



REVISTA BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA

www.reumatologia.com.br



Artigo original

Avaliação da agregação plaquetária em presença de anticorpos antifosfolípides: anti- β 2GPI e anticardiolipina

Harleson Lopes de Mesquita^{a,*}, Giuliano Reder de Carvalho^a, Fernando Monteiro Aarestrup^b, José Otávio do Amaral Corrêa^c, Maria Regina Andrade Azevedo^d

^aDepartamento de Análises Clínicas, Universidade de Santo Amaro, São Paulo, SP, Brasil

^bCentro em Biologia da Reprodução, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil

^cFaculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil

^dDepartamento de Análises Clínicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

INFORMAÇÕES

Histórico do artigo:

Recebido em 23 de julho de 2012

Aprovado em 14 de maio de 2013

Palavras-chave:

Síndrome antifosfolípide

Anticorpos antifosfolípidos

Agregação plaquetária

RESUMO

Introdução: A síndrome antifosfolípide (SAF) é uma condição autoimune que apresenta fenômenos trombóticos arteriais e venosos de repetição além de complicações obstétricas. Sua patogênese está associada à presença de anticorpos antifosfolípidos e/ou anti- β 2 glicoproteína I (β 2GPI) que aparentemente modificam o efeito anticoagulante da β 2GPI. A dimerização da β 2GPI induzida por anticorpos parece estar relacionada à indução da agregação plaquetária contribuindo para o estado trombofílico na SAF.

Objetivos: O presente trabalho objetiva demonstrar a influencia dos anticorpos antifosfolípidos em testes de agregação plaquetária com diferentes agonistas (ADP, colágeno e adrenalina).

Métodos: Foram analisados testes de agregação de plaquetas normais com diferentes agonistas (ADP, colágeno, adrenalina) na presença de soro contendo anticorpos antifosfolípidos em diferentes concentrações.

Resultados: As análises obtidas mostraram uma inibição significativa ($P < 0,05$) nas curvas de agregação plaquetária induzidas por ADP e adrenalina quando comparadas ao controle. O paradoxo entre o estado protrombótico e a presença de autoanticorpos que *in vitro* apresentam atividade anticoagulante foi demonstrado na literatura, dificultando o entendimento patofisiológico da síndrome antifosfolípide.

Conclusão: Os resultados obtidos demonstraram que o soro rico em anticorpos anticardiolipina e anti- β 2GPI, ambas da classe IgG, interferem em testes de curvas de agregação plaquetária.

© 2013 Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

* Autor para correspondência.

E-mail: harlefar@hotmail.com (H.L. Mesquita).

Evaluation of platelet aggregation in the presence of antiphospholipid antibodies: anti- β 2GPI and anticardiolipin

A B S T R A C T

Keywords:

Antiphospholipid syndrome
Antiphospholipid antibodies
Platelet aggregation

Introduction: The antiphospholipid syndrome (APS) is an autoimmune condition characterized by recurrent arterial and venous thrombosis, besides obstetric complications. The pathogenesis is associated with the presence of antiphospholipid and/or anti-b2-glycoprotein I (anti-b2GPI) antibodies that appear to change the anticoagulant activity of b2GPI. Antibody-induced dimerization of b2GPI seems to be related to the induction of platelet aggregation, contributing to the development of thrombosis in APS.

Objectives: The objective of the present study is to demonstrate the influence of antiphospholipid antibodies in platelet aggregation tests with different agonists (ADP, collagen, and adrenaline).

Methods: We analyzed platelet aggregation tests with different agonists (ADP, collagen, adrenalin) when normal platelets were exposed to serum with different concentrations of antiphospholipid antibodies.

Results: Results demonstrated a significant inhibition in adrenalin- and ADP-induced platelet aggregation curves ($P < 0.05$) in all antibody concentrations tested when compared to the control. The paradox between the prothrombotic state and the presence of autoantibodies that show anticoagulant activity in vitro was demonstrated in the literature, making it difficult to understand the pathophysiologic mechanism of the antiphospholipid syndrome.

Conclusion: Results showed that anticardiolipin and anti-b2GPI antibodies-rich serum, both of which belonging to the IgG class, can interfere with platelet aggregation curves.

© 2013 Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Introdução

A síndrome antifosfolípide primária (SAF) é uma condição clínica caracterizada por fenômenos trombóticos venosos e arteriais recorrentes, mortalidade fetal com abortos repetidos associados à presença de anticorpos antifosfolípidos (aFL).^{1,2}

Como testes laboratoriais para caracterização da SAF, inclui-se o ensaio imunoenzimático para anticorpos IgM e IgG anticardiolipina (aCL), anti- β 2 glicoproteína 1 e testes de coagulação para pesquisa do anticoagulante lúpico (LA). A confirmação da presença desses anticorpos após 12 semanas de sua identificação no soro do paciente permite excluir os quadros transitórios e classificar os pacientes de acordo com os critérios do XI Congresso Internacional de anticorpos antifosfolípidos de Sydney, Austrália, 2006.³⁻⁵

A β 2GPI, conhecida também como apoliproteína H, é um cofator fosfolipídico com características anticoagulantes. Apresenta papel importante na preservação da superfície do endotélio vascular, formando um complexo com os fosfolípidos e a protrombina. Tem ação inibitória na ativação do fator XII da coagulação e parece contribuir para ativação da proteína C. Na superfície das plaquetas, a β 2GPI inibe a geração de fator Xa, além de bloquear a agregação plaquetária e a conversão da protrombina em trombina.⁶

A patogênese da SAF é ainda incerta, porém acredita-se que interação dos autoanticorpos contra fosfolípidos aniônicos ou contra a β 2GPI nas plaquetas, estaria associada à liberação de constituintes trombogênicos. Os aFL ocupariam os espaços do complexo β 2GPI-protrombina, com a consequente ativação endotelial e plaquetária.⁷

Uma análise sucinta das diversas formas clínicas da SAF, dos elementos tidos como participantes do processo fisiopato-

lógico da doença como as plaquetas, trombina e β 2GPI torna-se necessária para o entendimento da fisiopatologia desta síndrome. A busca das principais razões para esse fenômeno proporcionará no futuro melhores opções terapêuticas para esses pacientes. Nesse sentido, faz-se relevante o estudo dos testes laboratoriais empregados no diagnóstico desta síndrome.

Material e métodos

Paciente portadora de SAF

Para obtenção do soro contendo aFL foi selecionada uma paciente portadora de SAF de acordo com os critérios do XI Congresso Internacional de anticorpos antifosfolípidos de Sydney, Austrália, 2006.³ O trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Santo Amaro com parecer número 069/2011 e a paciente assinou o TCLE.

A paciente, de 24 anos, residente em Volta Redonda, RJ, apresentou quadro de aborto espontâneo ocorrido em novembro de 2000 na 12ª semana de gestação, com recorrência em março de 2002 em sua segunda gestação, por volta de 18 semanas. O resultado histopatológico da segunda perda gestacional demonstrou autólise parcial de feto e placenta devido a infartos isquêmicos extensos sugestivos de trombose venosa profunda de origem materna. Logo após a segunda perda gestacional (maio de 2002), a paciente passou a apresentar hipertensão arterial e a experimentar episódios de ausências que foram relacionados à provável quadro de isquemia cerebral, levando ao clínico que a acompanhava a suspeita de distúrbios protrombóticos e circulatórios.

Os testes solicitados para triagem pelo clínico em maio de 2002 demonstraram: TTPa 28s com valores normais (VN)

25-35s e RNI 1,0; fator antinuclear (FAN) e fator reumatoide: não reagentes; VDRL positivo título 1:4; FTA – ABS IgM e IgG negativos; Coombs direto positivo; anticorpos aCL IgG 65 GPL (negativo < 10 GPL); anticorpos aCL IgM 15 MPL (VN < 10 MPL). O hemograma demonstrou leucometria global de 6.500/mm³ (VN = 4.500-11.000) com diferencial sem particularidades; série vermelha em discreta anemia com hematócrito 35% (VN = 37-47%); hemoglobina 11,8 g/dL (VN = 12-16 g/dL); hematimetria 3,5 milhões/mm³ (VN = 4-5,5 milhões/mm³) e trombocitopenia discreta com 135.000 plaquetas/mm³ (VN = 150.000-400.000 plaquetas/mm³). Os testes bioquímicos não demonstraram alterações de glicemia e em marcadores de lesão hepática (AST, ALT, bilirrubinas) e a paciente apresentou discreta alteração do clearance de creatinina no valor de 85 mL/min (VN = 97-130 mL/min).

Os anticorpos aCL se mostraram positivos em outras duas dosagens acompanhando testes de rotina da paciente em setembro de 2002 (aCL IgG 73 GPL e IgM 13,5 MPL) e em outubro de 2002 (aCL IgG 63 GPL e IgM 11,5 MPL). A persistência de positividade dos aCL em intervalos maiores que 12 semanas entre suas dosagens (maio, setembro, outubro) associados aos critérios clínicos de abortos de repetição da paciente permitiram caracterizá-la como portadora de síndrome antifosfolípide primária, segundo critérios estabelecidos em Sydney, 2006.³ Houve a instituição de terapia anticoagulante acompanhada por resultados periódicos de TAP e RNI.

Anticorpos aFL

Foram coletadas da paciente, por meio de punção venosa em tubo sem anticoagulante, uma amostra por mês de sangue total, por um período de três meses. As amostras foram centrifugadas a 3.000 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos, e o soro denominado, seguindo a ordem de obtenção como amostra 1 (A1), amostra 2 (A2) e amostra 3 (A3). Como a paciente fazia uso contínuo de anticoagulantes orais, sob supervisão do clínico responsável e com avaliação severa de possíveis riscos para a paciente, houve suspensão completa desses medicamentos nos sete dias anteriores às datas de cada coleta, no sentido de evitar interferência medicamentosa no procedimento.⁸

A pesquisa de LA realizada por meio do teste do veneno da víbora de Russell (Dade Behring®) foi negativa (teste automatizado integrado que inclui teste de triagem e confirmatório) e confirmado em teste de TTPa com ativador em sílica.⁹

A quantificação dos aFL para aCL e anti- β_2 -GPI foi realizada utilizando a técnica de imunoensaio EliA IgG/IgM (ImmunoCAP 250, Phadia, Pharmacia Diagnostics®), com sensibilidade e especificidade similar a outros métodos imunoenzimáticos como o ELISA para pesquisa de anticorpos antifosfolípidos.¹⁰ Os resultados foram relatados em unidades fosfolípídicas IgG (GPL) e unidades fosfolípídicas IgM (MPL), onde 1 unidade é igual a 1 mg/mL de IgG ou IgM (tabelas 1 e 2).

Teste de agregação plaquetária

O pool de plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido de 20 voluntários sadios com idades entre 28 e 43 anos, sem histórico de distúrbios de coagulação, com TP e TTPa normais. Após ob-

tenção do pool, o mesmo foi submetido à pesquisa de aFL (anticorpos anticardiolipina IgM e IgG e anti- β_2 -GPI IgM e IgG) pela mesma metodologia que as amostras ricas em aFL com resultados negativos (inferior a 10 MPL para aCL IgM e inferior a 10 GPL para aCL IgG). As amostras de sangue total foram coletadas em tubo contendo anticoagulante citrato de sódio na proporção 1:9 e submetidas à centrifugação de 1.000 rpm por 15 minutos. O pool de plasma obtido foi utilizado como controle para as curvas de agregação. Um plasma pobre em plaquetas (PPP) foi obtido desses pacientes para calibração do agregômetro após centrifugação a 2.500 rpm por 10 minutos. Os agonistas utilizados foram: ADP (1 mL - 1 nM), colágeno (0,5 mL - 1 mg/mL) e adrenalina (0,5 mL - 1 mg/mL) (Chrono-par®, Chrono-log Corporation, USA) e os testes de agregação plaquetária realizados em agregômetro Chrono-log modelo 530 (Biomédica S/C Ltda).

As amostras de soro contendo anticorpos aFL, A1, A2 e A3 foram adicionadas ao PRP com volume final de 500 mL (tabela 3) e submetidas a agregação. O número de plaquetas nas amostras foi verificado e padronizado em 300.000 plaquetas/mm³ em todas as amostras, número adequado para testes de agregação no equipamento utilizado.¹¹ A análise dos resultados foi realizada utilizando o teste estatístico de Mann-Whitney adotando como índice de significância $P < 0,05$.

Tabela 1 – Resultados de anticorpos aFL das amostras A1, A2 e A3

	ACL, anticorpos IgM	ACL, anticorpos IgG
A1	12,3 MPL	71,1 GPL
A2	10,5 MPL	71,9 GPL
A3	10,8 MPL	72,4 GPL
Valores de referência ^a	IgM: Negativo → Inferior a 10 MPL Indeterminado → 10-19 MPL Moderada reatividade → 20-80 MPL Forte reatividade → Acima de 80 MPL	IgG: Negativo → Inferior a 10 GPL Indeterminado → 10-19 GPL Moderada reatividade → 20-80 GPL Forte reatividade → Acima de 80 GPL
^a Valores de referência para a metodologia EliA IgG/IgM (ImmunoCAP 250, Phadia, Pharmacia Diagnostics®).		

Tabela 2 – Resultados de anticorpos anti- β_2 GPI das amostras A1, A2 e A3

	β_2 GPI, anticorpos IgM	β_2 GPI, anticorpos IgG
A1	Menor que 5 U/mL	Maior que 100 U/mL
A2	Menor que 5 U/mL	Maior que 100 U/mL
A3	Menor que 5 U/mL	Maior que 100 U/mL
Valores de referência	IgM: Negativo → Inferior a 5 U/mL Indeterminado → 5-8 U/mL Positivo → Acima de 8 U/mL	IgG: Negativo → Inferior a 5 U/mL Indeterminado → 5-8 U/mL Positivo → Acima de 8 U/mL

Tabela 3 – Volume de adição de amostras A1, A2 e A3 em plasma rico em plaquetas para agregação plaquetária

Amostra	Volume adicionado	Volume PRP	Volume e concentração da solução agregante adicionada
A1/A2/A3	50 µL	450 µL	ADP (1 µL – 1 nM)
A1/A2/A3	100 µL	400 µL	ADP (1 µL – 1 nM)
A1/A2/A3	150 µL	350 µL	ADP (1 µL – 1 nM)
A1/A2/A3	50 µL	450 µL	Colágeno (0,5 µL – 1 mg/mL)
A1/A2/A3	100 µL	400 µL	Colágeno (0,5 µL – 1 mg/mL)
A1/A2/A3	150 µL	350 µL	Colágeno (0,5 µL – 1 mg/mL)
A1/A2/A3	50 µL	450	Adrenalina (1 µL – 5 nM)
A1/A2/A3	100 µL	400	Adrenalina (1 µL – 5 nM)
A1/A2/A3	150 µL	350	Adrenalina (1 µL – 5 nM)

Resultados

As tabelas 4, 5 e 6 apresentam a média e o desvio padrão (M±DP) dos resultados da agregação plaquetária expressos em % após 5 minutos utilizando o pool de PRP controle e após a adição dos aFL nas diferentes concentrações A1, A2, A3.

A tabela 4 para o agregante adrenalina demonstra queda estatisticamente significativa ($P < 0,05$) nos valores de agregação plaquetária em presença soro rico em anti- β_2 GP1 IgG e aCL IgG.

Em relação ao agonista ADP demonstrado na tabela 5 houve também inibição estatisticamente significativa nas duas maiores concentrações de anti- β_2 GP1 IgG e aCL IgG ($P < 0,05$).

Tabela 4 – Média do % agregação A1, A2, A3 após 5 minutos de agregação com adrenalina

Controle	50 µL	100 µL	150 µL
A1 = 70%	A1 = 59%	A1 = 56%	A1 = 53%
A2 = 70%	A2 = 61%	A2 = 60%	A2 = 57%
A3 = 70%	A3 = 56%	A3 = 52%	A3 = 50%
Média = 70%	Média = 59%	Média = 56%	Média = 53%
	P = 0,016	P = 0,026	P = 0,014

Houve inibição significativa no teste Mann-Whitney com $P < 0,05$ para amostras A1, A2 e A3 para o agonista adrenalina.

Tabela 5 – Média do % agregação A1, A2, A3 após 5 minutos de agregação com ADP

Controle	50 µL	100 µL	150 µL
A1 = 74%	A1 = 74%	A1 = 59%	A1 = 58%
A2 = 74%	A2 = 58%	A2 = 63%	A2 = 56%
A3 = 74%	A3 = 58%	A3 = 58%	A3 = 51%
Média = 74%	Média = 63%	Média = 60%	Média = 55%
	P = 0,184	P = 0,012	P = 0,012

Houve inibição significativa no teste Mann-Whitney com $P < 0,05$ para amostras A1, A2 e A3 para o agonista ADP nos volumes de 100 µL e 150 µL.

Para o agonista colágeno, cujos valores estão demonstrados na tabela 6, não houve influência estatisticamente significativa de anti- β_2 GP1 IgG e aCL IgG ($P > 0,05$).

Discussão

A SAF tem como característica a associação de diversos aspectos clínicos, incluindo eventos trombóticos de origem arterial ou venosa e morbidade na gravidez (perda fetal recorrente, pré-eclâmpsia, eclâmpsia e abortos espontâneos) associada à presença de aFL.¹²

O termo SAF parece incorreto devido à descoberta de que algumas classes de aFL não são direcionados contra fosfolípidos, mas contra proteínas em complexos com fosfolípidos, como β_2 GPI, protrombina e anexina V.^{5,13-15} Estudos anteriores sugerem que anticorpos anti- β_2 GPI em complexos com β_2 GPI ativam plaquetas, contribuindo potencialmente para tendência trombótica do paciente portador da SAF. Todavia, a presença de aFL não implica diretamente no desenvolvimento da SAF, podendo estar presente em até 1% da população normal e em 3% de indivíduos idosos.¹⁶⁻¹⁸

Com o objetivo de verificar se os indícios de hiperatividade plaquetária *in vivo* se reproduziriam *in vitro* foi realizada a análise das curvas de agregação plaquetária com diferentes agonistas na presença de soro humano rico em aFL de paciente portador da SAF primária diagnosticada segundo critérios do XI Congresso Internacional de anticorpos antifosfolípidos ocorrido em Sydney no ano de 2006. As amostras coletadas da paciente em diferentes intervalos apresentaram valores elevados de aCL da classe IgG, apontados pela literatura com maior relevância em relação a aCL da classe IgM em relação a fenômenos trombóticos.¹⁹ Os anticorpos anti- β_2 -GPI também apresentaram alta concentração para IgG nas três amostras coletadas (> 100 U/mL). Esses anticorpos são primordiais para os aspectos clínicos da SAF, pois, a proteína plasmática β_2 -GPI na qual se ligam apresenta grande afinidade por fosfolípidos aniônicos, servindo como cofator para o desenvolvimento da SAF.²⁰

Os resultados demonstraram para os agregantes adrenalina em todas as concentrações de anticorpo e para o ADP nas duas maiores concentrações de anticorpo uma inibição na agregação plaquetária estatisticamente significativa ($P < 0,05$). Para o agregante colágeno a inibição não foi significativa.

Esse aparente paradoxo entre aFL e inibição de agregação plaquetária também foi demonstrado em trabalho recente, onde níveis elevados de anticorpos anti- β_2 GPI reduziram significativamente a agregação de plaquetas (inibição esta, pro-

Tabela 6 – Média do % agregação A1, A2, A3 após 5 minutos de agregação com colágeno

Controle	50 µL	100 µL	150 µL
A1 = 70%	A1 = 69%	A1 = 69%	A1 = 68%
A2 = 67%	A2 = 65%	A2 = 63%	A2 = 62%
A3 = 67%	A3 = 65%	A3 = 60%	A3 = 53%
Média = 68%	Média = 66%	Média = 64%	Média = 61%
	P = 0,378	P = 0,267	P = 0,246

Não houve inibição significativa no teste Mann-Whitney com $P > 0,05$ para amostras A1, A2 e A3 para o agonista colágeno.

porcional a concentração desses anticorpos) em presença dos agregantes ADP e colágeno.²¹

A inibição da agregação após adição de soro com aCL e anticorpos anti- β_2 GPI *in vitro* sugere que outros fatores estejam implicados no fenômeno trombótico que ocorre *in vivo*. A ativação de células endoteliais, lesão vascular do endotélio mediada por oxidantes, interferência nas proteínas ligantes de fosfolípidos aniônicos responsáveis pela regulação hemostática, interação desses anticorpos com monócitos ou anticoagulantes naturais como as proteínas S e C também podem justificar os fenômenos de vaso-oclusão.²² Outra possibilidade sugerida seria que os anticorpos anti- β_2 GPI possam inibir a liberação de grânulos densos plaquetários e ainda inibir a via metabólica do ácido araquidônico.²¹

Em uma seleção de trabalhos clínicos realizados com aFL apenas AL foram relacionados de forma consistente como fator de risco para fenômenos clínicos de trombose. Entretanto, estudos com aCL e anticorpos anti- β_2 GPI foram inconclusivos e em parte controversos. Os aCL IgG e anti- β_2 GPI IgG demonstraram maior relação em processos trombóticos (aCL relacionados a situações mais específicas de derrame cerebral e lesões miocárdicas) que os respectivos da classe IgM, mas não apresentaram a relação estreita que AL tem com esses fenômenos.²³

Os dados citados anteriormente parecem importantes para a interpretação dos nossos resultados de inibição de agregação plaquetária já que a dosagem de AL da paciente portadora de SAF primária se mostrou negativa em seu soro nas amostras utilizadas para teste e esses anticorpos estão mais relacionados aos quadros clínicos de trombose.

Além disso, outros autores demonstraram em pacientes com complicações trombo-embólicas a presença de autoanticorpos que, *in vitro*, apresentaram atividade anticoagulante e provocaram alongamento em testes de coagulação.²⁰

Os resultados deste trabalho sugerem que efeito trombótico de aFL *in vivo* pode estar associado ao tipo de anticorpo presente no paciente portador de SAF e a outros fatores que não se apresentaram no teste de agregação *in vitro*. A utilização desses testes de agregação para diagnóstico podem levar a equívocos de interpretação e o não encaminhamento do paciente a pesquisa de aFL mesmo que apresentem sintomatologia compatível com SAF.

Agradecimentos

Agradecemos aos profissionais dos laboratórios de Análises Clínicas da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), do Hospital Samaritano (SP) e a Universidade de Santo Amaro (SP).

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

- Visseaux B, Masliah-Planchon J, Fischer AM, Darnige L. Antiphospholipid syndrome diagnosis: an update. *Annales de Biologie Clinique*. 2011;69(4):411-8.
- Sá EB, Passos AS, Cecconi M, Barbo MLP, Martinez JE, Novaes GS. Gangrene of the auricle as the first sign of antiphospholipid antibody syndrome. *Rev Bras Reumatol*. 2011;51(6):655-61.
- 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.
- Sangle NA, Smock KJ. Antiphospholipid antibody syndrome. *Arch Pathol Lab Med*. 2011;135(9):1092-6.
- Perches PG, Domingues DP, Gomes AL, Ribeiro AM, Pereira FMT, Rassi IE, et al. Avaliação da pesquisa de anticorpos antifosfolípidios para o diagnóstico da síndrome antifosfolípide. *Rev Bras Reumatol*. 2011;51(6):236-45.
- Ranzolin A, Lotterman A, Bohn J, Von Mühlen CA, Staub HL. Anticorpos contra beta2-glicoproteína I, autoimunidade e aterosclerose. *Rev Bras Reumatol*. 2004;44(2):139-49.
- Santos MRF, Costa CRT, Tavares RM, Souza MVM. Síndrome antifosfolípide: uma causa de neuropatia periférica? *Rev Bras Reumatol*. 2007;47(4):281-5.
- Rizzatti EG, Franco, RF. Tratamento do tromboembolismo venoso. *Medicina, Ribeirão Preto*. 2001;34:269-75.
- Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, et al. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. *J Thromb Haemost*. 2009;7:1737-40.
- Villalta D, Alessio MG, Tampoia M, Da Re A, Stella S, Da Re M, et al. Accuracy of the First Fully Automated Method for Anticardiolipin and Anti- β_2 Glycoprotein I Antibody Detection for the Diagnosis of Antiphospholipid Syndrome. *Ann NY Acad Sci*. 2009;1173:21-7.
- Cavalcante JWS, Santos PRM, Menezes MGF, Marques HO, Cavalcante LP, Pacheco WS. Influência da cafeína no comportamento da pressão arterial e da agregação plaquetária. *Arq Bras Cardiol*. 2000;75(2):97-101.
- Erkan D, Lockshin MD. Antiphospholipid syndrome. *Curr Opin Rheumatol*. 2006;18(3):242-8.
- Arnout J, Vermeylen J. Current status and implications of autoimmune antiphospholipid antibodies in relation to thrombotic disease. *J Thromb Haemost*. 2003;1:931-42.
- Nimmo MC, Carter CJ. The antiphospholipid antibody syndrome a riddle wrapped in a mystery inside an enigma. *Clinical and Applied Immunology Rev*. 2003;4(2):125-40.
- Santamaria JR, Badziak D, Barros MF, Mandelli FL, Cavalin LC, Sato MS. Síndrome antifosfolípide. *An Bras Dermatol*. 2005;3:225-39.
- Shi T, Giannakopoulos B, Yan X, Yu P, Berndt MC, Andrews RK, et al. Anti- β_2 -glycoproteína I antibodies in complex with β_2 -glycoproteína I can activate platelets in a dysregulated manner via glycoprotein Ib-IX-V. *Arthritis Rheum*. 2006;54:2558-67.
- Cabral AR, Cabiedes J, Segovia DA. Heterogeneity of antibodies to β_2 -glycoprotein 1 from patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2004;13(3):182-7.
- Cuadrado MJ, Pedrera CL. Antiphospholipid syndrome. *Clin Exp Med*. 2003;3(3):129-39.
- Levine JS, Branch DW, Rauch J. The Antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med*. 2002;346:752-63.
- Bas De Laat H, Derksen RHWM, De Groot PG. β_2 -glicoproteína I, the playmaker of the antiphospholipid syndrome. *Clinical Immunology*. 2004;112:161-8.
- Palatinus AA, Ahuja KD, Adams MJ. Effects of antiphospholipid antibodies on *in vitro* platelet aggregation. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2012;18:59-65.
- Marai I, Goddard GZ, Shoenfeld Y. The systemic nature of the antiphospholipid syndrome. *Scand J Rheumatol*. 2004;33(6):365-72.
- Galli M. Antiphospholipid syndrome: association between laboratory tests and clinical practice. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2003;33:249-55.