due diverse occasioni ad almeno 12 settimane di distanza, di autoanticorpi diretti contro complessi molecolari di fosfolipidi e proteine.

La diagnosi richiede la presenza di almeno un criterio clinico e un criterio di laboratorio.

La APS si può associare ad altre malattie autoimmuni, in particolare il lupus eritematoso sistemico (LES), ma può presentarsi anche in pazienti che non hanno altre patologie reumatologiche specifiche (APS primaria). Occasionalmente può verificarsi in concomitanza di episodi infettivi, nel corso di terapie farmacologiche o in presenza di neoplasie.

Questa patologia colpisce più frequentemente il sesso femminile, con un'età media alla diagnosi di circa 34 anni. Il rapporto femmina/maschio è di 3.5:1 per la forma primaria e 7:1 per la forma associata a LES. La prevalenza della APS è sconosciuta ma si stima intorno allo 0.5 % nella popolazione generale; la mortalità è intorno al 5%.

Le sedi più frequentemente colpite da trombosi sono le vene profonde degli arti inferiori per il distretto venoso e le arterie cerebrali per quanto riguarda la circolazione arteriosa. Comunque, ogni tessuto o organo può essere colpito e tipicamente il quadro istologico è caratterizzato da trombosi senza evidenza di componente infiammatoria nella parete del vaso interessato. In una coorte Europea di 1000 pazienti affetti da APS, la trombosi venosa profonda e l'embolia polmonare erano le manifestazioni cliniche più frequenti, mentre le più frequenti manifestazioni arteriose erano neurologiche, come stroke o TIA. La presenza di specifici autoanticorpi è una componente essenziale della diagnosi essendo necessaria la persistenza per più di 12 settimane di alti titoli di autoanticorpi antifosfolipidi (aPL). Questi possono essere rivelati con tre test: lupus anticoagulant (LA), IgG o IgM anticardiolipina (aCL) e IgG o IgM anti-β₂-glicoproteina- I.

La patogenesi della APS è molto complessa e si basa non solamente sulla formazione dei complessi immuni formati da aPL, ma coinvolge anche molti altri attori quali l'endotelio, le piastrine e i monociti-macrofagi.

Nel tentativo di spiegare i meccanismi sottostanti alla formazione del trombo in presenza di aPL, in considerazione del fatto che la trombosi è un evento che si verifica occasionalmente nonostante la persistenza degli aPL, è stato proposto il modello “two hit” che prevede che la formazione del trombo necessiti di due fasi. Secondo questo modello si ipotizza che debba verificarsi inizialmente un danno all’endotelio mediato dagli aPL e successivamente intervenga un secondo “hit” che potenzi la formazione del trombo. Quindi gli aPL indurrebbero una condizione trombofilica (primo “hit”), ma perchè si formi il trombo sarebbe necessaria la presenza di un’altra condizione trombofilica (secondo “hit”). Gli aPL favoriscono la formazione del trombo in molti modi. Interagiscono con le cellule endoteliali, in primo luogo attraverso il legame della β 2-glicoproteina I sulla superficie cellulare, e inducono un fenotipo endoteliale procoagulante e proinfiammatorio. Determinano un incremento dell’espressione del Tissue Factor (TF) sulle cellule endoteliali e sui monociti, promuovono l’adesione leucocitaria, la secrezione di citochine e la sintesi della PGE2. Inoltre gli aPL riconoscono le proteine che legano i fosfolipidi espresse sulle piastrine potenziando l’aggregazione piastrinica indotta da un altro agonista. Interferiscono con le componenti plasmatiche della cascata coagulativa, inibendo l’attività anticoagulante, alterando la fibrinolisi e spiazzando il legame dell’anticoagulante naturale Annessina V con le strutture anioniche.

Questi meccanismi contribuiscono tutti a favorire una condizione procoagulante ma non sono sufficienti per la formazione del trombo. L’attivazione del complemento sembra essere necessaria per la formazione del trombo in vivo. Molti studi suggeriscono inoltre che la APS sia caratterizzata da un incremento dello stress ossidativo.

La grande varietà dei quadri clinici caratterizzati dalla positività per aPL rende difficile la stratificazione dei pazienti in base al rischio di presentare eventi trombotici con conseguenti difficoltà che si ripercuotono sulle scelte terapeutiche.

Nella pratica clinica è comune il quesito se pazienti con simili manifestazioni cliniche ma diversi pattern e/o combinazioni di risultati di test aPL positivi si debbano considerare equivalenti. I pazienti possono avere una positività aPL singola, doppia o triplice; possono avere singoli o multipli isotipi di aCL o anti β 2-glicoproteina I; o presentare bassi o alti titoli anticorpali. Se l’eterogeneità dei profili autoanticorpali rappresenti uno spettro di diverse categorie in termini di prognosi e trattamento è ancora

oggi materia di dibattito. Multipli test positivi per aPL sono più frequentemente associati con eventi tromboembolici rispetto ad un singolo test positivo. Comunque la presenza di un singolo test positivo deve essere sempre considerata per valutare il rischio trombotico, specialmente nel contesto di malattie autoimmuni concomitanti o di altri fattori di rischio cardiovascolare. Tra tutti gli aPL il LA è quello più strettamente correlato alla trombosi.

I pazienti tripli positivi (LA+ aCL+ anti β 2-glicoproteina I) sono il gruppo a più alto rischio. Il rischio di un primo episodio di trombosi tra soggetti asintomatici portatori della triplice positività è stato stimato 5.3% per anno. Tuttavia, la positività per aPL non sempre determina lo sviluppo di APS, ma può riscontrarsi anche in soggetti sani senza storia di trombosi o di patologia della gravidanza. Inoltre, ci sono alcuni pazienti con positività per aPL che, nonostante l'assenza dei criteri clinici necessari per la diagnosi di APS, presentano alcune caratteristiche cliniche associate con APS definite "non criteria". Per questa tipologia di paziente, di cui non conosciamo il potenziale protrombotico, non è chiara la corretta strategia terapeutica. Quindi allo scopo di migliorare la caratterizzazione dei pazienti e di riuscire ad identificare quelli a più alto rischio di sviluppare trombosi, abbiamo eseguito una valutazione delle microparticelle (MP) circolanti in qualità di marcatori di danno vascolare e piastrinico.

Poiché i metodi per analizzare le MP nei campioni di sangue periferico non sono ancora completamente standardizzate abbiamo allestito una nuova strategia per quantificare le MP. Inoltre abbiamo caratterizzato le diverse sottopopolazioni di MP circolanti in pazienti affetti da APS e in soggetti portatori e quindi abbiamo messo in relazione la quantità ed il fenotipo delle MP con le caratteristiche cliniche.

Sono stati quindi arruolati 48 soggetti che presentavano una positività per aPL nel siero: 16 pazienti avevano una diagnosi di APS primitiva (PAPS), 16 erano soggetti con positività anticorpale ma senza i criteri clinici per APS (portatori), e 16 erano soggetti sani.

Per la prima volta, utilizzando un nuovo approccio citofluorimetrico, abbiamo osservato che il numero delle MP circolanti riportato negli studi precedenti era probabilmente sottostimato, poiché essi escludevano le MP Annessina V⁻, che rappresentano un grande sottotipo delle MP. Inoltre i livelli alterati di MP trovati nel plasma di pazienti positivi per aPL, indicano uno stato di attivazione cellulare che è molto più pronunciato in

pazienti con APS paragonati ai portatori. Infine, i dati preliminari del nostro studio pilota suggeriscono che la valutazione delle MP circolanti, in particolare quelle di origine piastrinica ed endoteliale, potrebbe essere usata come marcatore surrogato per il monitoraggio del danno piastrinico e vascolare e, se confermato in una popolazione più grande, potrebbe esser usato come fattore prognostico per identificare i soggetti positivi a più alto rischio di sviluppare trombosi e per i quali potrebbero essere richieste specifiche strategie preventive. Sicuramente il relativamente piccolo numero di pazienti esaminati è la limitazione maggiore del nostro studio pertanto ulteriori studi sono necessari per confermare i nostri dati. In conclusione, per la prima volta, abbiamo provato a caratterizzare le diverse sfumature della rara malattia APS ottenendo alcuni risultati preliminari in soggetti come i portatori, solitamente non valutati dagli studi precedenti.

La sindrome da anticorpi antifosfolipidi

La sindrome da anticorpi antifosfolipidi (APS) è una patologia acquisita, autoimmune, caratterizzata dalla presenza di trombosi venose e/o arteriose recidivanti e/o disordini gravidici, associati con la positività, confermata in due diverse occasioni ad almeno 12 settimane di distanza, di autoanticorpi diretti contro complessi molecolari di fosfolipidi e proteine.¹

La diagnosi richiede la presenza di almeno un criterio clinico e un criterio di laboratorio, che sono mostrati nella Tabella 1.

<i>Criteri clinici</i>	
1. Trombosi vascolare	Uno o più episodi di trombosi arteriosa, venosa o dei piccoli vasi, in qualsiasi organo o tessuto
2. Patologia della gravidanza	
(a)	Una o più morti inspiegate di feti morfologicamente normali dalla 10 ^a settimana di gestazione, con normale morfologia fetale documentata all'ecografia o da esame diretto del feto
(b)	Una o più nascite premature di neonati morfologicamente normali prima della 34 ^a settimana di gestazione per: (i) eclampsia o severa preeclampsia definite con definizioni standard, o (ii) segni di insufficienza placentare
(b)	Tre o più aborti consecutivi, inspiegati, spontanei prima della 10 ^a settimana di gestazione, con l'esclusione di anomalie materne anatomiche o ormonali e cause cromosomiche materne o paterne
<i>Criteri di laboratorio</i>	
1.	Lupus anticoagulant presente nel plasma, in due o più occasioni a distanza di almeno 12 settimane, rilevato secondo le linee guida ISTH
2.	Anticorpi anticardiolipina (aCL) di isotipo IgG e/o IgM nel siero o nel plasma, a medio o alto titolo (>40 GPL o MPL, o > del 99 ^o percentile) in due o più occasioni, a distanza di almeno 12 settimane, misurati con tecnica ELISA standardizzata
3.	Anticorpi anti-β2-GPI di di isotipo IgG e/o IgM nel siero o nel plasma, con titolo > del 99 ^o percentile, in due o più occasioni, a distanza di almeno 12 settimane, misurati con tecnica ELISA standardizzata, secondo procedure raccomandate

Tabella 1 Criteri classificativi per APS revisionati

La APS si può associare ad altre malattie autoimmuni, in particolare il lupus eritematoso sistemico (LES), ma può presentarsi anche in pazienti che non hanno altre patologie reumatologiche specifiche (APS primaria). Occasionalmente può verificarsi in concomitanza di episodi infettivi, nel corso di terapie farmacologiche o in presenza di neoplasie.¹

Questa patologia colpisce più frequentemente il sesso femminile, con un'età media alla diagnosi di circa 34 anni.² Il rapporto femmina/maschio è di 3.5:1 per la forma primaria e 7:1 per la forma associata a LES. La prevalenza della APS è sconosciuta ma si stima intorno allo 0.5 % nella popolazione generale;³ la mortalità è intorno al 5%.⁴

Le sedi più frequentemente colpite da trombosi sono le vene profonde degli arti inferiori per il distretto venoso e le arterie cerebrali per quanto riguarda la circolazione arteriosa.² Comunque, ogni tessuto o organo può essere colpito e tipicamente il quadro istologico è caratterizzato da trombosi senza evidenza di componente infiammatoria nella parete del vaso interessato.¹ In una coorte Europea di 1000 pazienti affetti da APS, la trombosi venosa profonda e l'embolia polmonare erano le manifestazioni cliniche più frequenti, mentre le più frequenti manifestazioni arteriose erano neurologiche, come stroke o TIA.⁵

Le manifestazioni cliniche ostetriche si verificano nel 10-20% delle gravidanze delle donne affette dalla sindrome.⁵ Queste includono la morte inspiegata di uno o più feti morfologicamente normali dalla decima settimana di gestazione in poi, la nascita prematura di uno o più neonati morfologicamente normali prima della trentaquattresima settimana di gestazione a causa di eclampsia o grave preeclampsia o insufficienza placentare, e tre o più aborti spontanei, inspiegati e consecutivi prima della decima settimana di gestazione, in assenza di anomalie anatomiche o ormonali materne e cause cromosomiche materne o paterne.¹

La presenza di specifici autoanticorpi è una componente essenziale della diagnosi essendo necessaria la persistenza per più di 12 settimane di alti titoli di autoanticorpi antifosfolipidi (aPL). Questi possono essere rivelati con tre test, che dovrebbero essere eseguiti in ogni paziente prima che la presenza di aPL possa essere esclusa o confermata.⁶ I test ricercano la presenza di lupus anticoagulant (LA), IgG o IgM anticardiolipina (aCL) e IgG o IgM anti-β2-glicoproteina- I (β2GPI).

Il LA è un test funzionale che misura la capacità degli aPL di prolungare i test di coagulazione fosfolipidi-dipendenti. Questo test è stato difficile da standardizzare, infatti nessun test sembra essere adeguato a causa della eterogeneità dei diversi aPL individuali. Poiché nessun test che esplori la coagulazione ha il 100% di sensibilità, le linee guida del 2009 dell' International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) raccomandano di eseguire due analisi con due diversi principi, il test veleno di vipera di Russell diluito (dRVVT) e un tempo di tromboplastina parziale attivata (aPTT) sensibile, che utilizza la silice come attivatore, per la sua sensibilità per il LA.⁷

Quindi in accordo alle linee guida, la ricerca del LA dovrebbe essere basata sui seguenti criteri: (1) prolungamento di un test di coagulazione fosfolipide dipendente, in particolare quando il contenuto di fosfolipidi del sistema test è basso; (2) insufficiente correzione del tempo di coagulazione prolungato con l'aggiunta di una piccola quantità di plasma normale (per escludere eventuali deficit di fattori); (3) correzione per la presenza di alte concentrazioni di fosfolipidi ad esempio con l'uso di frammenti piastrinici, che rimuoveranno tutti gli aPL.⁷

Gli aCL sono solitamente rivelati da test radioimmunologici o ELISA, usando la cardiolipina come antigene di fase solida. Per la ricerca degli aCL viene analizzato il siero. Le concentrazioni degli isotipi IgG e IgM sono espresse rispettivamente in unità di fosfolipidi G (GPL) e unità di fosfolipidi M (MPL). Gli aPL rivolti esclusivamente verso la cardiolipina non sono responsabili di eventi trombotici e si riscontrano, oltre che in pazienti con LES in cui possono determinare il fenomeno della falsa positività per la Lue, anche in pazienti affetti da patologia infettive di natura virale o batterica. Al contrario gli aPL specifici per il complesso cardiolipina-cofattori, sono responsabili di eventi trombotici. In generale, test LA positivi sono più specifici per APS, mentre gli aCL sono più sensibili.^{8,9} La specificità degli aCL per APS incrementa con il titolo ed è più alta per l'isotipo IgG che IgM.⁶

Lo sviluppo dei test immunologici volti a rilevare gli anti β 2-GPI è stata la conseguenza dell'osservazione che molti aCL sono diretti verso un epitopo presente sulla β 2-GPI.

La β 2-GPI è una proteina plasmatica prodotta dal fegato, ma verosimilmente anche da cellule endoteliali e placentari, neuroni ed astrociti, dotata di affinità per i fosfolipidi anionici e di attività anticoagulante. Comunque, in pazienti con caratteristiche cliniche di APS, gli anticorpi anti β 2-GPI sono raramente i soli anticorpi rilevati.¹⁰ La relazione

tra aPL e trombosi è stata ampiamente investigata ed è stata confermata una forte associazione tra aPL ed eventi trombotici.¹¹ Tuttavia la forza dei risultati ottenuti dagli studi clinici eseguiti è limitata da vari fattori come la differenza nel disegno degli studi ed i criteri di eleggibilità, e la differenza degli aPL in termini di tipi, isotipi, cut-off, e i metodi di laboratorio usati per la loro valutazione.

Nella pratica clinica è comune il quesito se pazienti con simili manifestazioni cliniche ma diversi pattern e/o combinazioni di risultati di test aPL positivi si debbano considerare equivalenti. I pazienti possono avere una positività aPL singola, doppia o triplice; possono avere singoli o multipli isotipi di aCL o anti β 2-glicoproteina I; o presentare bassi o alti titoli anticorpali. Se l'eterogeneità dei profili autoanticorpali rappresenti uno spettro di diverse categorie in termini di prognosi e trattamento è ancora oggi materia di dibattito. Multipli test positivi per aPL sono più frequentemente associati con eventi tromboembolici rispetto ad un singolo test positivo.^{12,13} Comunque la presenza di un singolo test positivo deve essere sempre considerata per valutare il rischio trombotico, specialmente nel contesto di malattie autoimmuni concomitanti o di altri fattori di rischio cardiovascolare.¹⁴

Tra tutti gli aPL il LA è quello più strettamente correlato alla trombosi.¹¹ Una review sistematica di 25 studi, eseguita su un numero di circa 7000 tra pazienti e controlli, ha mostrato che LA ha un odds ratio (OR) per trombosi da 5-16 volte rispetto ai controlli.^{15,16} Sebbene la positività per LA incrementasse il rischio di ictus ischemico di 48 volte e il rischio di infarto miocardico di 11 volte, gli anticorpi anti β 2-glicoproteina I raddoppiavano il rischio di stroke, con nessun effetto sull'infarto miocardico.¹⁶ Per la positività isolata agli aCL non è invece riportato un incremento del rischio di stroke o di infarto miocardico. In contrasto, alcuni studi osservazionali suggeriscono che pazienti con LES e isolata e persistente positività per aCL a medio-alto titolo (definita come più di due terzi di determinazioni positive in serie) avevano un incremento del rischio di trombosi, mentre questo non si verificava se la positività per aCL invece di persistere, era occasionale.¹⁷ I pazienti tripli positivi (LA+ aCL+ anti β 2-GPI) sono il gruppo a più alto rischio. Il rischio di un primo episodio di trombosi tra soggetti asintomatici portatori della triplice positività è stato stimato del 5.3% per anno.¹⁸ Pengo et al. hanno inoltre mostrato che la presenza della triplice positività determina un maggior rischio di trombosi e disordini gravidici rispetto alla positività per un solo aPL. Il rischio era

asserito in uno studio che descriveva l'outcome clinico di 133 pazienti dopo 1 anno di follow-up, di 76 pazienti dopo 5 anni di follow-up ed infine di 23 pazienti dopo 10 anni di follow-up. Oltre il 30% dei pazienti era colpito da un evento tromboembolico durante il follow-up. Sorprendentemente in tale studio sono stati osservati più eventi arteriosi (30) che eventi venosi (25).¹³

Inoltre la multipla positività per aPL sembra giocare un ruolo in termini di persistenza anticorpale e sembra determinare una maggiore stabilità dei livelli in determinazioni ripetute.¹⁹ Il valore clinico dei diversi profili aPL nell'assegnare il rischio di recidive è un ulteriore oggetto di dibattito. Una recente metanalisi di Garcia et al. ha mostrato che i pazienti con un primo episodio di tromboembolismo venoso con la positività per aPL hanno un più alto rischio di recidive quando correlati con pazienti senza aPL.²⁰

Le categorie di rischio in relazione al profilo di positività per aPL sono mostrate in Tabella 2.

Profilo aPL ad alto rischio	<ul style="list-style-type: none"> • Positività per LA • Tripla positività (LA+aCL+ anti-β2-GPI) • Isolata persistente positività per aCL a titolo medio-alto
Profilo aPL a basso rischio	<ul style="list-style-type: none"> • Isolata intermittente positività per aCL o anti-β2-GPI a titolo medio -basso

Tabella 2 Categorie di rischio in relazione al profilo anticorpale aPL

Nella pratica clinica, in accordo ai criteri classificativi del 2006, è possibile identificare le seguenti situazioni:²¹

- (a) *Pazienti con manifestazioni cliniche tipiche di APS associate alla positività degli anticorpi antifosfolipidi*: manifestano solitamente trombosi in distretti tipici come trombosi venose profonde degli arti inferiori, embolia polmonare, infarto del miocardio, ictus ischemico o tipici disordini della gravidanza. Questa è la APS classica.
- (b) *Pazienti con presentazioni cliniche inusuali di tipiche manifestazioni di APS associate alla positività degli aPL*: ad esempio, trombosi in distretti atipici, in particolare nei vasi epatici, renali, surrenalici e mesenterici o nei seni venosi cerebrali con presentazione subdola e difficile diagnosi
- (c) *Donne con manifestazioni cliniche incomplete di APS ostetrica associate alla positività degli aPL*: disordini della gravidanza che non rispecchiano completamente i criteri di Miyakis (ad esempio due aborti consecutivi prima della decima settimana di gestazione o tre o più aborti non consecutivi prima della decima settimana di gestazione)
- (d) *Pazienti con manifestazioni cliniche “non-criteria” di APS associate alla positività per aPL*: ad esempio interessamento polmonare non tromboembolico, impegno cardiaco, manifestazioni oculari, neurologiche, osteoarticolari e/o ematologiche.

In accordo ai criteri classificativi di Miyakis del 2006, la presenza di altre condizioni protrombotiche, ereditarie o acquisite, non esclude la diagnosi di APS. Comunque l'identificazione dei pazienti con APS “non-criteria” è importante poiché questi pazienti hanno spesso una patologia autoimmune che può evolvere in una vera APS nel tempo.^{1,22}

Oltre alle manifestazioni cliniche definite nella classificazione della APS, esiste una grande varietà di manifestazioni cliniche associate con questa sindrome che prendono il nome di “non criteria”. Queste possono interessare il sistema nervoso e includono cefalea, perdita di memoria ed epilessia. Inoltre, trombocitopenia e *livedo reticularis*, che sono rispettivamente le più importanti manifestazioni ematologiche e dermatologiche, interessano fino al 20% dei pazienti affetti da APS.⁵

Sono state descritte alterazioni a carico delle valvole cardiache, solitamente la mitrale, che possono consistere in un lieve ispessimento dei lembi valvolari fino alle tipiche lesioni trombotiche non batteriche (endocardite di Libman-Sacks).²³ Le principali manifestazioni polmonari non trombotiche in pazienti affetti da APS sono le emorragie intra-alveolari, la sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS) e l'alveolite fibrosante.^{24,25} Spesso la positività per aPL si associa ad ipertensione polmonare da fenomeni tromboembolici cronici.²⁶

Esistono inoltre delle forme caratterizzate da eventi trombotici tipici o disordini della gravidanza in assenza di altre cause, senza la positività per aPL, tali condizioni sono denominate APS sieronegative. Probabilmente ad oggi i test di laboratorio sono inadeguati a riconoscere tutti i pazienti APS e per questo sono stati proposti anticorpi potenzialmente diagnostici definiti "non criteria".²⁷

Questi anticorpi sono gli isotipi IgA aPL, gli anticorpi diretti contro altre proteine plasmatiche della cascata coagulativa (ad esempio contro la protrombina (PT) e /o i complessi fosfatidilserina-PT(aPS/PT)) o rivolti verso il dominio 1(D1) della β 2-glicoproteina I o che interferiscono con l'attività anticoagulante dell'Annessina V.²⁸

La β 2-GPI ha 5 domini omologhi (D1-D5) e recentemente molti studi hanno focalizzato la loro attenzione sulla distribuzione degli epitopi degli anticorpi anti β 2-GPI, con lo scopo di identificare le specificità patogenetiche.²⁸ Il principale epitopo che è stato trovato associato alla APS comprende le regioni di D1.²⁹ Dati recenti supportano l'associazione tra anti- β 2-GPI-D1 e manifestazioni cliniche di APS. Recenti studi hanno inoltre mostrato che pazienti con multipli aPL hanno una più alta prevalenza di positività per anti- β 2-GPI-D1 e più alti titoli di anticorpi anti- β 2-GPI-D1.³⁰ Quindi si ipotizza che gli anticorpi anti- β 2-GPI-D1 possano essere un promettente marcatore per la valutazione del rischio nei pazienti affetti da APS.⁶

In un modello di patogenesi della APS, l'Annessina V, una potente proteina anticoagulante vascolare e placentare⁶, si lega alla fosfatidilserina formando un involucro che inibisce la formazione di complessi procoagulanti.³¹

Gli autoanticorpi anti D1 β 2-glicoproteina I, legando la β 2-glicoproteina I, riescono a distruggere l'involucro formato esponendo così la fosfatidilserina procoagulante e quindi predisponendo alla trombosi.³²

L'utilità clinica di questi nuovi test e il loro valore clinico nello stimare il rischio trombotico devono ancora essere indagati. Tuttavia, questi test potrebbero essere utili in casi selezionati e cioè in presenza di segni e sintomi di APS ma in assenza della positività degli altri test per aPL.^{33,34}

La patogenesi della APS è molto complessa e si basa non solamente sulla formazione dei complessi immuni formati da aPL ma coinvolge anche molti altri attori quali l'endotelio, le piastrine e i monociti-macrofagi.

Nel tentativo di spiegare i meccanismi sottostanti alla formazione del trombo in presenza di aPL, in considerazione del fatto che la trombosi è un evento che si verifica occasionalmente nonostante la persistenza degli aPL, è stato proposto il modello "two hit" che prevede che la formazione del trombo necessiti di due fasi. Secondo questo modello si ipotizza che debba verificarsi inizialmente un danno all'endotelio mediato dagli aPL e successivamente intervenga un secondo "hit" che potenzi la formazione del trombo.³⁵ Quindi gli aPL indurrebbero una condizione trombofilica (primo "hit"), ma perchè si formi il trombo sarebbe necessaria la presenza di un'altra condizione trombofilica (secondo "hit"). Per spiegare perché un processo infettivo possa frequentemente precedere l'insorgenza della APS ed essere l'induttore di una CAPS³⁶, è stato suggerito l'intervento dei recettori del tipo toll-like (TLR), che hanno il ruolo di riconoscere i batteri e di innescare una risposta infiammatoria. I TLR 2 e 4 contribuiscono all'attivazione delle cellule endoteliali e/o dei monociti indotta dagli aPL mediante la β 2-glicoproteina I. Ed è quindi stato suggerito che il processo infettivo, assieme alla perturbazione del TLR mediata dagli anticorpi, possa provocare l'innescamento del fenomeno trombotico.³⁵ In alternativa, un processo infettivo o infiammatorio può incrementare l'espressione degli antigeni target degli aPL o l'espressione di epitopi antigenici che sono nascosti in condizioni di riposo.³⁷

Gli aPL favoriscono la formazione del trombo in molti modi. Interagiscono con le cellule endoteliali, in primo luogo attraverso il legame della β 2-glicoproteina I sulla superficie cellulare, e inducono un fenotipo endoteliale procoagulante e proinfiammatorio. Determinano un incremento dell'espressione del Tissue Factor (TF) sulle cellule endoteliali e sui monociti, promuovono l'adesione leucocitaria, la secrezione di citochine e la sintesi della PGE2. Inoltre gli aPL riconoscono le proteine che legano i fosfolipidi espresse sulle piastrine potenziando l'aggregazione piastrinica

indotta da un altro agonista. Interferiscono con le componenti plasmatiche della cascata coagulativa, inibendo l'attività anticoagulante, alterando la fibrinolisi e spiazzando il legame dell'anticoagulante naturale Annessina V con le strutture anioniche.

Questi meccanismi contribuiscono tutti a favorire una condizione procoagulante ma non sono sufficienti per la formazione del trombo. L'attivazione del complemento sembra essere necessaria per la formazione del trombo in vivo.³⁵

Molti studi suggeriscono che la APS sia caratterizzata da un incremento dello stress ossidativo. Infatti l'attività della paraoxonasi, che incide sulle proprietà antiossidanti del colesterolo HDL (prevenendo l'ossidazione del colesterolo LDL), è significativamente ridotta nei pazienti affetti da APS^{38,39}, mentre i livelli della 8-epi-prostaglandina F_{2α}, un marcatore di perossidazione lipidica, sono elevati.⁴⁰

Inoltre i livelli plasmatici dei complessi β2-GPI-LDL ossidate sono elevati in pazienti affetti da APS, se paragonati con controlli sani.⁴¹

Lo stress ossidativo gioca un ruolo diretto nella struttura e nella funzione della β2-GPI nei pazienti affetti da APS. Questa molecola, in condizioni di stress ossidativo, assume una diversa conformazione, che risulta immunogena.⁴² La relativa proporzione della β2-GPI in forma ossidata è maggiore rispetto alla forma non ossidata in pazienti con APS rispetto a pazienti affetti da malattie autoimmuni con o senza persistente positività per aPL, pazienti con trombosi vascolare senza aPL, e volontari sani.⁴³

I pazienti con APS hanno minori livelli di β2-GPI non ossidata che svolge un ruolo protettivo sull'endotelio fungendo da tampone contro lo stress ossidativo, rispetto alle persone sane.^{43,44} Inoltre lo stress ossidativo da cause esogene come il fumo di sigaretta⁴⁵ può modificare il milieu endoteliale in senso protrombotico. Ad esempio, lo stress ossidativo può stimolare l'espressione dell' Annessina A2,⁴⁶ un recettore della superficie cellulare endoteliale per la β2-GPI che svolge un importante ruolo nella patogenesi della APS.⁴⁷ Tra le giovani donne, l'odds ratio per stroke ischemico in presenza di LA è 43.1, e questo sale a 87.0 in presenza di concomitante stress ossidativo indotto dal fumo di sigaretta.¹⁶

L'ossido nitrico di origine endoteliale, prodotto dalla conversione enzimatica della L-Arginina da parte dell'ossido nitrico sintasi, gioca un importante ruolo nella funzione endoteliale del soggetto sano.^{48,49} La ridotta espressione ed attività dell'ossido nitrico sintasi endoteliale può determinare la generazione di superossido e perossinitrito.⁵⁰ I

pazienti con APS hanno ridotti livelli plasmatici di nitriti rispetto ai controlli⁵¹ suggerendo un' anormale attività dell'enzima ossido nitrico sintasi.

Recentemente è stato stabilito il ruolo di fattori di rischio vascolare nello sviluppo di eventi clinici in pazienti con APS. Infatti i pazienti con aPL che manifestano trombosi presentano uno o più fattori di rischio cardiovascolare aggiuntivi come ipertensione arteriosa, fumo, ipercolesterolemia o terapia ormonale con estrogeni.⁵²

La coesistenza del LES può avere un impatto sul rischio di trombosi poiché il LES stesso è un fattore di rischio per trombosi. I pazienti con LES hanno un'incidenza di eventi vascolari, non spiegabili completamente con i tradizionali fattori di rischio, più alta dell'atteso.⁵³ La positività degli aPL nei pazienti affetti da LES incrementa ulteriormente il rischio di trombosi e la diagnosi di LES aumenta la probabilità di eventi vascolari in pazienti con aPL. Nei pazienti affetti da LES con positività anticorpale per aPL il rischio annuale di un primo evento trombotico è più alto rispetto ai soggetti sani con positività per gli aPL (portatori) senza altri rischi cardiovascolari (4% vs <1%).⁵⁴

Studi osservazionali suggeriscono che altre manifestazioni cliniche di APS, diverse da quelle incluse nei criteri di classificazione, come lesioni valvolari cardiache,¹⁷ *livedo reticularis* e trombocitopenia⁵² possono essere associate con trombosi, ma queste associazioni non sono considerate sufficientemente forti da guidare decisioni cliniche.

Ad oggi il quesito ancora irrisolto è perché alcuni portatori non sviluppino mai alcuna manifestazione clinica di APS, alcuni sviluppino trombosi mentre altri manifestino patologia gravidica, e un piccolo numero di soggetti sviluppi una forma catastrofica di APS (CAPS), caratterizzata da un' insufficienza d'organo multipla causata da microtrombosi intravascolare, che in pochi giorni porta a morte fino al 50% dei pazienti.^{55,56} E' per questo che la valutazione del rischio di sviluppare manifestazioni cliniche di APS per un portatore di positività per aPL riveste grande importanza per il clinico.⁵⁷ Per aiutare i clinici a quantificare il rischio di eventi trombotici e ostetrici in APS sono stati proposti degli score che potessero consentire la stratificazione dei pazienti sulla base del rischio di sviluppare nuovi eventi e quindi la probabilità di beneficiare di un approccio preventivo.

Il più recente è il GAPSS (Global APS Score)¹⁴, mostrato nella Tabella 3, che include fattori di rischio indipendenti per trombosi e patologie della gravidanza, prendendo in

considerazione il profilo della positività anticorpale per aPL, e la presenza di altri fattori di rischio cardiovascolare classici come la presenza di ipertensione arteriosa e la dislipidemia.

	Fattore	Punteggio
aPL	IgG/IgM aCL	5
	IgG/IgM anti-β2-GPI	4
	LA	4
	IgG/IgM anti-(aPS/PT)	3
Fattori di rischio cardiovascolare	Iperlipidemia	3
	Ipertensione arteriosa	1

Tabella 3 Il GAPSS score

Il GAPSS include IgG/IgM aCL (5 punti), IgG/IgM anti-β2GPI (4 punti), LA (4 punti), IgG/IgM anti-complesso fosfatidilserina-protrombina (aPS/PT) (3 punti), iperlipidemia (3 punti) e ipertensione arteriosa (1 punto).

Questo score, validato in diversi grandi studi prospettici coinvolgenti pazienti affetti da APS primaria e secondaria, sembra essere un promettente strumento per quantificare il rischio di trombosi e patologia ostetrica nei pazienti affetti da APS.⁵⁸⁻⁶⁰ I pazienti con valore di GAPSS maggiore o uguale a 11 hanno un maggior rischio di recidiva.⁶

Le microparticelle

Le microparticelle (MP) sono frammenti rilasciati da cellule attivate o apoptotiche, che vanno incontro ad un processo di rimodellamento della membrana cellulare con l'esternalizzazione di fosfolipidi anionici- in primo luogo la fosfatidilserina- portando alla formazione di vescicole.^{61,62} Questo processo rilascia MP delimitate da membrane che si distinguono dal pool di vescicole intracellulari come gli esosomi (anch'essi rilasciati da cellule attivate e apoptotiche) per dimensioni e composizione.⁶³

Le MP circolanti possono avere origine da diversi tipi di cellule come i leucociti (LMP), le cellule endoteliali (EMP) e le piastrine (PMP).⁶⁴ Poiché la membrana esterna di ciascuna microparticella è derivata dalla sua cellula di origine, è possibile determinare la sua origine mediante il riconoscimento di specifici marcatori cellulari usando tecniche citofluorimetriche e test immunoenzimatici.^{65,66} La presenza della fosfatidilserina sulla superficie esterna di ogni microparticella permette il legame dell'Annexina V che è il più comune marcatore usato per riconoscere e quantificare le MP.⁶³ La presenza di altri marcatori di superficie come la glicoproteina IIb-IIIa, CD62p e/o CD42a identificano le PMP; CD4, CD8 e/o CD45 identificano le LMP; e CD31, CD62e, CD144 e/o CD146 identificano le EMP.⁶⁵

Le MP circolanti si possono trovare a basse concentrazioni nel sangue periferico di soggetti sani, ma livelli elevati sono rilevati in molte malattie compresa l'aterosclerosi e le patologie infiammatorie ed autoimmuni.^{62,64} Approssimativamente dal 5-15% di queste MP sono EMP.⁶⁷ L'incremento del numero delle MP circolanti, in particolare le EMP, è considerato un segno di disfunzione vascolare e malattia cardiovascolare. In particolare, livelli incrementati di EMP si riscontrano in pazienti ipertesi,⁶⁸ diabetici,⁶⁹ affetti da sindrome coronarica acuta^{70,71} rispetto ai soggetti sani. Le piccole dimensioni delle MP (0.1-1 µm di diametro) consentono loro di avere effetti locali e sistemici sui vasi.⁶⁴ Ad esempio, sulla superficie delle EMP sono espresse molecole di adesione come la E-selectina e la ICAM-1 che determinano un incremento del legame e dell'attivazione di monociti⁷² e leucociti⁷³ in pazienti affetti da sclerosi multipla e sindrome metabolica. Quindi le EMP possono avere proprietà pro-adesive e pro-infiammatorie. Inoltre, l'espressione sulla superficie delle EMP di varie molecole anticoagulanti, come la proteina C⁷⁴ e l'inibitore della via del TF⁷⁵, e di fattori

procoagulanti come il TF⁷⁶ è probabilmente il meccanismo cruciale mediante il quale le MP sono capaci di innescare il processo coagulativo. Sono state inoltre descritte altre importanti funzioni delle EMP. Ad esempio, studi in vitro hanno mostrato che le EMP esprimono il fattore di von Willebrand che porta alla formazione di stabili aggregati piastrinici.⁷⁷ Inoltre, le EMP riducono in vitro il rilascio dell'ossido nitrico endoteliale^{67,78} che può contribuire ad un'ulteriore disfunzione vascolare in vivo. Alcune EMP possono anche stimolare l'attivazione e l'apoptosi delle cellule (sia quelle di origine sia altre), innescando un loop a feedback positivo per il rilascio di altre MP.⁷⁹ Essendo le EMP marcatori di danno vascolare, è stato ipotizzato che possano essere importanti nella patogenesi della APS. Combes et al.⁷⁶ hanno studiato pazienti con positività per LA e li hanno correlati ai soggetti sani. Solo una minoranza dei soggetti studiati da Combes (13/30) aveva presentato trombosi. I livelli di EMP circolanti erano maggiori nei pazienti con positività per LA rispetto ai controlli sani. Inoltre, le EMP erano significativamente più alte nei 13 pazienti LA positivi che avevano sviluppato trombosi, rispetto ai 17 che non l'avevano sviluppata.⁷⁶

Un ulteriore studio di questo stesso gruppo⁸⁰ ha misurato i livelli di EMP in 111 pazienti classificati in 5 gruppi: APS; LES con positività per aPL ma non APS; LES senza positività per aPL o trombosi; pazienti affetti da trombosi ma senza patologie autoimmuni e senza positività per aPL; soggetti sani. Rispetto ai soggetti sani le EMP circolanti erano elevate nei due gruppi di soggetti che erano aPL positivi ma non nei due gruppi aPL negativi (indipendentemente dagli eventi di trombosi).

In contrasto, Jy et al⁸¹ hanno studiato 88 pazienti con livelli persistentemente elevati di aPL, dei quali 60 avevano una storia di trombosi. I livelli di EMP erano molto più alti negli 88 pazienti rispetto ai valori di EMP e differivano statisticamente tra i gruppi con e senza precedente trombosi. I livelli di EMP erano più alti nei pazienti con aPL rispetto ai soggetti sani ma i valori non erano significativamente più alti nei pazienti con storia di trombosi rispetto ai pazienti che non avevano avuto precedenti eventi trombotici.

Quindi i risultati di questi tre studi suggeriscono che la presenza di aPL circolante è sufficiente a stimolare la produzione di elevati livelli di EMP, ma che le proprietà di queste EMP possano essere differenti in pazienti con trombosi correlata alla positività per aPL rispetto ai soggetti solamente portatori di aPL, senza eventi di trombosi.

Scopo dello studio

La grande varietà dei quadri clinici caratterizzati dalla positività per aPL rende difficile la stratificazione dei pazienti in base al rischio di presentare eventi trombotici con conseguenti difficoltà che si ripercuotono sulle scelte terapeutiche.

La positività per aPL non sempre determina lo sviluppo di APS, ma può riscontrarsi anche in soggetti sani senza storia di trombosi o di patologia della gravidanza. Inoltre, ci sono alcuni pazienti con positività per aPL che, nonostante l'assenza dei criteri clinici necessari per la diagnosi di APS, presentano alcune caratteristiche cliniche associate con APS definite "non criteria".^{1,21} Per questa tipologia di paziente, di cui non conosciamo il potenziale protrombotico, non è chiara la corretta strategia terapeutica. Quindi allo scopo di migliorare la caratterizzazione dei pazienti e di riuscire ad identificare quelli a più alto rischio di sviluppare trombosi, abbiamo eseguito una valutazione delle MP circolanti in qualità di marcatori di danno vascolare e piastrinico.

Poiché i metodi per analizzare le MP nei campioni di sangue periferico non sono ancora completamente standardizzate^{82,83-85} abbiamo allestito una nuova strategia per quantificare le MP. Inoltre abbiamo caratterizzato le diverse sottopopolazioni di MP circolanti in pazienti affetti da APS e in soggetti portatori di aPL e quindi abbiamo messo in relazione la quantità ed il fenotipo delle MP con le caratteristiche cliniche.

Materiali e metodi

Popolazione

Sono stati arruolati 48 soggetti che presentavano una positività per anticorpi antifosfolipidi (aPL) nel siero: 16 pazienti avevano una diagnosi di APS primitiva (PAPS), 16 erano soggetti con positività anticorpale ma senza i criteri clinici per APS (portatori), e 16 erano soggetti sani. In particolare, portatori erano considerati: a) tutti i soggetti asintomatici che erano stati occasionalmente sottoposti a screening per aPL e risultati positivi (questi soggetti, sottoposti a screening altrove, sono stati esaminati per escludere o confermare la presenza di APS o di altre malattie autoimmuni come il Lupus Eritematoso Sistemico); b) tutti i pazienti che si sono rivolti alla nostra attenzione per la presenza di positività anticorpale per aPL associata a caratteristiche cliniche suggestive come manifestazioni neurologiche di natura non ischemica, *livedo reticularis* e trombocitopenia (questi pazienti, in accordo al consenso di Miyakis, presentavano le caratteristiche definite non-criteri di APS).

Ottenuta l'approvazione del Comitato Etico locale, i pazienti arruolati hanno partecipato allo studio previo consenso informato. I portatori e i PAPS sono risultati positivi per uno o più test per gli aPL (LA, IgG/IgM anticorpi aCL, o IgG/IgM anticorpi anti- β 2-GPI) in due o più occasioni a distanza di 12 settimane dalla prima determinazione¹. Un test di screening basato sul PTT e un test di conferma con il veleno di vipera Russell diluito sono stati usati per diagnosticare la presenza di LA. Gli anticorpi IgG/IgM aCL sono stati quantificati utilizzando il test EliA Cardiolipin (Phadia GmbH, Germany) e i risultati sono stati espressi, rispettivamente, come GPL-, MPL-U/ml. In accordo ai Criteri di Sydney [1] i valori cut-off per la positività sono stati considerati > 40 GPL/MPL, mentre i risultati tra 10 e 40 GPL-,MPL-U/ml sono stati classificati come debolmente positivi. La determinazione degli anticorpi IgG/IgM anti- β 2-GPI è stata eseguita usando il test EliA β 2-glicoproteina I (Phadia GmbH, Germany) e per la mancanza di una standardizzazione internazionale, i risultati EliA β 2-glicoproteina I sono stati dati in unità EliA arbitrarie. Il cut-off è stato stabilito a 10 EliA U/ml.

Tutti i pazienti APS avevano presentato un episodio di trombosi venosa almeno un anno prima della nostra analisi, mentre nessuna paziente aveva riferito manifestazioni ostetriche; di questi 4 hanno presentato una singola positività al test per aPL (APS s), 4

una doppia positività (APS d) e 8 erano tripli positivi (APS t). Tra i soggetti portatori 5 hanno mostrato una singola positività anticorpale (CAR s), 4 una doppia positività (CAR d) e 7 una tripla positività (CAR t). Sette portatori (1 CAR s, 2 CAR d e 4 CAR t) su 16, avevano caratteristiche cliniche associate con APS (ma non incluse nei criteri revisionati di Miyakis), come manifestazioni neurologiche, trombocitopenia e *livedo reticularis*, mentre i restanti 9 (4 CAR s, 4 CAR d e 1 CAR t) erano completamente asintomatici. Le caratteristiche dei pazienti e dei soggetti sani sono rappresentate nella Tabella 4.

Codice (positività aPL)	Sesso	Età	LA	IgM aCL (U/ml)	IgG aCL (U/ml)	IgM anti-β2GPI (U/ml)	IgG anti-β2GPI (U/ml)	Caratteristiche associate con APS	MP totali/μl
CAR (s) n.1	M	44	-	9.9	44	6.7	10	-	270,874
CAR (s) n.2	F	58	-	12	0.8	36	1.9	-	367,010
CAR (s) n.3	M	43	+	7	8.4	4.5	10	-	264,612
CAR (s) n.4	F	26	+	8	10	3.2	6.7	-	358,140
CAR (s) n.5	M	79	+	1.2	1.3	0	0.8	+	379,222
CAR (d) n.6	F	51	-	0	175	0	24	+	401,104
CAR (d) n.7	F	53	-	157	23	60	2.4	+	337,817
CAR (d) n.8	M	52	-	1	60	0.1	48	-	373,891
CAR (d) n.9	F	47	-	18	78	1.3	161	-	358,734
CAR (t) n.10	F	52	+	0.7	84	4.1	125	-	324,717
CAR (t) n.11	F	42	+	3.8	90	0.6	50	-	252,930
CAR (t) n.12	F	79	+	264	1.6	55	0.9	+	362,127
CAR (t) n.13	F	82	+	32	44	11	66	+	406,818
CAR (t) n.14	F	37	+	49	0.9	38	0.9	-	322,366
CAR (t) n.15	F	31	+	238	295	86	172	+	466,844
CAR (t) n.16	F	40	+	28	105	9.9	66	+	563,332
CAR tot:16	4/M	51							Media geometrica
	12/F								363,159
APS (s) n. 17	M	72	+	3.7	0.7	9.3	0.4	-	407,694
APS (s) n. 18	F	44	-	9.7	5.9	4	18	-	350,034
APS (s) n. 19	M	76	+	4.5	1.2	0	0.3	-	394,162
APS (s) n. 20	M	40	+	0	0.2	0	0	-	356,645
APS (d) n. 21	M	43	-	0.9	33	0	14	-	386,756
APS (d) n. 22	F	31	-	14	89	10	47	-	400,569
APS (d) n. 23	M	63	-	2	74	1.6	167	-	411,245
APS (d) n. 24	F	49	-	69	235	204	208	-	568,738
APS (t) n. 25	F	61	+	1.4	258	<0.01	187	-	593,663
APS (t) n. 26	M	56	+	1.2	114	<0.01	358	-	356,078
APS (t) n. 27	M	27	+	6.6	107	2.9	34	-	451,370
APS (t) n. 28	M	43	+	3.5	460	0.5	619	-	490,195
APS (t) n. 29	F	42	+	12	150	7	97	-	485,248
APS (t) n. 30	M	59	+	0.2	43	<0.01	109	-	491,350
APS (t) n. 31	M	77	+	3.8	43	<0.01	32	-	374,094
APS (t) n. 32	F	24	+	18	220	5.4	160	-	515,350
APS tot:16	10/M	50							Media geometrica
	6/F								439,574
HS n.33	F	33	-	0	0.2	<0.01	<0.01	-	205,792
HS n.34	F	28	-	0.2	1.6	1.2	<0.01	-	268,267
HS n.35	F	26	-	0	5.2	<0.01	1.5	-	257,832
HS n.36	F	59	-	0	0.4	<0.01	<0.01	-	170,597
HS n.37	M	36	-	2	0	0.3	<0.01	-	269,650
HS n.38	M	69	-	0.1	0	3	0.8	-	275,646
HS n.39	F	24	-	0.1	3.5	1.2	<0.01	-	258,707
HS n.40	F	50	-	0	1.2	0.5	<0.01	-	203,274
HS n.41	M	26	-	3.8	1.5	<0.01	<0.01	-	271,295
HS n.42	F	45	-	0.2	0.2	<0.01	0.7	-	15,353
HS n.43	M	40	-	3.5	0.3	<0.01	7.8	-	267,891
HS n.44	M	62	-	1.4	0	<0.01	0.5	-	201,567
HS n.45	M	75	-	0	0	3.5	<0.01	-	173,900
HS n.46	F	26	-	0.1	0.2	6.8	<0.01	-	159,599
HS n.47	M	60	-	0	3.8	1.2	<0.01	-	220,898
HS n.48	M	43	-	0.1	7.8	<0.01	5.4	-	243,567
HS tot:16	8/M	44							Media geometrica
	8/F								216,490

Tabella 4 Caratteristiche dei pazienti e numero di microparticelle (MP) circolanti

La citofluorimetria

La citofluorimetria permette lo studio di popolazioni cellulari sospese in mezzo liquido (PBS o fisiologica) al fine di definirne fenotipo e funzioni.

L'apparecchiatura è formata da un circuito idrodinamico che trasporta il campione, una sorgente laser che interagisce con la sospensione a singole cellule, un sistema ottico ed uno elettronico. L'apparato ottico analizza i segnali di riflessione e diffrazione creati dalla luce incidente sulle cellule e la fluorescenza emessa da fluorocromi impiegati come marcatori antigenici, convogliando poi tali segnali a fotomoltiplicatori che li trasducono in impulsi elettrici. Il citofluorimetro è collegato ad un computer che, in fine, elabora e analizza i dati creando istogrammi e statistiche facendo riferimento a differenti parametri. I segnali generati dall'interazione del campione con il laser sono di tipo fisico (Scatter): la luce diffusa nella stessa direzione della luce incidente dà informazioni sulla dimensione cellulare (FSC –Forward Scatter), mentre la luce diffusa con angolo di 90° dà informazioni sulla complessità cellulare (SSC –Side Scatter). Questi segnali permettono di definire un gate sulla popolazione in analisi.

Evidenziato il gate relativo alle cellule d'interesse, con il citofluorimetro se ne può caratterizzare il fenotipo mediante uso di anticorpi monoclonali diretti contro marcatori cellulari, opportunamente associati a fluorocromi. Grazie alla diversa fluorescenza (FITC, PE, PerCP, ecc.) è dunque possibile isolare nel gate varie tipologie cellulari specifiche, esprimenti un certo antigene di membrana o citoplasmatico. Si considerano cellule che posseggono un dato antigene quelle che emettono fluorescenza sopra la soglia (questa viene impostata grazie a un preparato di controllo la cui fluorescenza quantifica la percentuale di popolazione da non considerare, cioè che mostra autofluorescenza o legami non specifici con l'anticorpo).

Preparazione delle microparticelle e marcatura

I campioni di sangue per l'analisi delle MP sono stati raccolti in provette con anticoagulante sodio citrato alla concentrazione finale 3.2% (0.105 M) e processati entro 1 ora.⁸⁶ Il plasma privato delle piastrine (PFP) è stato preparato mediante centrifugazioni seriali a temperatura ambiente (15 minuti a 1500xg, e 3 minuti a 3000xg),⁸⁷ congelato in aliquote da 500µl in provette da 1.5 ml e conservato a -80 °C fino al momento dell'analisi.

Per ciascuna analisi sono stati marcati 50 µl di PFP appena scongelato, aggiungendo: 4 µl di BD Horizon Violet Proliferation Dye 450 (VPD450, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), 5 µl di APC Annessina V (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), 5 µl di 7-Amino-Actinomicina (7-AAD, BD Pharmingen). Poiché il legame dell' APC Annessina V è calcio dipendente, la colorazione è stata eseguita in 200 µl di tampone con Ca²⁺ (Binding buffer 2X, BB2X, BD Pharmingen). La concentrazione d'uso ottimale del calcio è stata determinata con esperimenti di titolazione. Per identificare da quali cellule originassero le MP, sono stati aggiunti i seguenti marcatori di superficie cellulare, fluorescenti: 5 µl APC-H7 Mouse anti-CD45 umano (BD Pharmingen) per identificare le LMP, 5 µl FITC Mouse anti-CD31 umano e 5 µl PerCP-Cy5.5 Mouse anti-CD41a umano (BD Biosciences) per identificare le EMP e le PMP. Dopo 1 ora di incubazione (4°C al buio) è stato aggiunto BB2X ed è stata effettuata l'analisi citofluorimetrica. La concentrazione ottimale di ciascun anticorpo o colorante utilizzato è stata determinata sperimentalmente mediante titolazioni. VPD450 è un colorante eccitabile con il laser viola; il colorante VPD450 non fluorescente diffonde passivamente attraverso le membrane cellulari ed è clivato dall'attività di un'esterasi nel citoplasma delle cellule vitali, o in vescicole intatte. Il colorante clivato diventa altamente fluorescente e si lega covalentemente ai gruppi aminici delle proteine presenti all'interno delle cellule. Questo consente di identificare vescicole di membrana chiuse, come le MP, escludendo i frammenti cellulari.^{88,89} Inoltre, le cellule vitali con membrane intatte escludono la 7-AAD; questa molecola consente la discriminazione di MP da membrane di cellule morte o danneggiate e da corpi apoptotici, che sono permeabili alla 7-AAD e positivi all'Annessina V.

Analisi citofluorimetrica

I campioni di plasma sono stati analizzati immediatamente dopo la marcatura usando il citofluorimetro BD FACSCanto ed il software BD FACSDiva™. Al fine di rilevare l'autofluorescenza e settare il fotomoltiplicatore per tutti i canali considerati, è stato acquisito un campione non marcato. Le MP sono state prima di tutto identificate per la loro dimensione relativa. I canali per FSC (Forward Scatter) e SSC (Side Scatter) sono stati usati su scala logaritmica. Il setup del fotomoltiplicatore FSC e SSC è stato calcolato usando il rumore di fondo come limite più basso. Il fotomoltiplicatore FSC è stato aumentato finché il rumore di fondo non era visibile nei dot plots. Il gate delle MP è stato stabilito sullo strumento FACSCanto mediante preliminari esperimenti di standardizzazione, usando Megamix (Biocyx, Marseille, France), una miscela di biglie di vari diametri ove rientravano anche le dimensioni delle MP (0.5-0.9 μm) e delle piastrine (0.9-3 μm).

Poichè Megamix identifica solo le MP con dimensione tra 0.5-1 μm ma le MP hanno dimensioni da 0.1 a 1 μm , abbiamo usato come soglia il valore più basso. Così la soglia, settata sul canale FSC, è stata progressivamente incrementata fino a ridurre il rumore, al fine di identificare MP più piccole di 0.5 μm che erano distinte dal rumore di fondo attraverso la positività VPD450. In questo modo abbiamo ipotizzato di raggiungere 0.1 μm come limite più basso. Usando la tecnica di pipettaggio inverso, 50 μl del campione diluito incubato sono stati pipettati in una provetta TruCount (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) a cui sono stati aggiunti 450 μl di tampone di legame. Le provette TruCount, contenenti un numero standard di biglie fluorescenti, sono state usate per quantificare le MP.

Abbiamo definito le MP come particelle con meno di 1.0 μm di diametro, e indipendentemente dall'espressione dell'Annessina V, VPD-450 positive e 7-AAD-negative. In più, abbiamo identificato il fenotipo delle MP mediante l'espressione di specifici marcatori cellulari (Fig. 1).

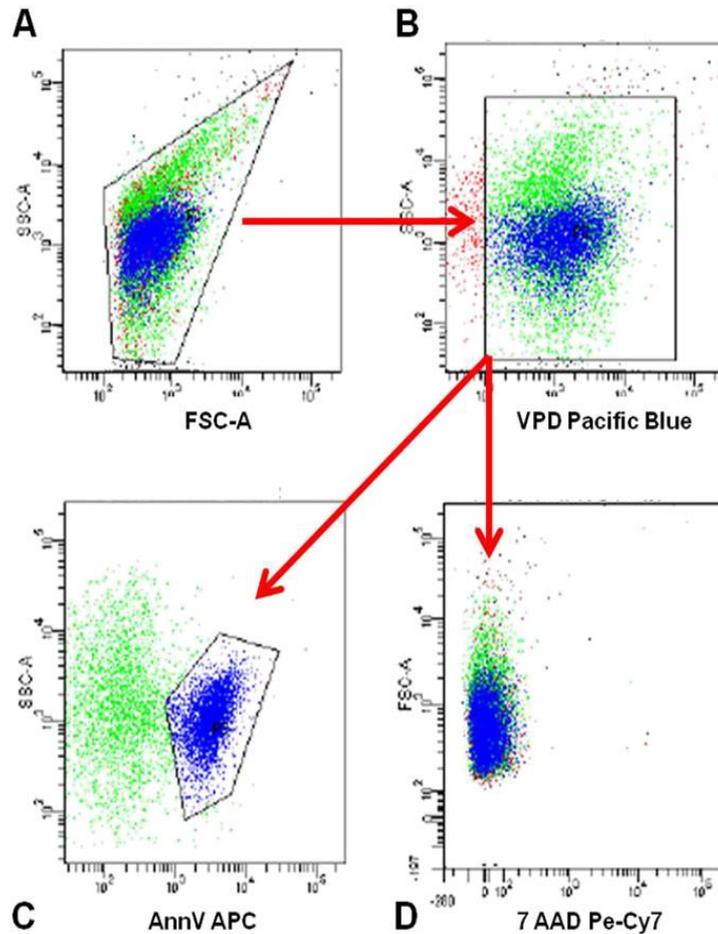


Fig. 1 Identificazione citofluorimetrica delle microparticelle (MP) Annessina V⁺. Mediante il profilo di diffusione della luce (A), la positività al VPD450 Pacific Blue (B), la positività all'Annessina V APC (C), e la negatività al 7AAD Pe-Cy7 (D).

Le EMP presentavano il seguente fenotipo: AnnV^{+/-}/CD31⁺/CD41a⁻/CD45⁻, le PMP si distinguevano per AnnV^{+/-}/CD31^{dim}/CD41a⁺/CD45⁻ e infine le LMP erano definite come AnnV^{+/-}/CD31⁻/CD41a⁻/CD45⁺. L'acquisizione dei campioni veniva fermata quando il numero di biglie TruCount acquisite nel gate relativo raggiungeva 5000 eventi. Il numero delle MP per microlitro veniva calcolato con la seguente formula:

$$[(N. \text{ di eventi nel gate contenente le MP} / N. \text{ di eventi nel gate delle biglie}) \times (N. \text{ di biglie per test} / V \text{ del campione } (\mu\text{l}))] \times \text{Fattore di Diluizione.}$$

Analisi statistica

I dati sono stati calcolati e processati usando il software “GraphPad Prism 5”. I valori continui con distribuzione normale sono stati espressi come media \pm deviazione standard. L’analisi è stata eseguita con il test t di Student e le differenze sono state considerate significative per $p < 0.05$.

Risultati

Valutazione delle microparticelle totali VPD450⁺

Per riconoscere le MP con strutture di membrana intatta dai frammenti cellulari e quindi, per valutare la quota corretta delle MP totali includendo le MP Annessina V⁻, abbiamo usato il colorante VPD450.

Stimando sia le MP Annessina V⁺ e Annessina V⁻, abbiamo osservato una quota significativamente più alta di MP Annessina V⁻ rispetto alla quota della MP Annessina V⁺. Quando espresse come percentuale delle MP totali, la popolazione delle MP Annessina V⁺ era rappresentata nel 13.8 % dei soggetti sani, nel 14.4 % dei portatori e nel 15.8 % dei pazienti affetti da APS (Fig. 2A). Il numero totale delle MP è risultato essere significativamente incrementato nei portatori ($3.63 \times 10^5 \pm 0.19 \times 10^5$) rispetto ai soggetti sani ($2.16 \times 10^5 \pm 0.17 \times 10^5$) ($p < 0.0001$) e nei soggetti affetti da APS ($4.4 \times 10^5 \pm 0.19 \times 10^5$) rispetto ai portatori ($p < 0.0085$) (Fig. 2B). Infine abbiamo riscontrato un incremento simile nella distribuzione delle MP Annessina V⁺ (Fig. 2C), in dettaglio $2.99 \times 10^4 \pm 0.2 \times 10^4$ nei soggetti sani, $5.23 \times 10^4 \pm 0.3 \times 10^4$ nei portatori e $6.96 \times 10^4 \pm 0.3 \times 10^4$ nei pazienti affetti da APS.

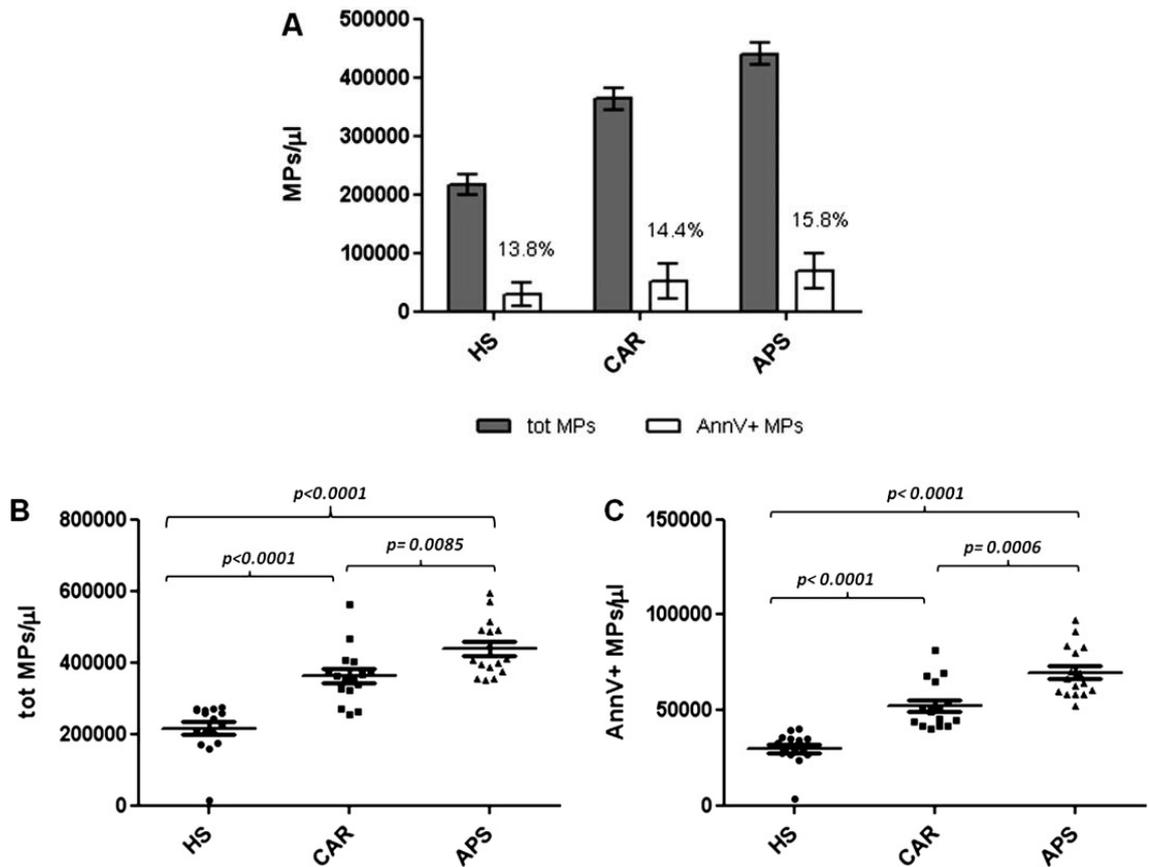


Fig. 2 Percentuale e distribuzione delle microparticelle (MP) totali. A) Numero di MP totali (nero) e percentuale di MP Annessina V⁺ (bianco). B) Distribuzione delle MP totali e C) delle MP Annessina V⁺, isolate dal plasma di soggetti sani (HS), portatori (CAR) e pazienti APS (APS).

Distribuzione dei differenti sottotipi di microparticelle

In considerazione dell'incrementato numero di MP, è stata condotta un'analisi volta ad indagare se l'incremento fosse uniforme in tutti i diversi sottotipi di MP o se fosse relativo solamente ad alcune specifiche sottopopolazioni. A questo proposito abbiamo valutato l'origine delle differenti MP nel plasma degli stessi pazienti. Abbiamo quindi riscontrato che il numero di PMP (Fig. 3A), LMP (Fig. 3B) ed EMP (Fig. 3C) era significativamente più alto nei pazienti APS rispetto ai portatori e nei portatori rispetto ai soggetti sani.

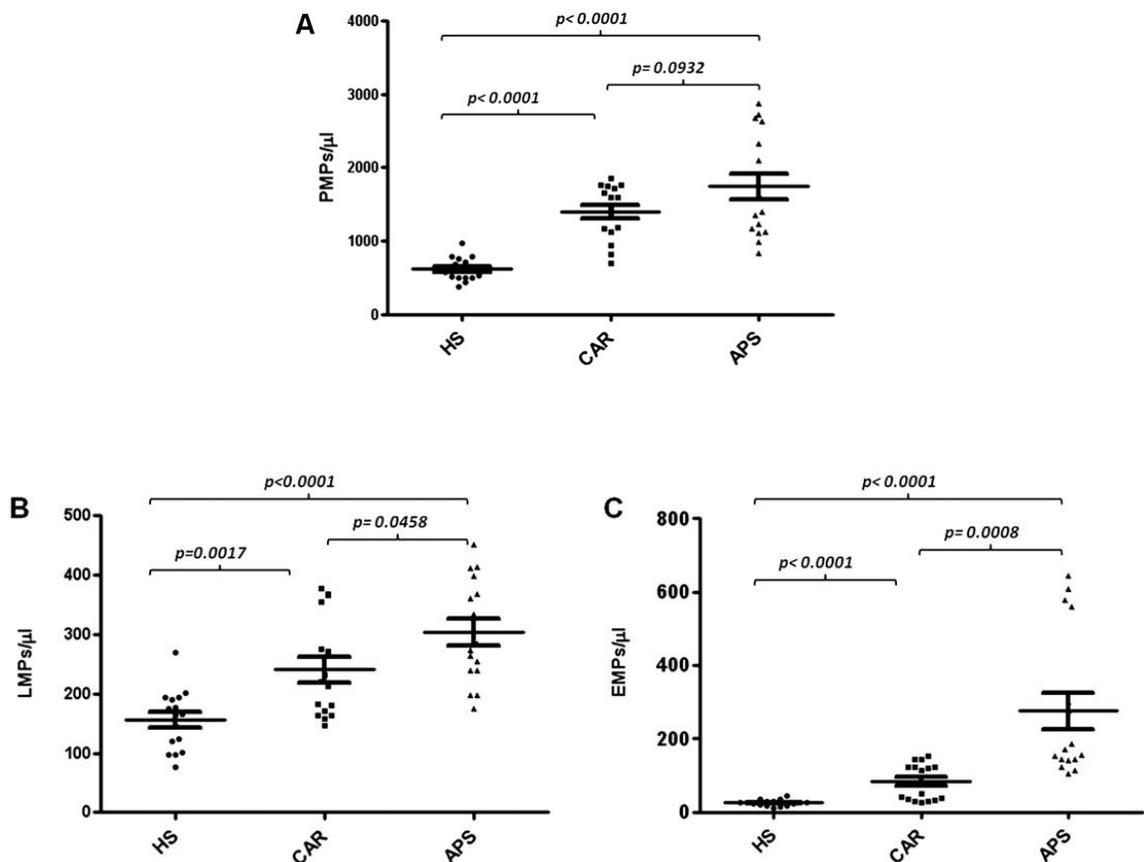


Fig. 3 Distribuzione dei differenti sottotipi di MP nei soggetti sani (HS), portatori (CAR) e pazienti APS (APS). Numero di PMP (A), LMP (B), EMP (C).

Nella Tabella 5 abbiamo riportato il valore medio (numero per microlitro) delle differenti popolazioni di MP isolate dal plasma dei soggetti sani, dei portatori e dei pazienti APS.

MP/μl (% delle MP totali)	Soggetti sani = 16	Portatori = 16	Pazienti APS = 16
MP totali	$2.16 \times 10^5 \pm 0.17 \times 10^5$	$3.63 \times 10^5 \pm 0.19 \times 10^5$	$4.4 \times 10^5 \pm 0.19 \times 10^5$
PMP	615.6 ± 39 (0.3)	1401 ± 93 (0.4)	1745 ± 176 (0.4)
LMP	155.8 ± 13 (0.07)	240.3 ± 21 (0.07)	303.6 ± 22 (0.07)
EMP	25.0 ± 2 (0.01)	82.6 ± 13 (0.02)	275.6 ± 50 (0.06)

Tabella 5 Numero medio delle diverse popolazioni di MP isolate dal plasma di soggetti sani, portatori e pazienti affetti da APS

Correlazione tra natura delle microparticelle e caratteristiche cliniche

Infine, abbiamo valutato se il numero ed il fenotipo delle MP potessero correlare con alcuni parametri clinici dei pazienti APS o dei portatori, in primo luogo con la positività per gli anticorpi antifosfolipidi.

Il numero delle MP totali nel plasma dei pazienti APS con triplice (APS t) ($4.7 \times 10^5 \pm 0.3 \times 10^5$) e duplice (APS d) ($4.4 \times 10^5 \pm 0.4 \times 10^5$) positività per aPL era più alto che nei pazienti APS con singola positività per aPL (APS s) ($3.7 \times 10^5 \pm 0.1 \times 10^5$), con una differenza statisticamente significativa per APS t vs APS s ($p=0.0446$) (Fig. 4A).

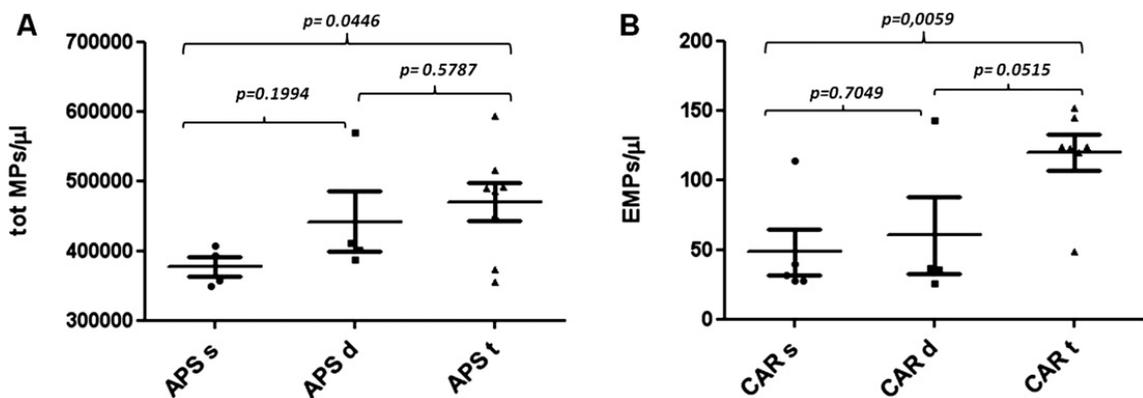


Fig. 4 Correlazione tra MP e positività per aPL. A) Numero delle MP totali circolanti nei pazienti APS con singola (APS s), doppia (APS d) e triplice (APS t) positività per aPL. B) Numero di EMP circolanti isolate dal plasma di portatori con singola (CAR s), doppia (CAR d) e triplice (CAR t) positività per aPL.

Non abbiamo trovato una differenza statisticamente significativa quando abbiamo valutato cambiamenti nelle singole sottopopolazioni di MP in relazione alla positività per aPL. Al contrario, nei portatori, non abbiamo rilevato differenze significative nel numero totale di MP, LMP e PMP, isolate da portatori con singola, doppia o triplice positività per aPL. Ma, il numero di EMP era più grande in CAR t (120 ± 13) rispetto ai CAR s (48 ± 17 ; $p = 0.0059$) e tendeva ad essere più alto che nei CAR d (61 ± 28 ; non significativo) (Fig. 4B).

Inoltre, nei portatori abbiamo correlato le MP con la presenza delle caratteristiche cliniche associate con APS. Abbiamo notato che i portatori con caratteristiche cliniche non criteria (CAR nc) mostravano un incremento nel numero delle MP totali ($4.17 \times 10^5 \pm 0.3 \times 10^5$ vs $3.21 \times 10^5 \pm 0.2 \times 10^5$; $p = 0.0083$) (Fig. 5A) e, in dettaglio, delle PMP (1641 ± 84 vs 1214 ± 120 ; $p = 0.0158$) (Fig. 5B) e delle EMP (112 ± 13 vs 60 ± 17 ; $p = 0.0356$) rispetto ai portatori asintomatici (CAR) (Fig. 5C).

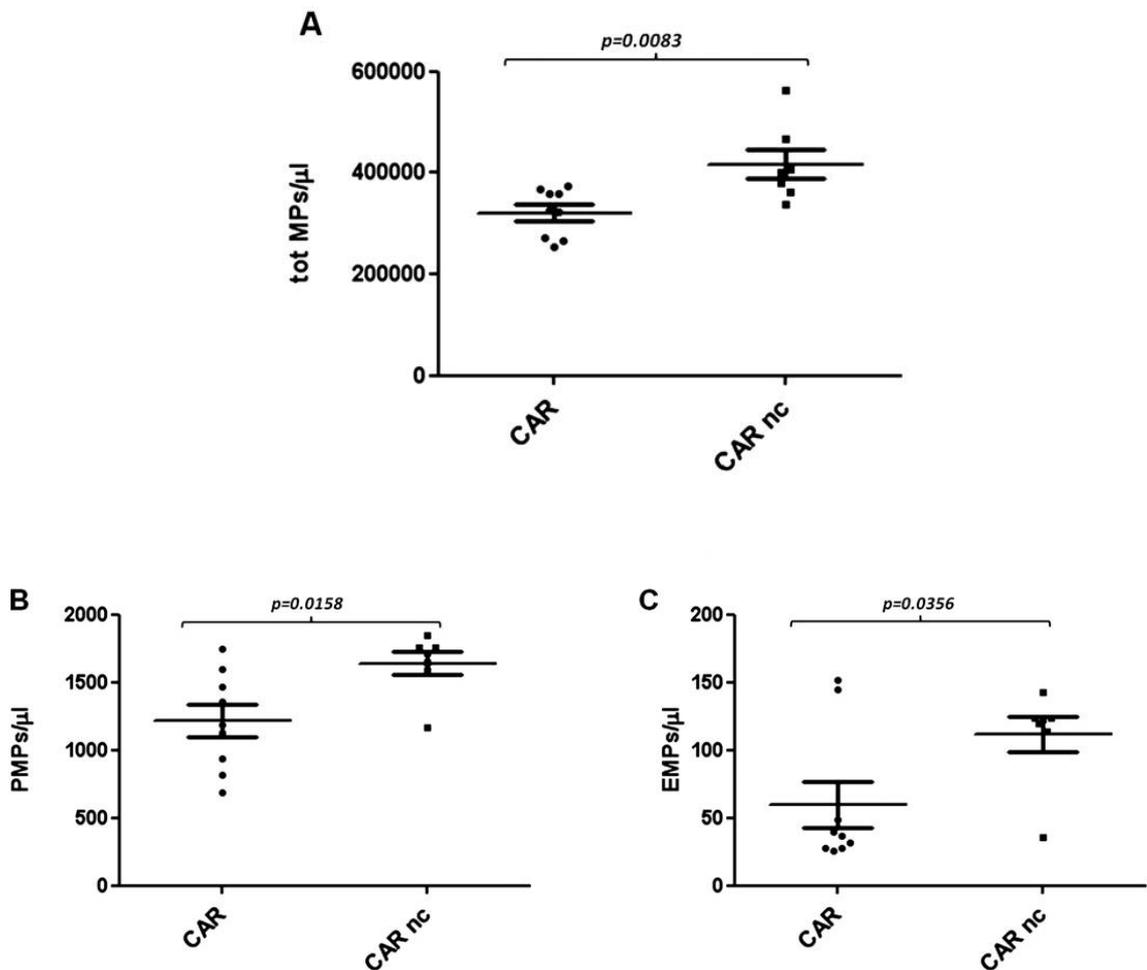


Fig. 5 Caratteristiche non criteria-APS e numero di MP nei portatori. A) Il numero delle MP totali, isolate dal plasma di portatori asintomatici (CAR) o con caratteristiche associate con APS (CAR nc). B) Valutazione del subset delle MP di origine piastrinica. C) Valutazione del subset delle MP di origine endoteliale

Discussione

Un crescente numero di studi supporta il ruolo emergente delle MP in molte patologie⁹⁰ ed in particolare è noto come un' elevata concentrazione di MP possa essere considerata un importante parametro nella valutazione di malattie sistemiche,⁹¹ come la APS. Ma, ad oggi, non esiste un unico metodo per determinare le MP circolanti e probabilmente questo è il motivo per cui talora i risultati riportati in diversi studi risultano discordanti. La citofluorimetria è la tecnica più comunemente usata per l'identificazione delle MP, ma, il suo uso è limitato dalla mancanza di protocolli standardizzati in tutte le diverse fasi analitiche. Perciò, abbiamo testato e valutato un nuovo approccio citofluorimetrico per definire la quantità e anche il fenotipo delle MP nei pazienti APS. La citofluorimetria consente l'identificazione delle MP in base alla loro dimensione, all'espressione di marcatori di superficie (che riflettono quelli delle cellule d'origine), e all'esposizione di fosfolipidi con carica negativa (ad esempio la fosfatidilserina). L'Annessina V è stata utilizzata a lungo come marcatore per l'identificazione delle MP, per la sua capacità di legare i fosfolipidi in presenza di Ca^{2+} e per la sua alta affinità per i fosfolipidi. Studi recenti hanno mostrato, comunque, la presenza di una grande proporzione di MP circolanti, che non sono capaci di legare l'Annessina V, poiché incapaci di esporre i fosfolipidi sulla superficie esterna della membrana, ma soprattutto perchè la concentrazione di Ca^{2+} necessaria per consentire il legame tra Annessina V e MP è tuttora indefinita.⁹²⁻⁹⁴ In più, come notato da Connor e collaboratori, l'esposizione dei fosfolipidi da parte delle MP dovrebbe essere indotta da agonisti e ristretta ad una piccola percentuale di quelli forniti di attività procoagulante.⁹³ Così, per tutti questi motivi, abbiamo impiegato come nuovo marcatore delle MP il colorante VPD450, solitamente utilizzato in citofluorimetria per monitorare la proliferazione cellulare.

In accordo con l'identificazione delle MP ottenuta usando il colorante carbossilfluorescein succinimidil estere (CSFE),⁸⁹ una molecola simile al VDP450 ma con differente lunghezza d'onda di eccitazione, i nostri dati hanno dimostrato, per la prima volta, che il VPD450 può essere validamente impiegato per marcare vescicole chiuse con una membrana intatta, consentendo di escludere i frammenti cellulari che

possono interferire con il riconoscimento e la quantificazione delle MP e, soprattutto, includendo le MP Annessina V⁻, che abbiamo dimostrato essere una quota considerevole delle MP totali. Inoltre, il concomitante e non interferente uso di anti-CD31, anti-CD41a e anti-CD45 ci ha consentito di determinare le cellule di origine delle MP.

In questo modo, usando questo approccio e paragonando i pazienti APS con i donatori sani, abbiamo osservato, in accordo con precedenti studi,^{80,95} un incremento significativo del numero delle MP totali, ed in particolare delle sottopopolazioni piastriniche ed endoteliali. Studi recenti hanno già sottolineato incrementati livelli di PMP e EMP nel plasma dei soggetti positivi per aPL.^{76,80,82,81} In questo studio abbiamo diviso i pazienti in due gruppi principali: i pazienti affetti da APS e i portatori (soggetti aPL-positivi senza i criteri clinici per APS) e, per la prima volta, abbiamo osservato un incremento nel numero delle sottopopolazioni di MP nei portatori rispetto ai controlli sani, e anche, nei pazienti APS, rispetto ai portatori. In particolare, i crescenti livelli di MP Annessina V⁺ dai soggetti sani ai portatori e dai portatori ai pazienti APS, mostravano un incremento di MP circolanti con un fenotipo procoagulante.⁹³ Inoltre, il simultaneo incremento delle PMP, nei pazienti APS e nei portatori conferma i precedenti risultati⁸¹ ed indica l'esistenza di un'attivazione piastrinica cronica, probabilmente dovuta alla diretta interazione tra piastrine e aPL, non solo in pazienti che hanno sviluppato trombosi venosa ma anche in soggetti apparentemente sani con positività anticorpale per aPL.

I dati ottenuti suggeriscono che l'attivazione piastrinica è cronica e continua in pazienti con APS ancora dopo almeno un anno dall'evento trombotico acuto. Questi risultati sono molto importanti se consideriamo che l'80% dei pazienti, sia portatori (13/16) sia APS (14/16), avevano eseguito terapia antiplastrinica o anticoagulante orale; pertanto il trattamento antitrombotico non sembra influenzare il numero di MP circolanti, in quanto queste terapie agiscono con un meccanismo a valle dell'attivazione endoteliale.^{76,96}

Il ruolo delle cellule endoteliali nella patogenesi della APS è ben conosciuto.⁶¹

Precedenti studi hanno riportato un incrementato numero di EMP in pazienti APS e in soggetti positivi per aPL confrontati con i controlli sani.^{76,80,61}

I nostri risultati confermano questi dati. Il numero di EMP è raddoppiato nei portatori (0.02% delle MP totali) rispetto ai controlli sani (0.01%) ed era tre volte più grande nei pazienti rispetto ai portatori (0.06% delle MP totali), dimostrando l'attivazione cronica dell'endotelio nei pazienti aPL positivi con o senza eventi trombotici correlati. Comunque, è la grande differenza tra il numero delle EMP isolate dai portatori e dai pazienti APS, che enfatizza un maggior grado di disfunzione endoteliale in pazienti che hanno un'anamnesi positiva per un evento trombotico.

Infine, per la prima volta, abbiamo anche osservato un incremento del numero assoluto delle LMP, nel plasma dei portatori e dei pazienti APS rispetto ai soggetti sani, sebbene esse rappresentino meno dell'1% di tutte le MP nel sangue.

Un'altra problematica interessante e tuttora aperta è se il numero delle MP circolanti correli con il grado di positività anticorpale per aPL (singola, doppia o tripla) sia nei portatori, sia nei pazienti APS. Noi abbiamo dimostrato che nei portatori, il numero delle EMP incrementava significativamente nei soggetti tripli positivi in confronto ai soggetti con singola o doppia positività, mentre nei pazienti APS il numero delle MP totali era significativamente più alto nei tripli positivi che nei pazienti singoli positivi. Quindi, considerando che i pazienti con una tripla positività hanno una maggiore probabilità di sviluppare eventi trombotici, rispetto a quelli con singola o doppia positività, il numero elevato di MP circolanti in pazienti APS e di EMP nei portatori, potrebbe essere un addizionale marker predittivo di rischio trombotico.

Quindi, poichè 7 dei 16 portatori presentavano caratteristiche associate all'APS (cioè manifestazioni neurologiche, *livedo reticularis*, trombocitopenia), abbiamo valutato la correlazione dei livelli di MP con la presenza di questi sintomi. Il dato interessante è che i portatori sintomatici hanno un maggior numero di MP totali, PMP e EMP, rispetto agli asintomatici. Comunque, il numero totale di MP, PMP e EMP presente nei portatori con caratteristiche cliniche associate ad APS, rimane più basso rispetto a quello dei pazienti con APS. Noi non conosciamo quale sia il meccanismo sottostante questo fenomeno, ma i nostri dati indicano con chiarezza che nei portatori i livelli di MP correlano con la presenza delle caratteristiche cliniche associate all'APS.

Conclusioni

Per la prima volta, utilizzando un nuovo approccio citofluorimetrico, abbiamo osservato che il numero delle MP circolanti riportato negli studi precedenti era probabilmente sottostimato, poiché essi escludevano le MP Annessina V⁻, che rappresentano un grande sottotipo delle MP. Inoltre i livelli alterati di MP trovati nel plasma di pazienti positivi per aPL, indicano uno stato di attivazione cellulare che è molto più pronunciato in pazienti con APS paragonati ai portatori. Infine, i dati preliminari del nostro studio pilota suggeriscono che la valutazione delle MP circolanti, in particolare PMP ed EMP, potrebbe essere usata come marcatore surrogato per il monitoraggio del danno piastrinico e vascolare e, se confermato in una popolazione più grande, potrebbe essere usato come fattore prognostico per identificare i soggetti positivi a più alto rischio di sviluppare trombosi e per i quali potrebbero essere richieste specifiche strategie preventive. Sicuramente il relativamente piccolo numero di pazienti esaminati è la limitazione maggiore del nostro studio pertanto ulteriori studi sono necessari per confermare i nostri dati. In conclusione, per la prima volta, abbiamo provato a caratterizzare le diverse sfumature della rara malattia APS ottenendo alcuni risultati preliminari in soggetti come i portatori, solitamente non valutati dagli studi precedenti.

Bibliografia

1. Miyakis S, Lockshin M.D, Atsumi T, Branch D.W, Brey R.L, Cervera R et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost*, 4:295–306; 2006.
2. Cervera R, Piette J.C, Font J, Khamashta M.A, Shoenfeld Y, Camps M.T et al. Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis Rheum*, 46:1019-1027; 2002.
3. Cohen D, Berger S.P, Steup-Beekman G.M, Bloemenkamp K.W, Bajema I.M. Diagnosis and management of the antiphospholipid syndrome. *BMJ*, 340:c2541; 2010.
4. Cervera R, Khamashta M.A, Shoenfeld Y, Camps M.T, Jacobsen S, Kiss E et al. Morbidity and mortality in the antiphospholipid syndrome during a 5-year period: a multicentre prospective study of 1000 patients. *Ann Rheum Dis*, 68:1428-1432; 2009.
5. Cervera R, Serrano R, Pons-Estel G.J, Ceberio-Hualde L, Shoenfeld Y, de Ramón E et al. Morbidity and mortality in the antiphospholipid syndrome during a 10-year period: a multicentre prospective study of 1000 patients. *Ann Rheum Dis*, 74:1011-1018; 2015.
6. Sciascia S, Baldovino M.S, Schreiber K, Solfietti L, Radin M, Cuadrado M.J, Menegatti E, Erkan D, Roccatello D. Thrombotic risk assessment in antiphospholipid syndrome: the role of new antibody specificities and thrombin generation assay. *Clin Mol Allergy*, 14:6; 2016.
7. Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand J.H, Ortel T.I, Galli M et al. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. *J Thromb Haemost*, 7:1737-1740; 2009.
8. de Groot P.G, Lutters B, Derksen R.H, Lisman T, Meijers J. C, Rosendaal F.R. Lupus anticoagulants and the risk of a first episode of deep venous thrombosis. *J Thromb Haemost*, 3:1993-1997; 2005.
9. Sciascia S, Cosseddu D, Montaruli B, Kuzenko A, Bertero M.T. Risk Scale for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis*, 70:1517-1518; 2011.
10. Sciascia S, Murru V, Sanna G, Roccatello D, Khamashta M.A, Bertolaccini M.L. Clinical accuracy for diagnosis of antiphospholipid syndrome in SLE: evaluation of 23 possible combinations of antiphospholipid antibody specificities. *J Thromb Haemost*, 10:2512-2518; 2012.

11. 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*, 101:1827-1832; 2003.
12. Forastiero R, Martinuzzo M, Pombo G, Puente D, Rossi A, Celebrin L et al. A prospective study of antibodies to beta2-glycoprotein I and prothrombin, and risk of thrombosis. *J Thromb Haemost*, 3:1231-1238; 2005.
13. Pengo V, Ruffatti A, Legnani C, Gresele P, Barcellona D, Erba N et al. Clinical course of high-risk patients diagnosed with antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost*. 8:237-242; 2010.
14. Sciascia S, Sanna G, Murru V, Roccatello D, Khamashta M. A, Bertolaccini M.L. GAPSS: the global anti-phospholipid syndrome score. *Rheumatology*, 52:1397-1403; 2013.
15. Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T. Anti-beta2-glycoprotein I, antiprothrombin antibodies and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Blood*, 102:2717-2723; 2003.
16. Urbanus R.T, Siegerink B, Roest M, Rosendaal F.R, de Groot P.G, Algra A. Antiphospholipid antibodies and risk of myocardial infarction and ischaemic stroke in young women in the RATIO study: a case-control study. *Lancet Neurol*, 8:998-1005; 2009.
17. Tektonidou M.G, Laskari K, Panagiotakos D.B, Moutsopoulos H.M. Risk factor for thrombosis and primary thrombosis prevention in patients with systemic lupus erythematosus with or without antiphospholipid antibodies. *Arthritis Rheum*, 61:29-36; 2009.
18. Pengo V, Ruffatti A, Legnani C, Testa S, Fierro T, Marongiu F et al. Incidence of a first thromboembolic event in asymptomatic carriers of high-risk antiphospholipid antibody profile: a multicenter prospective study. *Blood*, 118:4714-4718; 2011.
19. Giannakopoulos B, Passam F, Ioannou Y, Krilis S.A. How we diagnose the antiphospholipid syndrome. *Blood*, 113:985-994; 2009.
20. Garcia D, Akl E.A, Carr R, Kearon C. Antiphospholipid antibodies and the risk of recurrence after a first episode of venous thromboembolism: a systematic review. *Blood*, 122:817-824; 2013.
21. Emmi G, Silvestri E, Squatrito D, Ciucciarelli L, Cameli A.M, Denas G et al. An approach to differential diagnosis of antiphospholipid antibody syndrome and related conditions. *Scientific World Journal*, 2014:341342; 2014.

22. Tripodi A, de Groot P.G, Pengo V. Antiphospholipid syndrome: Laboratory detection, mechanisms of action and treatment. *Journal of Internal Medicine*, 270:110–122; 2011.
23. Tenedios F, Erkan D, Lockshin M.D. Cardiac involvement in the antiphospholipid syndrome. *Lupus*, 14:691–696, 2005.
24. Kanakis M.A, Kapsimali V, Vaiopoulos A.G, Vaiopoulos G.A, Samarkos M. The lung in the spectrum of antiphospholipid syndrome. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 31:452–457; 2013.
25. Barnini T, Silvestri E, Emmi G, D'Elis M.M, Beccastrini E, Squatrito D et al. Pulmonary fibrosis and lymphocytic alveolitis associated with triple Antiphospholipid antibody positivity: a diagnostic puzzle. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 30:806; 2012.
26. Mirrakhimov A.E, Hill N.S. Primary antiphospholipid syndrome and pulmonary hypertension. *Current Pharmaceutical Design*, 20:545–551, 2014.
27. Nayfe R, Uthman I, Aoun J, Aldin E.S, Merashli M, Khamashta M.A. Seronegative antiphospholipid syndrome. *Rheumatology*, 52:1358–1367; 2013.
28. Pengo V, Ruffatti A, Tonello M, Hoxha A, Bison E, Denas G et al. Antibodies to Domain 4/5 (Dm4/5) of β 2-Glycoprotein I (β 2-GPI) in different antiphospholipid (aPL) antibody profiles. *Thromb Res*, 136:161-163; 2015.
29. Pengo V, Ruffatti A, Tonello M, Cuffaro S, Banzato A, Bison E et al. Antiphospholipid syndrome: antibodies to Domain 1 of β 2-glycoprotein 1 correctly classify patients at risk. *J Thromb Haemost*, 13:782-787; 2015.
30. Meroni P.L, Chighizola C.B, Rovelli F, Gerosa M. Antiphospholipid syndrome in 2014: more clinical manifestation, novel pathogenic players and emerging Biomarkers. *Arthritis Res Ther*, 16:209-222; 2014.
31. Rand J.H, Wu X.X, Andree H.A, Lockwood C.J, Guller S, Scher J et al. Pregnancy loss in the antiphospholipid antibody syndrome — a possible thrombogenic mechanism. *N Engl J Med*, 337:154-160; 1997.
32. de Laat B, Wu X.X, van Lummel M, Derksen R.H, de Groot PG, Rand J.H. Correlation between antiphospholipid antibodies that recognize domain I of beta2- glycoprotein I and a reduction in the anticoagulant activity of annexin A5. *Blood*, 109:1490-1494; 2007.
33. Andreoli L, Fredi M, Nalli C, Piantoni S, Reggia R, Dall'Ara F et al. Clinical significance of IgA anti-cardiolipin and IgA anti-beta2 glycoprotein I antibodies. *Curr Rheumatol Rep*, 15:343; 2013.

34. Khamashta M, Taraborelli M, Sciascia S, Tincani.
Best Practise & Research Clin Rheumatol, 30:133-148; 2016.
35. Meroni P.L, Borghi M.O, Raschi E, Tedesco F. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. *Nat Rev Rheumatol*, 7:330-339; 2011.
36. Shoenfeld Y, Blank M, Cervera R, Font J, Raschi E, Meroni P.L.
Infectious origin of the antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis*, 65:2-6; 2006.
37. Agostinis C, Biffi S, Garrovo C, Durigutto P, Lorenzon A, Bek A et al.
In vivo distribution of β 2 glycoprotein I under various pathophysiologic conditions. *Blood*, 118:4231-4238; 2011.
38. Delgado Alves J, Ames P.R, Donohue S, Stanyer L, Nourooz-Zadeh J, Ravirajan C et al. Antibodies to high-density lipoprotein and beta2-glycoprotein I are inversely correlated with paraoxonase activity in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum*, 46:2686-2694; 2002.
39. Charakida M, Besler C, Batuca J.R, Sangle S, Marques S, Sousa M et al.
Vascular abnormalities, paraoxonase activity, and dysfunctional HDL in primary antiphospholipid syndrome. *JAMA*, 302:1210-1217; 2009.
40. Ames P.R, Nourooz-Zadeh J, Tommasino C, Alves J, Brancaccio V, Anggard E.E.
Oxidative stress in primary antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost*, 79:447-449; 1998.
41. Kobayashi K, Kishi M, Atsumi T, Bertolaccini M.L, Makino H, Sakairi N, et al.
Circulating oxidized LDL forms complexes with beta2-glycoprotein I: implication as an atherogenic autoantigen. *J Lipid Res*, 44:716-726; 2003.
42. Giannakopoulos B, Krilis S.A. The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med*, 368:1033-1044; 2013.
43. Ioannou Y, Zhang J.Y, Qi M, Gao L, Qi J.C, Yu D.M et al. Novel assays of thrombogenic pathogenicity for the antiphospholipid syndrome based on the detection of molecular oxidative modification of the major autoantigen β 2-glycoprotein I. *Arthritis Rheum*, 63:2774-2782; 2011.
44. Ioannou Y, Zhang J.Y, Passam F.H, Rahgozar S, Qi J.C, Giannakopoulos B, et al.
Naturally occurring free thiols within β 2-glycoprotein I in vivo: nitrosylation, redox modification by endothelial cells, and regulation of oxidative stress induced cell injury. *Blood*, 116:1961-1970; 2010.
45. Basu S, Helmersson J, Jarosinska D, Sällsten G, Mazzolai B, Barregård L.
Regulatory actors of basal F(2)-isoprostane formation: population, age, gender and smoking habits in humans. *Free Radic Res*, 43:85-91; 2009.

46. Madureira P.A, Hill R, Miller V.A, Giacomantonio C, Lee P.W, Waisman D.M. Annexin A2 is a novel cellular redox regulatory protein involved in tumorigenesis. *Oncotarget*, 2:1075-1093; 2011.
47. Ma K, Simantov R, Zhang J.C, Silverstein R, Hajjar K.A, McCrae K.R. High affinity binding of beta 2-glycoprotein I to human endothelial cells is mediated by annexin II. *J Biol Chem*, 275:15541-15548; 2000.
48. Palmer R.M, Ferrige A.G, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327:524-526; 1987.
49. Radomski M.W, Palmer R.M, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet*, 2:1057-1058; 1987.
50. Beckman J.S, Beckman T.W, Chen J, Marshall P.A, Freeman B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87:1620-1624; 1990.
51. Ames P.R, Batuca J.R, Ciampa A, Iannaccone L, Delgado Alves J. Clinical relevance of nitric oxide metabolites and nitrative stress in thrombotic primary antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol*, 37:2523-2530; 2010.
52. Erkan D, Yazici Y, Peterson M.G, Sammaritano L, Lockshin M.D et al. A cross-sectional study of clinical thrombotic risk factors and preventive treatments in antiphospholipid syndrome. *Rheumatology*, 41:924-929; 2002.
53. Esdaile J.M, Abrahamowicz M, Grodzicky T, Li Y, Panaritis C, du Berger R et al. Traditional Framingham risk factors fail to fully account for accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 44:2331-2337; 2001.
54. Kaiser R, Cleveland C.M, Criswell L.A. Risk and protective factors for thrombosis in systemic lupus erythematosus: results from a large, multi-ethnic cohort. *Ann Rheum Dis*, 68: 238-241; 2009.
55. Cervera R, Bucciarelli S, Plasín M.A, Gómez-Puerta J.A, Plaza J, Pons-Estel G et al. Catastrophic antiphospholipid syndrome (CAPS): descriptive analysis of a series of 280 patients from the “CAPS Registry.” *J Autoimmun*, 32:240-245; 2009.
56. Merrill J.T, Asherson R.A. Catastrophic antiphospholipid syndrome. *Nature Clinical Practice Rheumatology*, 2:81–89; 2006.
57. Andreoli L, Tincani A. Beyond the “syndrome”: antiphospholipid antibodies as risk factors. *Arthritis Rheum*, 64:342-345; 2012.

58. Sciascia S, Cuadraro M.J, Sanna G, Murru V, Roccatello D, Khamashta M.A et al. Thrombotic risk assessment in systemic lupus erythematosus: validation of the global antiphospholipid syndrome score in a prospective cohort. *Arthritis Care Res Hob*, 66:1915-1920; 2014.
59. Sciascia S, Sanna G, Murru V, Roccatello D, Khamashta M.A, Bertolaccini M.L. The global anti-phospholipid syndrome score in primary APS. *Rheumatology*, 54:134-138; 2015.
60. Zuily S, de Laat B, Mohamed S, Kelchtermans H, Shums Z, Albesa R et al. Validity of the global anti-phospholipid syndrome score to predict thrombosis: a prospective multicentre cohort study. *Rheumatology*, 54:2071-2075; 2015.
61. Pericleous C, Giles I, Rahman A. Are endothelial microparticles potential markers of vascular dysfunction in the antiphospholipid syndrome? *Lupus*, 18: 671–675; 2009.
62. Morel O, Toti F, Hugel B, Bakouboula B, Camoin-Jau L, Dignat-George F et al. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26:2594-2604; 2006.
63. Distler J.H.W, Pisetsky D.S, Huber L.C, Kalden J.R, Gay S, Distler O. Microparticles as regulators of inflammation: novel players of cellular crosstalk in the rheumatic diseases. *Arthritis Rheum*, 52:3337-3348; 2005.
64. Ardoin S.P, Shanahan J.C, Pisetsky D.S. The role of microparticles in inflammation and thrombosis. *Scand J Immunol*, 66:159-165; 2007.
65. Enjeti A.K, Lincz L.F, Seldon M. Detection and measurement of microparticles: an evolving research tool for vascular biology. *Semin Thromb Hemost*, 33:771-779; 2007.
66. Leroyer A.S, Tedgui A, Boulanger C.M. Role of microparticles in atherothrombosis. *J Intern Med*, 263:528-537; 2008.
67. Mezentsev A, Merks R.M, O’Riordan E, Chen J, Mendelev N, Goligorsky M.S et al. Endothelial microparticles affect angiogenesis in vitro: role of oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289:1106-1114; 2005.
68. Preston R.A, Jy W, Jimenez J.J, Mauro L.M, Horstman L.L, Valle M, et al. Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles. *Hypertension*, 41:211-217; 2003.
69. Koga H, Sugiyama S, Kugiyama K, Watanabe K, Fukushima H, Tanaka T et al. Elevated levels of VE-cadherin –positive endothelial microparticles in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*, 45:1622-1630; 2005.

70. Bernal-Mizrachi L, Jy W, Jimenez J.J, Pastor J, Mauro L.M, Horstman L.L et al. High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. *Am Heart J*, 145:962-970; 2003.
71. Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg P.G, Freyssinet J.M et al. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation*, 101:841-843; 2000.
72. Jy W, Minagar A, Jimenez J.J, Sheremata W.A, Mauro L.M, Horstman L.L et al. Endothelial microparticles (EMP) bind and activate monocytes: elevated EMP-monocyte conjugates in multiple sclerosis. *Front Biosci*, 9:3137-3144; 2004.
73. Arteaga R.B, Chirinos J.A, Soriano A.O, Jy W, Horstman L, Jimenez J.J et al. Endothelial microparticles and platelet and leukocyte activation in patients with the metabolic syndrome. *Am J Cardiol*, 98:70-74; 2006.
74. Perez-Casal M, Downey C, Fukudome K, Marx G, Hock Toh C. Activated protein C induces the release of microparticles –associated endothelial protein C receptor. *Blood*, 105:1515-1522; 2005.
75. Steppich B, Mattisek C, Sobczyk D, Kastrati A, Schömig A, Ott I. Tissue factor pathway inhibitor on circulating microparticles in acute myocardial infarction. *Thromb Haemost*, 93:35-39; 2005.
76. Combes V, Simon A.C, Grau G.E, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F et al. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest*, 104:93–102; 1999.
77. Jy W, Jimenez J.J, Mauro L.M, Horstman L.L, Cheng P, Ahn E.R et al. Endothelial microparticles induce formation of platelet aggregates via a von Willebrand factor/ristocetin dependent pathway, rendering them resistant to dissociation. *J Thromb Haemost*, 3:1301-1308; 2005.
78. Amabile N, Guerin AP, Leroyer A, Mallat Z, Nguyen C, Boddaert J et al. Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction on patients with end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol*, 16:3381-3388; 2005.
79. Albanese J, Meterissian S, Kontogianna M, Dubreuil C, Hand A, Sorba S et al. Biologically active Fas antigen and its cognate ligand are expressed on plasma membrane-derived extracellular vesicles. *Blood*, 91:3862-3874; 1998.
80. Dignat-George F, Camoin-Jau L, Sabatier F, Arnoux D, Anfosso F, Bardin N et al. Endothelial microparticles: a potential contribution to the thrombotic complications of the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost*, 91:667-673; 2004.

81. Jy W, Tiede M, Bidot C.J, Horstman L.L, Jimenez J.J, Chirinos J et al.
Platelet activation rather than endothelial injury identifies risk of thrombosis in subjects positive for anti-phospholipid antibodies. *Thromb Res*, 121:319-325; 2007.
82. Breen K.A, Sanchez K, Kirkman N, Seed P.T, Parmar K, Moore G.W et al.
Endothelial and platelet microparticles in patients with antiphospholipid antibodies. *Thromb Res*, 135:368–374; 2015.
83. Simak J, Gelderman M.P. Cell membrane microparticles in blood and blood products: potentially pathogenic agents and diagnostic markers. *Transfus Med Rev*, 20:1–26; 2006.
84. Ayers L, Kohler M, Harrison P, Sargent I, Dragovic R, Schaap M et al.
Measurement of circulating cell-derived microparticles by flow cytometry: sources of variability within the assay. *Thromb Res*, 127:370–377; 2011.
85. Van der Vlist E.J, Nolte-'t Hoen E.N, Stoorvogel W, Arkesteijn G.J, Wauben M.H. Fluorescent labeling of nano-sized vesicles released by cells and subsequent quantitative and qualitative analysis by high-resolution flow cytometry. *Nat Protoc*, 7:1311–1326; 2012.
86. Lacroix R, Judicone C, Mooberry M, Boucekine M, Key N.S, Dignat-George F.
Standardization of pre-analytical variables in plasma microparticle determination: results of the international society on thrombosis and haemostasis SSC collaborative worksho. *J Thromb Haemost*, 11:1190–1193; 2013.
87. Robert S, Lacroix R, Poncelet P, Harhoury K, Bouriche T, Judicone C et al.
High-sensitivity flow cytometry provides access to standardized measurement of small-size microparticles—brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32:1054–1058; 2012.
88. Parish C. R. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol Cell Biol*, 77:449–508; 1999.
89. Grisendi G, Finetti E, Manganaro D, Cordova N, Montagnani G, Spano C et al.
Detection of microparticles from human red blood cells by multiparametric flow cytometry. *Blood Transfus*, 23:1–7, 2014.
90. Julich H, Willms A, Lukacs-Kornek V, Kornek M. Extracellular vesicle profiling and their use as potential disease specific biomarker. *Front Immunol*, 5:413-418; 2014.
91. Chironi G, Simon A, Hugel B, Del Pino M, Gariepy J, Freyssinet J.M et al.
Circulating leukocyte-derived microparticles predict subclinical atherosclerosis burden in asymptomatic subject. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26:2775–2780; 2006.

92. Montoro-Garcia S, Shantsila E, Orenes-Piñero E, Lozano M.L, Lip G.Y. An innovative flow cytometric approach for small-size platelet microparticles: influence of calcium. *Thromb Haemost*, 108:373–383; 2012.
93. Connor D.E, Exner T, Ma D.D, Joseph J.E. The majority of circulating platelet derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib. *Thromb Haemost*,103:1044–1052; 2010.
94. Tissot J.D, Rubin O, Canellini G. Analysis and clinical relevance of microparticles from red blood cells. *Curr Opin Hematol*, 17:571–577; 2010.
95. Nagahama M, Nomura S, Kanazawa S, Ozaki Y, Kagawa H, Fukuhara S. Significance of anti-oxidized LDL antibody and monocyte-derived microparticles in antiphospholipid antibody syndrome. *Autoimmunity*, 36:125–131; 2003.
96. Chaturvedi S, Cockrell E, Espinola R, Hsi L, Fulton S, Khan M et al. Circulating microparticles in patients with antiphospholipid antibodies: characterization and associations. *Thromb Res*, 135:102–108; 2015.