

## LAVORO ORIGINALE

# Sottopopolazioni di anticorpi anti- $\beta_2$ glicoproteina I con diverso potenziale patogenetico: fine specificità nei confronti dei domini della $\beta_2$ glicoproteina I\*

## *Subpopulations of anti- $\beta_2$ glycoprotein I antibodies with different pathogenic potential: fine specificity against the domains of $\beta_2$ glycoprotein I*

L. Andreoli<sup>1</sup>, C. Nalli<sup>1</sup>, M. Motta<sup>2</sup>, G.L. Norman<sup>3</sup>, W.L. Binder<sup>3</sup>, M. Nuzzo<sup>1</sup>, M. Frassi<sup>1</sup>,  
A. Lojacono<sup>4</sup>, T. Avcin<sup>5</sup>, P.L. Meroni<sup>6</sup>, A. Tincani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Reumatologia e Immunologia Clinica, Spedali Civili e Cattedra di Reumatologia, Università degli Studi di Brescia, Italia;

<sup>2</sup>Neonatologia e Terapia Intensiva Neonatale, Spedali Civili di Brescia, Italia;

<sup>3</sup>INOVA Diagnostics Inc., San Diego, CA, USA;

<sup>4</sup>Ostetricia e Ginecologia, Spedali Civili di Brescia, Italia;

<sup>5</sup>Allergologia, Reumatologia e Immunologia Clinica, Ospedale Pediatrico, Policlinico Universitario di Lubiana, Slovenia;

<sup>6</sup>Reumatologia, Dipartimento di Medicina Interna, Università degli Studi di Milano, Istituto Ortopedico Gaetano Pini, IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milano, Italia

### SUMMARY

**Objective:** Anti- $\beta_2$ glycoprotein I antibodies (a- $\beta_2$ GPI) are a laboratory criterion for the antiphospholipid syndrome (APS) and were demonstrated to be involved in the pathogenesis of APS. However, they can also be detected in asymptomatic subjects. It has been suggested that a- $\beta_2$ GPI against Domain1 (D1) associate with thrombosis, while those recognizing Domain4/5 (D4/5) have been identified in non-thrombotic conditions. We evaluate the specificity of a- $\beta_2$ GPI in different clinical situations.

**Methods:** We studied 39 one-year-old healthy children born to mothers with systemic autoimmune diseases (SAD) (15 (38.4%) were born to mothers who were a- $\beta_2$ GPI positive), 33 children with atopic dermatitis (AD) and 55 patients with APS (50 adults and 5 paediatrics). All subjects were IgG a- $\beta_2$ GPI positive. IgG a- $\beta_2$ GPI were performed by home-made ELISA, while IgG a- $\beta_2$ GPI D1 and D4/5 were tested on research ELISAs containing recombinant  $\beta_2$ GPI domains antigens.

**Results:** One-year-old children and AD children displayed preferential reactivity for D4/5; patients with APS recognized preferentially D1. We also found a good correlation between a- $\beta_2$ GPI and D4/5 in one-year-old ( $r=0.853$ ) and AD children ( $r=0.879$ ) and between a- $\beta_2$ GPI and D1 in the APS group ( $r=0.575$ ). No thrombotic events were recorded in both groups of children.

**Conclusions:** A- $\beta_2$ GPI found in non-thrombotic conditions (healthy children born to mothers with SAD and AD children) mostly recognize D4/5, in contrast to the prevalent specificity for D1 in the APS group. The different specificity could at least partially explain the "innocent" profile of a- $\beta_2$ GPI in children.

Reumatismo, 2010; 62(3):189-194

\*Lavoro premiato al XLVI Congresso SIR, Rimini 2009.

### INTRODUZIONE

La sindrome da anticorpi antifosfolipidi (APS) è una malattia sistemica autoimmune caratterizzata clinicamente da eventi trombotici arteriosi e/o venosi e/o da perdite fetali ricorrenti, in associazione alla presenza di autoanticorpi specifici per complessi fosfolipide-proteina, o per singole proteine leganti i fosfolipidi, in generale definiti anticorpi antifosfolipidi (aPL) (1). La diagnosi di APS

Indirizzo per la corrispondenza:

Dott.ssa Angela Tincani

U.O. Reumatologia e Immunologia Clinica

A.O. Spedali Civili

Piazzale Spedali Civili, 1 - 25123 Brescia

E-mail: tincani@bresciareumatologia.it

deve necessariamente comprendere due approcci complementari e indispensabili: uno clinico e uno di laboratorio. La  $\beta_2$ GPI è l'antigene verso cui sono maggiormente rivolti gli autoanticorpi dimostrabili nella APS; anticorpi anti- $\beta_2$ GPI sono stati dimostrati essere direttamente coinvolti nella patogenesi della APS (2).

È possibile tuttavia riscontrare anticorpi anti- $\beta_2$ GPI in soggetti asintomatici, affetti o meno da concomitanti malattie autoimmuni sistemiche; sono stati pure descritti in bambini in età prescolare, verosimilmente in risposta a fatti infettivi, vaccinazioni o all'esposizione alla  $\beta_2$ GPI con gli alimenti (3). È importante notare come questi bambini non risultino affetti né da trombosi né da alcuna malattia autoimmune sistemica.

Il riscontro di anti- $\beta_2$ GPI in condizioni cliniche non correlate alla APS potrebbe dunque suggerire un loro profilo "innocente" dal punto di vista patogenetico. In effetti, studi recenti si sono focalizzati sullo studio di sottopopolazioni di anti- $\beta_2$ GPI cui possibilmente corrisponde una diversa patogenicità.

La  $\beta_2$ GPI è una proteina ubiquitaria, composta da una singola catena proteica costituita da cinque sequenze ripetute (i "domini"). Il Dominio 5 contiene aminoacidi carichi positivamente che consentono il legame con i fosfolipidi di membrana carichi negativamente; all'altro estremo, il Dominio 1 è quello più esposto verso l'ambiente circostante e quindi in grado di interagire con altre proteine e/o anticorpi.

In particolare, gli anticorpi diretti verso il Dominio 1 della  $\beta_2$ GPI sembrano essere maggiormente associati a patologia trombotica e, quindi, specifici per APS (4); dall'altro lato, anticorpi che riconoscono invece il Dominio 4/5 sono stati descritti in bimbi con dermatite atopica (DA) (5), soggetti affetti da patologia cardiovascolare non trombotica (6) e soggetti con lebbra (7).

Con queste premesse, il presente studio si propone di studiare la fine specificità di anticorpi anti- $\beta_2$ GPI riscontrati in bambini sani ad un anno di età, nati da mamme con malattie autoimmuni sistemiche, utilizzando come confronto bambini con DA e pazienti affetti da APS.

## PAZIENTI

Il presente studio ha analizzato un totale di 127 soggetti, il cui criterio comune di inclusione era la positività per le IgG anti- $\beta_2$ GPI, misurate attraverso metodica immunoenzimatica in fase solida ELISA

utilizzata routinariamente presso il nostro Laboratorio. Sono stati inclusi nello studio tre gruppi:

- Gruppo A: 39 bambini sani a un anno di età, con valori di IgG anti- $\beta_2$ GPI positivi (v.n. >0.130 O.D.), figli di madri seguite presso l'Unità di Reumatologia e Immunologia Clinica degli "Spedali Civili" di Brescia perché affette da malattie autoimmuni (6 APS primaria, 8 connettivite indifferenziate, 11 lupus eritematoso sistemico, 6 sindrome di Sjögren primaria, 1 artrite reumatoide e 7 con alterazioni sierologiche).

Le pazienti gravide vengono seguite da un team multispecialistico formato da reumatologi, ginecologi e neonatologi.

Previo consenso informato sottoposto ai genitori, i bambini vengono prelevati alla nascita per la ricerca di autoanticorpi, con lo scopo di valutare il passaggio transplacentare degli anticorpi materni. Vengono poi prelevati a un anno di vita per controllare la clearance di questi stessi anticorpi. Quindici madri (38%) mostravano IgG anti- $\beta_2$ GPI prima e durante la gravidanza; i loro figli, ad un anno di età, non mostravano differenze significative di titolo anticorpale rispetto ai bambini nati da madri negative per IgG anti- $\beta_2$ GPI.

- Gruppo B: 33 bambini con DA seguiti presso l'Ospedale Pediatrico Universitario di Lubiana, Slovenia (età media 2 anni, range 1-4).

- Gruppo C: 50 adulti e 5 bambini con APS, rispondenti ai criteri classificativi proposti nell'"XI International Congress Of Antiphospholipid Antibodies" tenutosi a Sydney, nel Novembre 2004 (8). Si trattava di forme primarie di APS (PAPS), eccetto in 5 soggetti adulti con concomitante Lupus Eritematoso Sistemico. I soggetti adulti erano affetti nel 37% dei casi da patologia trombotica, nel 41% da patologia ostetrica e nel 22% da entrambe. Nei gruppi A e B non è stato riscontrato nessun evento trombotico.

Lo studio è stato approvato dal comitato etico locale.

## METODI

Gli anticorpi anti- $\beta_2$ GPI vengono evidenziati con metodica ELISA routinariamente utilizzata nel nostro laboratorio (9); sono considerati come positivi i valori superiori a 0.130 O.D. per IgG (corrispondente al 99° percentile su una popolazione di 100 donatori sani). I valori compresi tra il cut-off e 0.500 O.D. sono stati considerati come bassi positivi, quelli tra 0.500 e 1.000 O.D. come positivi

**Tabella I** - Pattern di positività per anti-D1 e anti-D4/5 nei diversi gruppi di soggetti.

	D1+ D4/5- n (%)	D1- D4/5+ n (%)	D1+ D4/5+ n (%)	D1- D4/5- n (%)
A) Bambini 1 anno (n=39)	2 (5%)	14 (35%)	2 (5%)	21 (55%)
B) Bambini dermatite atopica (n=33)	7 (21,2%)	9 (27,3%)	2 (6%)	15 (45,5%)
C) APS (n=55)	36 (65%)	5 (9%)	3 (5%)	6 (21%)

a medio titolo, e quelli maggiori di 1.000 O.D. come positivi ad alto titolo.

La fine specificità di questi anticorpi è stata indagata utilizzando un kit ELISA sperimentale prodotto dalla ditta INOVA Diagnostics. Sono state analizzate due diverse parti della  $\beta_2$ GPI: il Dominio 1 (D1) e il Dominio 4/5 (D4/5). Antigeni ricombinanti equivalenti al D1 e al D4/5 sono stati utilizzati per copulare i pozzetti delle piastre ELISA; i pozzetti sono stati incubati prima con i sieri dei soggetti in esame diluiti (1:100), poi con coniugato anti-IgG e infine è stata utilizzata la tetrametilbenzidina cromogeno e la soluzione di stop, utilizzando i reagenti presenti nel kit e seguendo le istruzioni fornite. I controlli (positivo alto, medio e basso) erano forniti nel kit per le IgG anti-D1, mentre come controllo per le IgG D4/5 è stato utilizzato il siero di un paziente fortemente positivo per le IgG anti-D4/5 diluito rispettivamente 1:50, 1:100 e 1:200. I risultati sono stati espressi in unità di densità ottica (O.D.).

Sono stati anche testati 100 sieri di soggetti sani (68 maschi, 32 femmine, età media 38 anni, range 18-64) per il calcolo del cut-off relativo a ciascun dominio. I risultati del cut-off al 95° percentile sono risultati essere 0.235 OD per le IgG anti-D1 e 0.405 OD per le IgG anti-D4/5.

## ANALISI STATISTICA

Le caratteristiche sierologiche di ciascun gruppo di soggetti sono state descritte tramite mediana, 10° e 90° percentile.

I titoli anticorpali di IgG anti- $\beta_2$ GPI totali, anti-D1 e anti-D4/5 sono stati confrontati tra i diversi gruppi di soggetti e all'interno di ciascun singolo gruppo utilizzando il test non parametrico di Mann-Whitney. È stata considerata significativa una  $p < 0.05$ .

I valori delle IgG anti- $\beta_2$ GPI totali sono stati confrontati con quelli per le IgG anti-D1 e anti-D4/5 utilizzando la Regressione Lineare. Il grado di correlazione ( $r$ ) è stato considerato come moderato tra 0.500 e 0.700, e come buono per valori superiori a 0.700.

## RISULTATI

Applicando i valori di cut-off calcolati su 100 soggetti sani, è stata valutata la prevalenza di soggetti positivi in ciascun gruppo (Tab. I). Nel gruppo C la maggior parte dei soggetti (71%) risultava positiva per anti-D1, mentre nei gruppi A e B la maggioranza dei casi (50%) era negativa per entrambi i domini; gli anticorpi anti-D4/5 erano comunque più rappresentati rispetto agli anti-D1.

Inoltre, solo 3 pazienti adulti con APS sono risultati positivi per gli anti-D4/5 e nessuno di essi aveva in anamnesi eventi trombotici ma erano tutte donne con esperienze di perdite fetali.

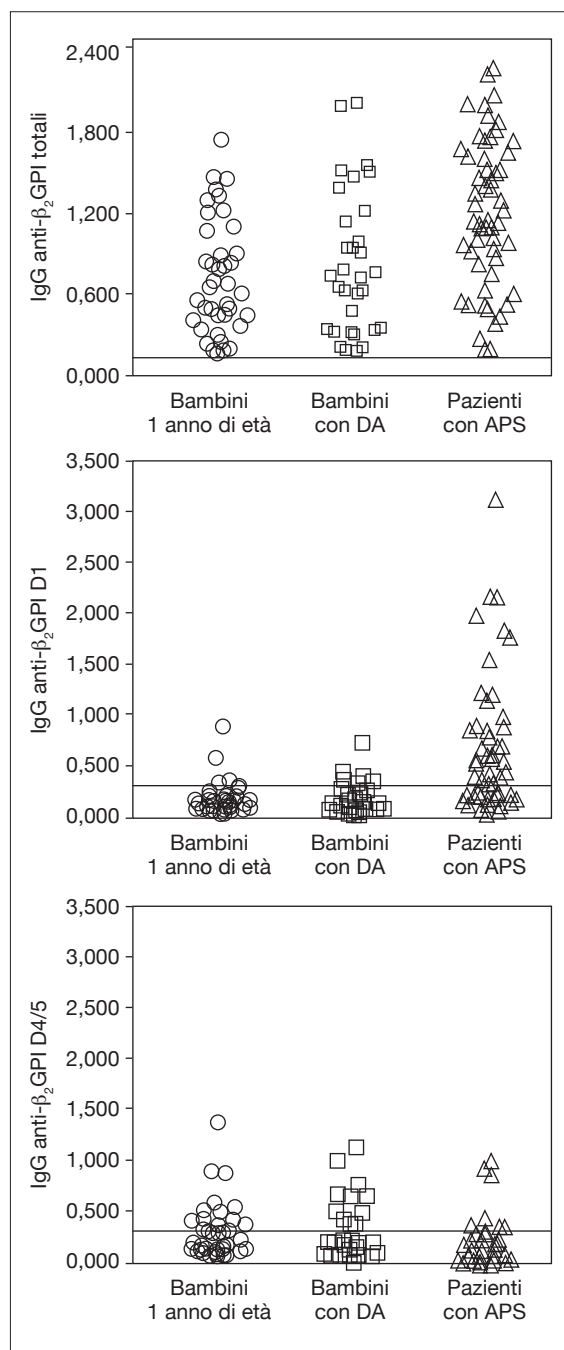
Le IgG anti- $\beta_2$ GPI mostravano una distribuzione simile nei 3 gruppi, con un range di variabilità tra il basso e l'alto positivo (Fig. 1A). Utilizzando il test per i domini, è stata evidenziata una differenza significativa tra i titoli di anti-D1 e anti-D4/5 in ciascun gruppo. Gli anti-D4/5 erano più elevati nei gruppi A e B, mentre gli anti-D1 erano prevalenti nel gruppo C (Fig. 1B, 1C; Tab. II).

In considerazione del fatto che la specificità prevalente nel gruppo C risultava essere per D1, mentre nei gruppi A e B era rivolta verso il D4/5, è stata ricercata una correlazione tra i rispettivi anticorpi e gli anti- $\beta_2$ GPI totali. Nel gruppo C la correlazione con anti-D1 è risultata lieve-moderata ( $r=0,575$ ), mentre nei gruppi A e B la correlazione con anti-D4/5 è risultata molto buona ( $r=0,853$ ;  $r=0,879$ ).

## DISCUSSIONE

L'interpretazione di un risultato positivo per aPL sta acquisendo criticità sempre maggiore nella gestione dei pazienti, in particolare in quelli affetti da malattie autoimmuni sistemiche. In effetti, mentre se un paziente ha una positività anticorpale associata alla clinica della sindrome (abortività e/o trombosi) il comportamento del medico è codificato, molto resta da decidere quando la positività degli aPL è rilevata in soggetti senza chiari segni di patologia.

In questo senso, il riscontro di anticorpi anti- $\beta_2$ GPI



in bambini sani (3) o in bambini con patologie non correlate alla sindrome, come ad esempio la DA (5), ha focalizzato l'attenzione sull'ipotesi della presenza di anticorpi "innocenti". A ulteriore supporto di questa ipotesi è stato osservato che bambini a un anno di età nati da madre con malattie autoimmuni sistemiche avevano anticorpi anti- $\beta_2$ GPI indipendentemente dal fatto la madre fosse portatrice e altresì dal fatto che fossero negativi per tali anticorpi alla nascita (10).

Partendo da queste osservazioni, abbiamo analizzato le specificità degli anticorpi anti- $\beta_2$ GPI riscontrati in bambini sani o con malattia non correlata alla APS e, parallelamente, abbiamo analizzato una casistica di pazienti con APS, sia adulti che in età pediatrica. I bambini ad un anno, completamente sani, ma positivi alla metodica routinaria per gli anticorpi anti- $\beta_2$ GPI, monitorati dallo specialista pediatra in quanto figli di mamme con malattia autoimmune, non avevano giustificazioni teoriche per la positività anticorpale riscontrata. Infatti, l'eventuale presenza di anticorpi materni è irrilevante a 12 mesi di vita, visto che il bambino inizia a produrli di proprio intorno al secondo mese (11); inoltre il 62% madri non aveva mai avuto anticorpi antifosfolipidi e, in particolare, erano state trovate negative per anti- $\beta_2$ GPI nel 3° trimestre di gravidanza.

Come suggerito dalla letteratura che riporta come differenti sottopopolazioni di anti- $\beta_2$ GPI possano essere associate sia ad APS, sia a condizioni non trombotiche o non autoimmuni, abbiamo utilizzato kit ELISA sperimentali per indagare anticorpi specifici verso il D1 e verso il D4/5, al fine di identificare la fine specificità degli anti- $\beta_2$ GPI. Nel gruppo A la prevalenza delle IgG anti-D4/5 è del 35%, simile a quella osservata nel gruppo B

**Figura 1** - Distribuzione degli anti- $\beta_2$ GPI IgG totali (pannello A), anti-D1 IgG (pannello B) e anti-D4/5 IgG (pannello C) nei 3 gruppi di pazienti. I valori sono espressi in unità di densità ottica (O.D.). La linea continua si riferisce al cut-off calcolato su 100 soggetti sani.

**Tabella II** - Distribuzione dei valori di anticorpi nei 3 gruppi di pazienti. Test di Mann-Whitney per confrontare i titoli del Dominio 1 e del Dominio 4/5 nei seguenti gruppi di soggetti: #  $p < 0,0001$ ; ^  $p = 0,03$ ; \*  $p < 0,0001$ .

	Anti- $\beta_2$ GPI IgG totali			Anti-D1 IgG			Anti-D4/5 IgG		
	MEDIANA	10°	90°	MEDIANA	10°	90°	MEDIANA	10°	90°
A) Bambini 1 anno (n=39)	0,655	0,226	1,347	0,142#	0,067	0,306	0,272#	0,127	0,585
B) Bambini dermatite atopica (n=33)	0,726	0,205	1,519	0,141^	0,064	0,368	0,233^	0,099	0,694
C) APS (n=55)	1,256	0,484	1,913	0,536*	0,160	1,928	0,150*	0,040	0,440

(27,3%). La prevalenza degli anti-D1 è maggiore nel gruppo B (21,2%) rispetto al gruppo A (5%), ma questa eterogeneità può essere spiegata dalla presenza dell'aumentata e intensa risposta immunitaria osservata nei bambini con DA. In ogni caso, in entrambi i gruppi di bambini sono stati riscontrati titoli di anti-D4/5 significativamente superiori rispetto a quelli di anti-D1. Anche il fatto che vi sia un'ottima correlazione tra i titoli di anti- $\beta_2$ GPI totale e gli anti-D4/5 suggerisce che la quasi totalità della popolazione autoanticorpale sia composta da anticorpi anti-D4/5. Tale correlazione spiega inoltre la bassa prevalenza di positività per anti-D4/5 nei gruppi di bambini: bassi titoli di anti- $\beta_2$ GPI totale non sono riusciti a superare la soglia del cut-off calcolato per anti-D4/5. A proposito del cut-off, infatti, è importante sottolineare che è stato ottenuto su una popolazione di adulti sani e, per questo motivo, potrebbe non essere il cut-off ideale per testare delle popolazioni pediatriche.

Passando al gruppo dei pazienti con APS classica, cioè con precedenti anamnestici di trombosi e/o aborti, i nostri dati sono sostanzialmente in accordo con quelli della letteratura (12). Abbiamo infatti riscontrato una prevalenza di anticorpi anti-D1 in circa i 2/3 della casistica. La positività isolata per anticorpi anti-D4/5 è invece molto rara (meno del 5%): abbiamo identificato tre pazienti, tutte con storia ostetrica e con negatività per lupus anticoagulante e anti-cardiolipina. È però interessante notare come il 20% della nostra casistica di APS non riconosca né il D1 né il D4/5. Questo è facilmente spiegabile con l'ipotesi che, nell'ambito dell'eterogeneità della popolazione autoanticorpale, vi

siano anticorpi che riconoscono porzioni diverse da D1 e D4/5, come del resto già descritto in altri lavori (13, 14).

Il presente studio ha mostrato come nelle APS la specificità prevalente degli anti- $\beta_2$ GPI sia rivolta verso il D1, mentre in condizioni cliniche non autoimmuni, quali i bambini sani o affetti da DA, sia il D4/5 ad essere il bersaglio prevalente degli anti- $\beta_2$ GPI. Non è possibile definire in maniera assoluta gli anticorpi anti-D4/5 come "innocenti", in quanto alcuni pazienti con APS, seppur rari, ne sono portatori. È ipotizzabile, infatti, che anche gli anti-D4/5, se opportunamente "attivati" da un secondo stimolo (15), possano generare gli stessi effetti che vengono osservati in presenza di anti-D1, osservazione che risulta più frequente per il semplice fatto che la specificità per D1 sembra essere la più diffusa nella APS.

In conclusione, potrebbe essere utile ampliare lo studio degli anticorpi anti-Dominio nelle malattie autoimmuni sistemiche diverse dall'APS, al fine di verificare se l'assenza delle manifestazioni cliniche dell'APS si possa associare con un particolare assetto di anticorpi diretti verso Domini della  $\beta_2$ GPI, nello specifico con l'assenza di anticorpi diretti verso il D1.

#### *Ringraziamenti*

*Vogliamo ringraziare tutti i genitori che hanno permesso ai loro figli di partecipare allo studio; un ringraziamento particolare al Dr. Filippo Sarra (IL, Milano, Italia) per essersi occupato puntualmente della consegna dei kit sperimentali anti-D1 e anti-D4/5.*

#### **RIASSUNTO**

Anticorpi diretti verso diverse porzioni della  $\beta_2$ GPI sembrano possedere diverso potenziale patogenetico: quelli verso il Dominio I sembrano associarsi a patologia trombotica, quelli verso il Dominio 4/5 a situazioni non trombotiche. Abbiamo arruolato soggetti positivi per IgG anti- $\beta_2$ GPI: 39 bambini sani ad un anno nati da mamme con malattie autoimmuni sistemiche; 33 bambini con dermatite atopica; 55 pazienti con sindrome da antifosfolipidi. I sieri sono stati studiati per anticorpi IgG anti-Dominio mediante kit ELISA sperimentali. Nelle APS la specificità prevalente è risultata verso D1, mentre nei bambini verso D4/5. Questa diversa specificità potrebbe rendere conto del profilo "innocente" degli anti- $\beta_2$ GPI nei bambini.

**Parole chiave** - Anticorpi anti- $\beta_2$ glicoproteina I, domini della  $\beta_2$ glicoproteina I, sindrome da antifosfolipidi.  
**Key words** - Anti- $\beta_2$ glicoproteina I antibodies, domains of  $\beta_2$ glicoproteina I, antiphospholipid syndrome.

**BIBLIOGRAFIA**

1. Harris EN. Syndrome of the black swan. *Br J Rheumatol* 1987; 26: 324-6.
2. Pierangeli SS, Chen PP, Raschi E, Scurati S, Grossi C, Borghi MO, et al. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome: pathogenic mechanism. *Semin Thromb Haemost* 2008; 34: 236-50.
3. Avcin T, Ambrozic A, Kuhar M, Kveder T, Rozman B. Anticardiolipin and anti- $\beta_2$ -glycoprotein I antibodies in sera of 61 apparently healthy children at regular preventive visit. *Rheumatology* 2001; 40: 565-73.
4. De Laat B, Derksen R, Urbanus R, De Groot P. IgG antibodies that recognize epitope gly40-arg43 in domain I of  $\beta_2$ -glycoprotein I cause LAC, and their presence correlates strongly with thrombosis. *Blood* 2005; 105: 1540-5.
5. Ambrozic A, Avcin T, Ichikawa K, Kveder T, Matsuura E, Hojnik M, et al. Anti- $\beta_2$ -glycoprotein I antibodies in children with atopic dermatitis. *Intern Immunol* 2002; 14: 823-30.
6. Iverson MG, von Mühlen CA, Staub HL, Lassen AJ, Binder W, Norman GL. Patients with atherosclerotic syndrome, negative in anti-cardiolipin assays, make IgA autoantibodies that preferentially target domain 4 of  $\beta_2$ GPI. *J Autoimm* 2006; 27: 266-71.
7. Arvieux J, Renaudineau Y, Mane I, Perraut R, Krilis SA, Youinou P. Distinguishing features of anti-beta2glycoprotein I antibodies between patients with leprosy and the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2002; 87: 599-605.
8. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4: 295-306.
9. Balestrieri G, Tincani A, Spatola L, Allegri F, Prati E, Cattaneo R, et al. Anti-beta2 glycoprotein I antibodies. A marker of antiphospholipid syndrome? *Lupus* 1995; 4: 122-30.
10. Motta M, Chirico G, Biasini-Rebaioli C, Faden D, Lojaco A, Allegri F, et al. Anticardiolipin and Anti- $\beta_2$ -glycoprotein I antibodies in infants born to mothers with antiphospholipid antibody-positive autoimmune disease: a follow up study. *Am J Perinatol* 2006; 23: 247-51.
11. Cabiedes J, Trejo-Hernández J, Loredó-Abdalá A, Castilla-Serna L, López-Mendoza AT, Cordero-Espérón HA, et al. Anti-cardiolipin plus bovine, or human beta2glycoprotein I and anti-Human beta2glycoprotein I antibodies in a healthy infant population. *Arch Med Res* 2006; 33: 175-9.
12. de Laat B, Pengo V, Pabinger I, Musial J, Voskuyl AE, Bultink IEM, et al. The association between circulating antibodies against domain I of beta2glycoprotein I and thrombosis: an international multicenter study. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 1767-73.
13. Iverson GM, Victoria JE, Marquis DM. Anti- $\beta_2$ -glycoprotein I (beta2GPI) autoantibodies recognize an epitope on the first domain of beta2GPI. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 15542-6.
14. Blank M, Shoenfeld Y, Cabilly S, Heldman Y, Fridkin M, Katchalski-Katzir E. Prevention of experimental antiphospholipid syndrome and endothelial cell activation by synthetic peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 5164-8.
15. Shoenfeld Y, Meroni PL, Cervera R. Antiphospholipid syndrome dilemmas still to be solved: 2008 status. *Ann Rheum Dis* 2008; 67: 438-42.