

Anticuerpos anti-anexina V y otros marcadores de actividad antifosfolipídica en mujeres abortadoras recurrentes con enfermedades autoinmunes

Héctor Fabián Pelusa¹, María de los Ángeles Valdés¹, Mariela Bearzotti¹, María José Svetaz¹, Stella Maris Daniele¹, Ingrid Sjöberg¹, Laura Fornasiero¹, Hebe Bottai², Adriana Almará¹, Sergio Ghersevich¹, Jorge Musuruana³, Sandra Arriaga¹

¹Área Bioquímica Clínica. ²Área Estadística y Procesamiento de Datos. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario Suipacha 531. S20002LRK. Rosario (Santa Fe). ³Servicio de Reumatología y Enfermedades Autoinmunes Sistémicas, Hospital J. B. Iturraspe. Bv. Pellegrini 3551. 3000 Santa Fe (Santa Fe).

Resumen

Los anticuerpos (Ac) antifosfolipídicos componen una familia de auto Ac involucrada en eventos trombóticos que participarían de la actividad antifosfolipídica (AAF). La probabilidad de aborto en una paciente con estos Ac es del 91%. Se ha sugerido la existencia de un nuevo cofactor: la anexina V, altamente expresada en el sincitiotrofoblasto placentario, originando Ac que podrían estar implicados en las pérdidas fetales recurrentes. Nuestro objetivo fue analizar la asociación entre los Ac anti-anexina V y otros indicadores de AAF [anticardiolipina (ACA), anti- β 2 glicoproteína 1 (a- β 2GP1) o anticoagulante lúpico (AL)] en mujeres con enfermedades autoinmunes y repetidas pérdidas fetales. Se incluyeron 25 mujeres abortadoras recurrentes con lupus eritematoso sistémico y/o síndrome antifosfolipídico (A) y un grupo control de 33 mujeres con las patologías mencionadas anteriormente, no abortadoras (NA). Se determinaron los niveles de anti-anexina V, ACA y de a- β 2GP1 por ELISA. El AL se evidenció con pruebas de screening y confirmatorias. El 96% del grupo A presentó AAF positiva y el 4% niveles elevados de Ac a-anexina V. El grupo NA mostró AAF en el 70% de los casos y niveles elevados de Ac a-anexina V en un 3%. Se puede concluir que no existe asociación entre Ac anti-anexina V y los indicadores de AAF.

Palabras clave: aborto recurrente, anti-anexina V, autoanticuerpos, síndrome antifosfolipídico, lupus eritematoso sistémico.

Summary

Anti phospholipid antibodies (Ab) comprise a family of auto Ab involved in thrombotic events that would participate in antiphospholipid activity (APA). The probability of abortion in patients carrying these Ab is of 91%. The existence of a new cofactor has been suggested: annexin V, highly expressed in the placental syncytiotrophoblast, thus originating Ab likely involved in the recurrent fetal losses. Our aim was to analyze the association between the anti-annexin V Ab and markers of APA [anticardiolipin (ACA), anti- β 2 glycoprotein 1 (a- β 2GP1) or lupus anticoagulant (LA)] in women with autoimmune diseases and recurrent miscarriage. Twenty-five women with recurrent abortion with systemic lupus erythematosus and/or antiphospholipidic syndrome (A) and a control group of 33 women with the above mentioned diseases but with no abortions (NA) were included. Levels of anti-annexin V, ACA and a- β 2GP1 were assessed by ELISA. LA was evidenced by screening and confirmatory tests. AAF was positive in 96% of group A and anti-annexin V Ab was elevated in 4% of the same group. NA group showed AAF in 70% of the cases and high levels of anti-annexin V Ab in 3% of them. We conclude that no association exists between anti-annexin V Ab and markers of AAF.

Key words: recurrent miscarriage, anti-annexin V, autoantibodies, antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus.

Correspondencia

Dra. Sandra Arriaga
E-mail: sarriaga@fbioyf.unr.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Los anticuerpos (Ac) antifosfolipídicos son un grupo heterogéneo de Ac que pueden aparecer asociados a diversas enfermedades autoinmunes, enfermedades infecciosas, cáncer y a algunas drogas inductoras de lupus. La probabilidad de aborto en una paciente con estos Ac sin tratamiento es del 91%¹. Aquellos embarazos que no resultan en aborto, tienen más riesgo de preeclampsia, bajo peso del recién nacido, distrés fetal y prematuridad². Todas estas complicaciones obstétricas se cree están debidas a episodios trombóticos de los vasos placentarios³.

El síndrome antifosfolipídico (SAF) es una enfermedad autoinmune caracterizada por trombosis arterial o venosa, o abortos recurrentes, asociados a la presencia persistente de Ac anticardiolipina (ACA) o anticoagulante lúpico (AL)⁴⁻¹³. Puede ser primario o asociado a otra enfermedad autoinmune, frecuentemente al lupus eritematoso sistémico (LES). Para el diagnóstico de SAF se requiere la presencia en título moderado o alto de ACA o de AL sumado al evento clínico de la trombosis vascular o la complicación del embarazo, considerándose SAF definido cuando están presentes al menos uno de los criterios clínicos y uno de laboratorio (en 2 o más ocasiones, con al menos un intervalo de 6 semanas)⁵. Los Ac involucrados en el SAF están dirigidos contra los fosfolípidos o contra un complejo fosfolípido-proteína cofactor. Los cofactores más conocidos son la $\beta 2$ glicoproteína 1 ($\beta 2$ GP1) y la protrombina, pero existen otros entre los que se destacarían la proteína C, proteína S y la anexina V, estos últimos menos estudiados. Podría hablarse entonces de una familia de auto Ac involucrada en los eventos trombóticos que participarían de la actividad antifosfolipídica (AAF).

Las anexinas son glicoproteínas que fueron reconocidas por primera vez en 1990. Hasta ese momento habían sido descriptos miembros individuales de esta familia, los cuales se habían caracterizado recibiendo diferentes denominaciones y cuya expresión se daba tanto en el reino animal como el vegetal¹⁴. Las anexinas unen fosfolípidos de manera Ca^{++} dependiente¹⁵ y su estructura se caracteriza por un dominio "core" proteico α helicoidal y compacto, considerado un módulo de unión a membrana dependiente de Ca^{++} . Estudios de cristalización del "core" han revelado que poseen un poro central hidrofílico que actuaría como un canal de Ca^{++} . Se les atribuye un amplio espectro de funciones biológicas, entre las que se destacan su participación en la agregación y fusión de membranas y en los procesos de endo y exocitosis, la inhibición de fosfolipasa A2, su papel anticoagulante¹⁶, capacidad de interacción con las proteínas del citoesqueleto

y papel enzimático en el metabolismo del inositol fosfato. Es tal la importancia de estas proteínas, que alteraciones en su expresión o actividad se relacionan con enfermedades humanas tales como leucemia promielocítica aguda o el SAF, lo que les ha valido su inclusión y denominación dentro de una nueva figura patológica, las anexinopatías¹⁴. La anexina V, cuyo peso molecular es de 35 KD¹⁷, formaría una cubierta molecular protectora que aislaría la superficie apical de las vellosidades placentarias de las proteínas de la coagulación circulantes. La actividad anticoagulante es una figura común de todas las anexinas fijadoras de Ca^{++} y puede ser explicada por su capacidad de secuestrar el Ca^{++} de la matriz fosfolipídica, sitio donde se produce la interacción con las proteínas coagulantes.

En modelos murinos se ha demostrado que la infusión de Ac anti-anexina V produce infarto placentario y pérdida del embarazo, indicando claramente que la anexina V es necesaria para el mantenimiento de la integridad placentaria¹⁸. Actualmente existe cierta evidencia de que la propiedad anticoagulante de la anexina V podría tener una importancia biológica en las pérdidas fetales recurrentes asociadas al SAF. Se ha sugerido que el desplazamiento de la anexina V de la superficie celular por los Ac anti-anexina V, hallados en el suero de pacientes con SAF, serían responsables del ambiente trombogénico y la consecuente pérdida fetal¹⁹. Sin embargo, persisten algunas discrepancias con respecto a la asociación entre la presencia de estos Ac y el aborto recurrente en mujeres con SAF.

OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar la asociación entre los Ac anti-anexina V y el aborto recurrente en mujeres con enfermedades autoinmunes.

Objetivos específicos

- Determinar los niveles de Ac anti-anexina V en mujeres abortadoras recurrentes con enfermedades autoinmunes.
- Determinar los niveles de otros marcadores de AAF (ACA, anti- $\beta 2$ GP1 y AL) en esta población.
- Analizar la existencia de correlación entre los anti-anexina V y los marcadores de AAF en la población en estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes

Se trabajó con 25 mujeres con LES y/o SAF abortadoras recurrentes [(A) (número de abortos ≥ 2)], edad (promedio

± DE): 36 ± 7 años. Como grupo control se estudiaron 33 mujeres con las patologías mencionadas anteriormente, no abortadoras, con al menos 2 embarazos previos normales y sin antecedentes de complicaciones obstétricas (NA), edad (promedio ± DE): 34 ± 10 años. La inclusión de las pacientes para el estudio se llevó a cabo previa evaluación de las mismas por médico reumatólogo y sólo se incluyeron aquellas que poseían un diagnóstico definido para SAF y/o LES sin y con abortos recurrentes o complicaciones obstétricas (preeclampsia, bajo peso del recién nacido, distrés fetal y prematuridad). Las pacientes fueron clasificadas para SAF según criterios actualizados por el Consenso Internacional del 2006²⁰ y para LES según la revisión de los criterios por el Colegio de Reumatología Americano en 1997²¹. El grupo de pacientes en estudio estuvo sometido a distintos tratamientos entre los que se puede mencionar la administración de corticoides, antiagregantes plaquetarios y anticoagulantes orales. Un 12% de las pacientes recibió hidroxilcloroquina.

Las pacientes fueron derivadas de la Sección Reumatología y Enfermedades Autoinmunes Sistémicas del Hospital J. B. Iturraspe de Santa Fe.

El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario.

Parámetros bioquímicos

Se procedió a la obtención de suero para las determinación de ACA y anti-β2GP1 y plasma para la determinación de AL y para la de anti-anexina V. Para esta última determinación se prefirió la utilización de plasma a fin de evitar la posible formación de inmunocomplejos con la anexina liberada por las células sanguíneas durante el proceso de coagulación.

- Determinación de ACA (IgM e IgG)

Los ACA se determinaron por un EIA "in house" utilizando como antígeno de sensibilización, cardiolipina de origen corazón bovino (Sigma, St. Louis, USA). Los resultados se expresaron en UMPL/ml y UGPL/ml para los isotipos M y G, respectivamente. Los valores de referencia obtenidos para nuestro laboratorio fueron: ACA IgM/IgG título bajo: 10 a 40, moderado: 40 a 80, alto: >80. Para validar el criterio de laboratorio de SAF consideramos valores de ACA en los rangos moderados y altos.

- Determinación de Ac anti-β2GP1 total

La detección de anti-β2GP1 total (IgG, IgM e IgA)

se realizó con un ELISA cuantitativo ORG 521S Anti-beta-2-Glycoprotein I Screen provisto por Orgentec Diagnostika GmbH Mainz – Germany.

- Determinación de Ac anti-anexina V (IgG e IgM)

La detección de los Ac anti-anexina V se realizó mediante un ELISA heterogéneo tipo "sandwich", "in house". Para ello se sensibilizaron tiras de poliestireno con anexina V de origen placentario humano (Sigma, St. Louis, USA) y se incubaron toda la noche a 4°C. Después de lavar, bloquear y agregar las muestras, calibradores, controles positivos y negativos, los Ac anti-anexina V fijados a la placa se revelaron con un Ac anti-IgG/IgM humana-peroxidasa y tetrametilbenzidina-H₂O₂. Las densidades ópticas se determinaron a 450 nm con filtro de referencia a 630 nm. La cantidad de Ac presente en cada muestra se determinó en base a la curva de calibración obtenida graficando D.O. vs. concentración. Los resultados se expresaron en U/ml y el intervalo de referencia para nuestro laboratorio fue de 0 a 6 U/ml.

- Detección de AL

Los estudios de AL se realizaron en pacientes sin tratamiento con anticoagulantes orales ni heparina. Las muestras fueron recolectadas en tubos plásticos con citrato de sodio como anticoagulante y posteriormente sometidas a doble centrifugación para la obtención de plasma pobre en plaquetas. En caso de no poder realizar la técnica en ese momento se congeló a -70°C para su posterior utilización. El protocolo de estudio de AL se realizó según normas de la ISTH. Como pruebas de screening se utilizaron aPTT Actin FSL (Siemens), PTT-LA (Stago), test de veneno de víbora russell diluido dRVVT (Stago) y mezclas con plasma normal para determinar corrección o no corrección de las determinaciones alteradas. En caso de positividad en las pruebas de screening se realizaron las pruebas confirmatorias usando reactivos con alta concentración de fosfolípidos como la prueba de neutralización con fosfolípidos hexagonales (StacLOT-LA, Stago).

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado utilizando el test basado en la variable Chi cuadrado o test exacto de Fisher o las estimaciones de las razones de odds (OR) y sus intervalos de confianza del 95%, según correspondiera. Se consideró estadísticamente significativo cuando p < 0,05.

RESULTADOS

La distribución de las pacientes según los valores obtenidos para Ac anti-anexina V vs. ACA, AL, anti-β2GP1 y el indicador de AAF (la cual se consideró positiva cuando estuvo presente al menos uno de los siguientes marcadores: ACA, AL, anti-β2GP1) se muestran en las Tablas 1, 2, 3, 4 respectivamente. Al analizar los resultados obtenidos para Ac anti-anexina V y ACA, se encontró una asociación levemente significativa entre ambos Ac ($p = 0,08$). Sin embargo no se halló una asociación significativa entre Ac anti-anexina V y AL ($p = 0,45$), ni entre Ac anti-anexina V y Ac anti-β2GP1 ($p = 0,28$). Tampoco se encontró asociación significativa entre los Ac anti-anexina V e indicador de AAF ($p = 0,34$).

En la Figura 1 se muestra que el 96% del grupo A presentó AAF positiva (ACA positivo: 72%; AL positivo: 44% y anti-β2GP1 positivo: 32%) y el 4% niveles elevados de Ac anti-anexina V (título obtenido 18 U/ml). El grupo NA

mostró AAF en el 70% de los casos (ACA positivo: 70%; AL positivo: 12% y anti-β2GP1 positivo: 3%) y niveles elevados de Ac anti-anexina V en un 3% (título obtenido 16 U/ml). No se encontró asociación significativa entre grupo y Ac anti-anexina V ($p = 0,68$) ni entre grupo y ACA ($p = 0,84$). Por el contrario, hubo asociaciones significativas entre cada grupo y AL, anti-β2GP1 e indicador de AAF ($p = 0,006$, $p = 0,003$, $p = 0,01$, respectivamente). Mediante la estimación de las razones de odds con un intervalo de confianza del 95%, se encontró que la chance de pertenecer al grupo A es 6,7 veces mayor con AL positivo y 17,5 veces mayor con anti-β2GP1 positivo.

DISCUSIÓN

La pérdida del embarazo es uno de los hallazgos más frecuentes del SAF, el cual se caracteriza por la presencia de ACA y de AL. El examen histológico de las placentas de embarazadas con SAF muestra a menudo el infarto y la

Ac anti-anexina V	ACA negativo	ACA positivo	Total
Negativo	15	41	56
Positivo	2	0	2
Total	17	41	58

Ac: anticuerpos. / ACA: anticuerpos anticardiolipina.

Tabla 1. Distribución de las pacientes según resultados de Ac anti-anexina V y ACA.

Ac anti-anexina V	AL negativo	AL positivo	Total
Negativo	42	14	56
Positivo	1	1	2
Total	43	15	58

Ac: anticuerpos. / AL: anticoagulante lúpico.

Tabla 3. Distribución de las pacientes según resultados de Ac anti-anexina V y AL.

Ac anti-anexina V	Ac anti-β2GP1 negativo	Ac anti-β2GP1 positivo	Total
Negativo	48	8	56
Positivo	1	1	2
Total	49	9	58

Ac: anticuerpos. / anti-β2GP1: anti-β2 glicoproteína 1.

Tabla 2. Distribución de las pacientes según resultados de Ac anti-anexina V y Ac anti-β2GP1.

Ac anti-anexina V	AAF negativa	AAF positiva	Total
Negativo	10	46	56
Positivo	1	1	2
Total	11	47	58

Ac: anticuerpos. / AAF: actividad antifosfolípida.

Tabla 4. Distribución de las pacientes según resultados de Ac anti-anexina V e indicador de AAF.

trombosis de la vasculatura uteroplacentaria. Sin embargo, algunas mujeres con persistencia de niveles elevados de ACA y de AL e historia de trombosis, no tienen complicaciones fetales y, en muchos casos, abortos recurrentes sin causa reconocida ocurren en mujeres sin ACA o AL. Se cree que otros autoanticuerpos, entre los cuales se encuentran los anti-anexina V, podrían estar involucrados en fallos reproductivos²². El mecanismo de la pérdida fetal relacionado a la presencia de Ac antifosfolipídicos es, hasta ahora, poco comprendido, si bien la trombosis placentaria puede causar infarto y eventualmente muerte fetal^{23,24}. Se ha sugerido que los Ac antifosfolipídicos, además de regular la coagulación, inducen inflamación placentaria y daño directo sobre el trofoblasto durante la formación del sincicio^{25,26}.

La anexina V es la anexina más abundante entre los mamíferos y se encuentra intracelularmente en vesículas y en las membranas plasmáticas, y está altamente expresada en la superficie apical del sinciotrofoblasto y en las células endoteliales humanas^{27,28}. También se encuentra en pequeñas cantidades en sangre, líquido amniótico y plasma seminal^{26,29}. Las propiedades anticoagulantes de la anexina V están ligadas a su capacidad para unir fosfolípidos, especialmente fosfatidilserina. La anexina V extracelular reconoce la fosfatidilserina de la membrana externa y se une a ella. Este complejo forma una placa protectora que previene una excesiva reacción de coagulación fosfolípido dependiente^{29,30}.

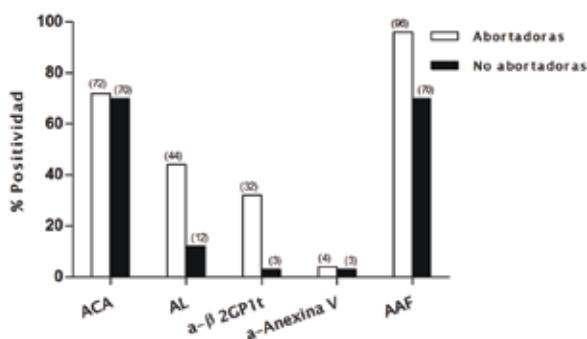


Figura 1. Distribución de anticuerpos anti-anexina V y demás indicadores de actividad antifosfolipídica en pacientes abortadoras y no abortadoras con enfermedades autoinmunes. Se realizó la determinación de anticuerpos anti-anexina V y de otros indicadores de actividad antifosfolipídica (anticuerpos anticardiolipina, anti-β2 glicoproteína 1 y anticoagulante lúpico) en los dos grupos de pacientes estudiados. No se encontró asociación significativa entre grupo y Ac anti-anexina V ($p > 0,05$) ni entre grupo y ACA ($p > 0,05$). Por el contrario, hubo asociaciones significativas entre cada grupo y AL, anti-β2GP1t e indicador de AAF ($p < 0,05$).

En el presente trabajo se estudiaron los niveles plasmáticos de Ac anti-anexina V y de otros marcadores de AAF (ACA, AL y anti-β2GP1) en mujeres con LES con antecedentes de abortos recurrentes (número de abortos ≥ 2) y en un grupo control constituido por mujeres con la patología mencionada anteriormente, multíparas y sin antecedentes de complicaciones obstétricas, para investigar la posible correlación entre ambos parámetros. Se encontró que, en la muestra analizada, no existe asociación entre Ac anti-anexina V y los indicadores de AAF en mujeres abortadoras recurrentes con lupus eritematoso sistémico. Además se determinó que el AL y los Ac anti-β2GP1 serían mejores caracterizadores del grupo señalado previamente. Nuestros resultados son concordantes con los obtenidos por Rezk y col.³¹ quienes, al investigar el posible papel de los Ac anti-anexina V en la inducción de las pérdidas fetales recurrentes, no pudieron confirmar que estos Ac sean de utilidad para predecir el aborto recurrente en mujeres sanas. Además, Alijotas-Reig y col.³² encontraron que la presencia de Ac anti-anexina V no debería ser considerado un factor de riesgo para el aborto recurrente y la muerte fetal inexplicable. De la misma manera Bizzaro y col.³³ estudiaron una gran cohorte de mujeres embarazadas y concluyeron que los Ac anti-anexina V medidos en mujeres sanas no tienen valor predictivo sobre la posibilidad de aborto involuntario y no son útiles para evaluar el riesgo al comienzo del embarazo.

Recientemente, Galli y col.³⁴ demostraron que los Ac anti-anexina V IgG pero no IgM, podrían estar relacionados con el aborto. Si bien las concentraciones de anexina V están disminuidas en las placentas aisladas de mujeres con pérdidas del embarazo asociado a la presencia de Ac antifosfolipídicos^{35,36} y los Ac anti-anexina V podrían interferir con la función del sinciotrofoblasto³⁷, nuestros resultados no son los esperados de acuerdo a la fisiología de la anexina V y la fisiopatología de los Ac anti-anexina V.

Independientemente de que los Ac anti-anexina V pudieran cumplir algún papel en la fisiopatología del aborto, las discordancias observadas respecto a su función en la bibliografía internacional podría atribuirse también a la falta de técnicas de detección de Ac anti-anexina V debidamente estandarizadas.

Si bien hubiéramos esperado que los Ac anti-anexina V tuvieran un papel similar a los anti-β2GP1^{32,38,39} incluso en pacientes con AL y ACA negativos, nuestros resultados son desalentadores en este sentido. Sin embargo, si bien son conocidas las propiedades anticoagulantes de la anexina V es importante remarcar que, inesperadamente, una línea de

ratones transgénicos deficientes en la misma no presentaron pérdidas fetales⁴⁰.

CONCLUSIONES

El SAF y el LES son patologías crónicas autoinmunes vinculadas con relativa frecuencia a la pérdida del embarazo. Dado que los mecanismos que conducen a la trombosis vascular o pérdidas fetales son hasta ahora prácticamente desconocidos, el estudio del papel de los Ac anti-anexina V nos permitiría definir una subpoblación de alto riesgo de aborto, promoviendo la implementación de conductas terapéuticas diferenciales de carácter preventivo y controles más estrictos. Se necesitan realizar estudios posteriores con técnicas de laboratorio más estandarizadas para establecer la función exacta que cumplen los Ac anti-anexina V durante el embarazo y especialmente su relación con las pérdidas fetales recurrentes tanto en el aborto temprano como tardío.

BIBLIOGRAFÍA

1. Branch DW. Immunological disease and fetal death. *Clin Obstet Gynecol.* 1987; 30:295-311.
2. Branch DW, Silver RM, Blackwell JL, Reading JC, Scott JR. Outcome of treated pregnancies in women with antiphospholipid syndrome: an update of the Utah experience. *Obstet Gynecol.* 1992; 80:614-20.
3. Hughes GRV. The antiphospholipid syndrome: 10 years on. *Lancet* 1993; 342:341-4.
4. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette J, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999; 42:1309-11.
5. Lockshin MD, Sammaritano LR, Schwartzman S. Validation of the Sapporo criteria for antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum.* 2000; 43:440-3.
6. McNeil HP, Chesterman CN, Krilis SA. Immunology and clinical importance of antiphospholipid antibodies. *Adv Immunol.* 1991; 49:193-280.
7. Krilis SA, Hunt JE. Immunology of antiphospholipid antibodies. In: Panayi GS, editor. Immunology of connective tissue diseases (Immunology and Medicine series). Boston: Kluwer Academic 1993; 279-304.
8. Roubey RA. Autoantibodies to phospholipid-binding plasma proteins: a new view of lupus anticoagulants and other "antiphospholipid" autoantibodies. *Blood.* 1994; 84:2854-67.
9. Love PE, Santoro SA. Antiphospholipid antibodies: anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus (SLE) and in non-SLE disorders. Prevalence and clinical significance. *Ann Intern Med.* 1990; 112:682-98.
10. Cines DB, McCrae KR. The antiphospholipid-protein syndrome. *J Clin Immunol.* 1995; 15:86S-100S.
11. Roubey RA. Immunology of the antiphospholipid antibody syndrome. *Arthritis Rheum.* 1996; 39:1444-54.
12. Shapiro SS. The lupus anticoagulant/antiphospholipid syndrome. *Annu Rev Med.* 1996; 47:533-53.
13. Nahass GT. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid antibody syndrome. *J Am Acad Dermatol.* 1997; 36 (2 Pt 1):149-68.
14. Gerke V, Moss S. Annexins: From Structure to Function. *Physiol Rev.* 2002; 82:331-71.
15. Crumpton MJ, Dedman JR. Protein terminology tangle. *Nature.* 1990; 345:212-12.
16. Römisch J, Schorlemmer U, Fickenscher K, Pques EP, Heimburger N. Anticoagulant properties of placenta protein-4 (annexin V). *Thromb Res.* 1990; 60:355-66.
17. Koulov AV, Stucker KA, Lakshmi C, Robinson JP, Smith BD. Detection of apoptotic cells using a synthetic fluorescent sensor for membrane surfaces that contain phosphatidylserine. *Cell Death and Differ.* 2003; 10:1357-59.
18. Wang X, Campos B, Kaetzel MA, Dedman JR. Annexin V is critical in the maintenance of murine placental integrity. *Am J Obstet Gynecol.* 1999; 180:1008-16.
19. Rand JH, Wu XX, Andree HA, Lockwood CJ, Guller S, Scher J, et al. Pregnancy loss in the antiphospholipid-antibody syndrome - a possible thrombogenic mechanism. *N Engl J Med.* 1997; 337:154-60.
20. Miyakis S, Lockshin M, Atsumi T, Branch D, Brey L, Cervera R, Derksen R, de Groot P, Koike T, Meroni P, Reber G, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyiannopoulos P, Krilis S. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2006;4:295-306.
21. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus [letter]. *Arthritis Rheum* 1997;40:1725.
22. Blank M, Shoenfeld Y. Antiphosphatidylserine antibodies and reproductive failure. *Lupus.* 2004; 13:661-5.

23. Chouat G, Menu E, Delange G, Mareau J F, Khrishnan L, Hui L, et al. Immuno-endocrine interactions in early pregnancy. *HumanReprod.* 1995; 10 (Suppl. 2):55–9.
24. Mahjoub T, Mtiraoui N, Tamin H, Hizem S, Finan RR, Nsri B, et al. Association between adverse pregnancy outcomes and maternal factor V G1691A and prothrombin G20210A genotypes in women with history of recurrent idiopathic miscarriages. *Am J Hematol.* 2005; 80:12–9.
25. Di Simone N, Meroni PL, del Papa N, Raschi E, Caliandro D, de Carolis S, et al. Antiphospholipid antibodies affect trophoblast gonadotropin secretion and invasiveness by binding directly and through adhered B2-glycoprotein I. *Arthritis Rheum.* 2000; 43:140–51.
26. Ruiz-Iratorza G, Martínez-Berriotxo A, Egurbide MV. Síndrome antifosfolipídico en el siglo XXI. *Med Clin (Barc).* 2009, doi: 10.1016/j.medclin.2008.10.046.
27. Krikun G, Lockwood CJ, Wu XX, Zhou XD, Gulle S, Calandri C, et al. The expression of the placental anticoagulant protein, annexin V, by villous trophoblasts: immuno-localization and in vitro regulation. *Placenta.* 1994; 15:601–12.
28. Ailus K, Tulppala M, Palosou T, Ylikorkala O, Vararala O. Antibodies to beta 2-glycoprotein I and prothrombin in habitual abortion. *Fertil Steril.* 1996; 66: 937–41.
29. Bozic B, Irman S, Gaspersic N, Kveder T, Rozman B. Antibodies against annexin A5: detection pitfalls and clinical associations. *Autoimmunity.* 2005; 38: 425–30.
30. Pigault C, Follenius-Wund A, Schmutz M, Freyssinet JM, Brisston A. Formation of two dimensional arrays of annexin V on phosphatidylserine-containing liposomes. *J Mol Biol.* 1994; 235:199–208.
31. Rezk A, Abdel-Hafeez N, Rageh IM, Abdalla W. Anti-annexin as a marker in patients with recurrent miscarriages. *Middle East Fertility Society Journal.* 2010; 15, 47–50.
32. Alijotas-Reig J, Ferrer-Oliveras R, Rodrigo-Anoro MJ, Farran-Codina I, Llorba-Olivé E, Vilardell-Tarrés M, et al. Anti-annexin A5 antibodies in women with spontaneous pregnancy loss. *Med Clin (Barc).* 2010; 134:433–438.
33. Bizzaro N, Antico A, Musso M, Platzgummer S, Camogliano L, Tozzoli R, et al. A prospective study of 1038 pregnancies on the predictive value of anti-annexin V antibodies for fetal loss. *Ann NY Acad Sci.* 2005; 1050:1–9.
34. Galli M, Borrelli G, Jacobsen EM, Marfisi RM, Finazzi G, Marchioli R, et al. Clinical significance of different antiphospholipid antibodies in the WASP study. *Blood.* 2007; 110:1178–83.
35. van Heerde WL, de Groot PG, Reutelingsperger CPM. The complexity of the phospholipid binding proteinannexin V. *Thromb Haemost.* 1995; 73:172–9.
36. Rand JH, Wu XX, Quinn AS, Chen PP, McCrae KR, Bovill EG, et al. Human monoclonal antiphospholipid antibodies disrupt the annexin A5 anticoagulant crystal shield on phospholipid bilayers: evidence from atomic force microscopy and functional assay. *Am J Pathol.* 2003; 163:1193–200.
37. Krikun G, Lockwood CJ, Wu XX, Zhou XD, Gulle S, Calandri C, et al. The expression of the placental anticoagulant protein, annexin V, by villous trophoblasts: immuno-localization and in vitro regulation. *Placenta.* 1994; 15:601–12.
38. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost.* 2006; 3:1–12.
39. Alijotas-Reig J, Casellas-Caro M, Ferrer-Oliveras R, Llorba-Olive E, Hermosilla E, Vilardell-Tarrés M. Are anti-Beta₂ Glicoprotein-I antibodies markers for recurrent pregnancy loss in lupus anticoagulant/ anticardiolipin seronegative women? *Am J Reprod Immunol.* 2008; 60:229–37.
40. Brachvogel B, Dikschas J, Moch H. Annexin A5 is not essential for skeletal development. *Mol Cell Biol.* 2003; 23:2907–13.