

# Autoanticorpos Anti- $\beta$ 2-glicoproteína I e Síndrome Metabólica

## Anti-beta2-glycoprotein I Autoantibodies and Metabolic Syndrome

Rodrigo B. Krás Borges<sup>1</sup>, Luis Carlos Bodanese<sup>1</sup>, Carlos Alberto von Mühlen<sup>1</sup>, Giuseppe Repetto<sup>1</sup>, Mario Viehe<sup>1</sup>, Gary L. Norman<sup>2</sup>, Henrique L. Staub<sup>1</sup>

Reumatologia, Cardiologia e Endocrinologia - Departamento da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre - Brasil<sup>1</sup>, INOVA Laboratory, San Diego - United States of America<sup>2</sup>

### Resumo

**Fundamento:** A síndrome metabólica (SM) é uma entidade pró-aterogênica. Autoanticorpos tais como  $\beta$ 2-glicoproteína I ( $\beta$ 2-gpl) podem influenciar o aparecimento de ateromas. Estudos anteriores confirmaram uma associação entre anticorpos IgA anti- $\beta$ 2-gpl e isquemia cerebral, infarto do miocárdio, doença arterial periférica e doença da carótida.

**Objetivo:** O objetivo desse estudo de caso-controle foi avaliar uma possível associação entre anticorpos anti- $\beta$ 2-gpl e anticardiolipina (aCL) com SM não-complicada.

**Métodos:** Pacientes com SM sem histórico de eventos vasculares e indivíduos-controle, consistindo em pacientes da Enfermaria de Ortopedia admitidos devido a doenças musculoesqueléticas foram incluídos no estudo. Idade, sexo, etnia, histórico de hipertensão, tabagismo, hipercolesterolemia e diabetes mellitus foram avaliados como fatores de risco em ambos os grupos. Anticorpos IgG, IgM, e IgA anti- $\beta$ 2-gpl e aCL foram detectados através de imunoenaios enzimáticos.

**Resultados:** Um total de 68 pacientes com SM e 82 controles foram estudados. Os pacientes com SM tinham média de idade superior à dos controles ( $P = 0,001$ ), enquanto homens ( $P = 0,003$ ; OR 0,31; IC95%: 0,15-0,16) e etnia caucasiana ( $P = 0,004$ ; OR 0,25; IC95%:0,10-0,60) eram predominantes nos controles. Histórico de hipertensão, hipercolesterolemia e diabetes mellitus foi mais prevalente nos pacientes com SM do que nos controles ( $P < 0,05$ ). A frequência de anticorpos aCL (todos os isotipos) e do IgG e IgM anti- $\beta$ 2 gpl não diferiu de forma significativa nos pacientes com SM e controles. Anticorpos IgA anti- $\beta$ 2-gpl foram significativamente mais frequentes nos pacientes com SM (42,2%) do que nos controles (10,9%) ( $P < 0,001$ ). O OR ajustado para anticorpos IgA anti- $\beta$ 2-gpl foi 3,60 (IC95%: 1,55-8,37;  $P = 0,003$ ).

**Conclusão:** O presente estudo mostra que níveis elevados de autoanticorpos IgA para  $\beta$ 2-gpl podem estar independentemente associados com SM. (Arq Bras Cardiol. 2011; [online].ahead print, PP.0-0)

**Palavras-chave:** Autoanticorpos, síndrome metabólica, anticorpos anticardialipina, aterosclerose.

### Abstract

**Background:** The metabolic syndrome (MetS) is a proatherogenic entity. Autoantibodies to phospholipid cofactors such as beta2-glycoprotein I (beta2-gpl) can influence atheroma appearance. Previous studies confirmed an association of IgA anti-beta2-gpl antibodies with cerebral ischemia, myocardial infarction, peripheral artery disease and carotid disease.

**Objective:** This case-control study evaluates a possible association of anti-beta2-gpl and anticardiolipin (aCL) antibodies with non-complicated MetS.

**Methods:** Cases comprised patients with MetS without history of vascular events; controls included individuals from the Orthopedic Infirmary admitted due to musculoskeletal disorders. Age, sex, race, history of hypertension, smoking, hypercholesterolemia and diabetes mellitus were evaluated as risk factors in both groups. IgG, IgM, and IgA anti-beta2-gpl and aCL antibodies were detected by enzymatic immunoassay.

**Results:** Sixty-eight patients with MetS and 82 controls were studied. Patients with MetS showed mean age higher than controls ( $P = 0.001$ ), while males ( $P = 0.003$ ; OR 0.31; 95%CI 0.15-0.16) and Caucasian ethnicity ( $P = 0.004$ ; OR 0.25; 95%CI 0.10-0.60) predominated in controls. History of hypertension, hypercholesterolemia and diabetes mellitus were more prevalent in cases than in controls ( $P < 0.05$ ). The frequency of aCL antibodies (all isotypes) and of IgG and IgM anti-beta2 gpl did not significantly differ in cases and controls. IgA anti-beta2-gpl antibodies were significantly more frequent in MetS patients (42.2%) than controls (10.9%) ( $P < 0.001$ ). The adjusted OR for IgA anti-beta2-gpl antibodies was 3.60 (95%CI 1.55-8.37;  $P = 0.003$ ).

**Conclusion:** The current study shows that elevated levels of IgA autoantibodies to  $\beta$ 2-gpl might be independently associated to MetS. (Arq Bras Cardiol. 2011; [online].ahead print, PP.0-0)

**Keywords:** Autoantibodies; metabolic syndrome; antibodies, anticardiolipin; atherosclerosis.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Henrique L. Staub •

Av. Ipiranga 6690/220 - Ipiranga - 90610-000 - Porto Alegre, RS - Brasil  
E-mail: reumatopucrs@gmail.com, henriquestaub@terra.com.br

Artigo recebido em 26/03/10; revisado recebido em 14/07/10; aceito em 17/09/10.

## Introdução

A síndrome metabólica (SM) é um grupo de anormalidades metabólicas, incluindo resistência à insulina, dislipidemia e hipertensão sistêmica, na qual a obesidade visceral é acentuada<sup>1</sup>. Inicialmente identificada há sessenta anos, a SM é atualmente um questão de grande interesse<sup>2</sup>. É bem aceito o fato de que a SM prediz diabetes mellitus (DM)<sup>3</sup> e doenças cardiovasculares<sup>3-4</sup>.

Na SM, partículas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) apresentam tendência à oxidação<sup>5</sup>. Hiperglicemia persistente acelera a geração de produtos da glicação avançada, outro fator desencadeante de inflamação arterial<sup>6</sup>. O acúmulo de adipócitos, por sua vez, favorece a secreção do fator de necrose tumoral (TNF) e reduz os níveis de adiponectina, uma adipocina anti-aterogênica<sup>7</sup>.

A aterosclerose é atualmente considerada uma condição imunoinflamatória. A ativação endotelial, um evento primário na aterogênese, pode ser uma consequência de manifestações típicas da SM ou efeito do TNF. A célula endotelial ativada é caracterizada por baixa produção de trombosmodulina e um fenótipo com tendência à hipercoagulabilidade<sup>8</sup>.

A auto-imunidade, particularmente anticorpos anticardiolipina ou cofatores fosfolípides tais como  $\beta$ 2-glicoproteína I ( $\beta$ 2-gpl), podem influenciar o desenvolvimento de ateroma<sup>9</sup>. Anticorpos anticardiolipina (aCL) são classicamente detectados na assim chamada síndrome antifosfolípide (SAF), uma diátese trombótica característica de jovens adultos<sup>10</sup>. O papel etiopatogênico dos anticorpos aCL na SM ainda é desconhecido.

A  $\beta$ 2-gpl é um cofator fosfolípide com 50 kilodaltons e 5 domínios, o qual é um anticoagulante natural. Em pacientes com SAF, os efeitos inibitórios da  $\beta$ 2-gpl nas vias de coagulação são aparentemente desreguladas por anticorpos antifosfolípides<sup>11</sup>. A  $\beta$ 2-gpl é encontrada na placa aterosclerótica e pode ser imunogênica. A indução de aterosclerose em camundongos deficientes para receptor de LDL imunizados com  $\beta$ 2-gpl tem sido relatada<sup>12</sup>. A administração oral de  $\beta$ 2-gpl humana em camundongos previne a formação de ateroma<sup>13</sup>. Sabe-se que a  $\beta$ 2-gpl liga-se a partículas de LDL oxidadas; o complexo pode ser internalizado somente por anticorpos que ocupam os receptores Fc na superfície dos macrófagos<sup>14</sup>.

Uma possível associação de autoanticorpos anti- $\beta$ 2-gpl com SM não-complicada ainda não foi avaliada. O objetivo do presente estudo é verificar a frequência de autoanticorpos aCL e anti- $\beta$ 2-gpl em pacientes com SM e também avaliar a possibilidade de que esses autoanticorpos estejam associados com a ocorrência de SM não-complicada.

## Métodos

### Pacientes

Esse estudo de caso-controle de casos incidentes incluiu pacientes com SM de nosso Ambulatório de Risco Cardiometabólico, não selecionados por sexo ou etnia. Os pacientes com SM incluídos nesse estudo não apresentavam histórico de eventos vasculares isquêmicos. O diagnóstico

de SM foi baseado nos critérios clássicos do Programa Nacional de Educação em Colesterol (NCEP): circunferência abdominal > 102 para homens ou > 88 para mulheres; níveis séricos de triglicérides > 150 mg/dl; pressão arterial  $\geq$  130/85 mmHg; glicemia de jejum > 110 mg/dl; pelo menos três dos critérios deveriam estar presentes para definir o diagnóstico<sup>15</sup>. Os critérios de exclusão foram os seguintes: 1) histórico de infarto agudo do miocárdio (IAM), derrame isquêmico ou oclusão arterial aguda dos membros inferiores; 2) endocardite infecciosa; 3) neoplasmas (atuais ou prévios); 4) infecção pelo vírus da imunodeficiência humana vírus ou *treponema pallidum*; 5) presença de causa hereditária conhecida de trombose, tal como homocistinúria ou mutação do fator V de Leiden; 5) SAF ou outro distúrbio de tecido conjuntivo (DTC)

O grupo controle consistiu em pacientes da Enfermaria de Ortopedia, admitidos devido a fraturas ou distúrbios musculares-ligamentosos, que não apresentavam diagnóstico prévio de SM. Os critérios de exclusão foram: 1) osteonecrose; 2) infecções e neoplasias atuais, doenças hereditárias, SAF, ou DTC; 3) histórico de IAM, derrame isquêmico ou oclusão arterial aguda dos membros inferiores.

Os dados clínicos e demográficos foram obtidos através de revisão de prontuários e entrevistas com os pacientes e suas famílias após obtenção do consentimento livre e informado, considerando-se as seguintes características: 1) idade, sexo, etnia; 2) histórico de pressão arterial elevada<sup>16</sup>; 3) tabagismo atual<sup>17</sup>; 4) DM, de acordo com histórico clínico ou tratamento atual com insulina e/ou medicamentos antidiabéticos<sup>18</sup>; 5) histórico de hipercolesterolemia<sup>19</sup>.

### Amostras

As amostras de soro foram centrifugadas e congeladas em até 2 horas após a coleta e, subsequentemente, armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  até os testes laboratoriais de ensaio imunoenzimático (ELISA) serem realizados. Anticorpos aCL IgG, IgM e IgA (INOVA Quantalite Cardioliipin kits, INOVA Diagnostics, Inc., San Diego, EUA)<sup>20</sup> e anticorpos anti- $\beta$ 2-gpl (INOVA Quantalite  $\beta$ 2-gpl kits, INOVA Diagnostics, Inc., San Diego, EUA)<sup>21</sup> foram testados. Os ensaios foram avaliados por espectrofotometria, medindo e comparando a intensidade da cor nas amostras dos pacientes com a cor das amostras dos controles. Títulos moderados a altos de anticorpos aCL e anti- $\beta$ 2-gpl (> 20 unidades para todos os isotipos) foram considerados positivos<sup>20,21</sup>. Baixos títulos de aCL ou anti- $\beta$ 2-gpl (10-20 unidades) não foram considerados. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética local.

### Análise de dados

*Odds ratios* (OR) com intervalos de confiança de 95% (IC95%) foram utilizados na análise univariada. Regressão logística com IC95% foi realizada para ajuste dos efeitos da idade, sexo, etnia e tabagismo atual. A escala de Hopkins para OR foi utilizada, onde um OR de 1-1,5 foi considerado trivial; entre 1,5-3,5, baixo; entre 3,5-9, moderado; entre 9-32, alto; e acima de 32, muito alto<sup>22</sup>. Os testes exato de Fisher e Qui-quadrado foram usados para comparar variáveis categóricas e o teste *t* de Student foi usado para a

comparação de variáveis contínuas. O nível de significância de 5% foi estabelecido ( $P < 0,05$ ). Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software SPSS para Windows, versão 11.5, Chicago, IL.

## Resultados

Um total de 68 pacientes no grupo SM e 82 controles foram incluídos no estudo. Os pacientes com SM tinham maior probabilidade de serem mais velhos, enquanto indivíduos do sexo masculino e caucasianos predominaram no grupo controle. Hipertensão, hipercolesterolemia e DM foram significativamente mais prevalentes no grupo com SM do que no grupo controle. Tabagismo foi mais prevalente no grupo controle. As características clínicas e demográficas dos casos e controles são mostradas na Tabela 1.

A Tabela 2 categoriza casos e controles de acordo com os perfis aCL e anti-β2-gpl. A frequência de anticorpos aCL (todos os isotipos) e anticorpos IgG e IgM anti-β2 gpl não foram significativamente diferentes nos casos e controles. Anticorpos IgA anti-β2-gpl foram significativamente mais frequentes nos pacientes com SM do que nos controles.

O OR para anticorpos aCL e anti-β2-gpl ajustados fatores de risco (idade, sexo, etnia e tabagismo atual) são mostrados na Tabela 3. Anticorpos IgA anti-β2-gpl, mas não outros, mostraram-se independentemente associados com SM.

**Tabela 1 - Características clínicas e demográficas de pacientes com síndrome metabólica (casos) e controles**

	Casos (n = 68)	Controles (n = 82)	P
Média da idade, anos (DP†)	58,7 ± 9,2	51,1 ± 17	0,001‡
Sexo masculino	14 (20,6%)	37 (45,1%)	0,003*
Caucasianos	46 (67,7%)	73 (89%)	0,004*
Hipertensão	65 (95,6%)	22 (26,8%)	<0,001*
Tabagismo	7 (10,3%)	28 (34,1%)	0,001*
Hipercolesterolemia	55 (80,9%)	16 (19,5%)	<0,001*
DM	42 (61,8%)	5 (6,1%)	<0,001*

n - número da amostra; odds ratio com intervalo de confiança de 95%; †: DP - desvio-padrão; ‡ teste t de Student; \* teste de qui-quadrado; DM: diabetes mellitus.

**Tabela 2 - Frequência de anticorpos aCL e anti-β2-gpl em pacientes com síndrome metabólica (casos) e controles**

	Casos (n = 68)	Controles (n = 82)	OR (95%CI)*	P**
IgG aCL Positivo	3 (4,4%)	1 (1,2%)	3,73 (0,38-36,79)	0,32
IgM aCL Positivo	0	3 (3,7%)	1,86 (1,60-2,16)	0,25
IgA aCL Positivo	0	0	NC	NC
IgG anti-β2-gpl Positivo	2 (2,4%)	4 (4,9%)	0,59 (0,10-3,32)	0,68
IgM anti-β2-gpl Positivo	12 (14,6%)	8 (9,8%)	0,89 (0,29-2,71)	0,34
IgA anti-β2-gpl Positivo	30 (42,2%)	9 (10,9%)	3,84 (1,75-8,39)	<0,001

n - número da amostra; \*odds ratio com intervalo de confiança de 95% não ajustado para fatores de risco; \*\*teste de qui-quadrado; NC: não-calculado.

## Discussão

O presente estudo avalia, pela primeira vez, a frequência de anticorpos aCL e anti-β2-gpl em pacientes com SM. Os casos foram selecionados de uma clínica terciária especializada em risco cardiometabólico. Os pacientes com SM apresentavam uma média de idade mais alta, quando comparados aos controles, enquanto os indivíduos do sexo masculino e a etnia Caucasiana predominaram no grupo controle. Essas diferenças foram corrigidas através da regressão logística, de qualquer maneira. Os fatores de risco clássicos para aterosclerose foram avaliados em ambas as populações. Algumas variáveis (hipertensão, DM) são critérios para SM e previsivelmente, foram mais frequentes nos casos, quando comparados aos controles.

Os dados não-ajustados mostraram que apenas anticorpos IgA anti-β2-gpl diferiram nos dois grupos, sendo significativamente mais altos nos pacientes com SM. É interessante notar que o ponto de corte utilizado para os ensaios aCL e anti-β2-gpl seguiram as recomendações internacionais, com títulos somente moderados a altos (> 20 unidades) sendo considerados relevantes<sup>20,21</sup>. Os níveis de anticorpos aCL e anti-β2-gpl não foram estratificados, já que as implicações clínicas para níveis moderados a altos não diferem entre si<sup>10</sup>. De qualquer maneira, o ponto de corte dos anticorpos IgM e IgA anti-β2-gpl mostrou resultado positivo em aproximadamente 10% dos controles, o que provavelmente irá exigir ajustes no futuro.

Após o ajuste para sexo, idade, etnia e tabagismo, o OR (3,60) indicou uma associação independente entre os

**Tabela 3 - Odds ratio (OR) para diferentes isotipos de aCL e anti-β2-gpl ajustados para fatores de risco para SM**

	OR*	IC95%**	P***
IgG aCL	3,79	0,35-41,21	0,273
IgM aCL	NC	NC	NC
IgA aCL	NC	NC	NC
IgG anti-β2-gpl	0,62	0,10-3,99	0,618
IgM anti-β2-gpl	0,90	0,28-2,93	0,864
IgA anti-β2-gpl	3,60	1,55-8,37	0,003

Dados ajustados para idade, sexo, etnia e tabagismo; \*odds ratio ajustado para fatores de risco; \*\*IC95% intervalo de confiança de 95%; \*\*\*teste de qui-quadrado; NC: não-calculado.

anticorpos IgA anti- $\beta$ 2-gpl e SM, com significância estatística convincente ( $P = 0,003$ ).

Uma possível associação entre anticorpos IgG aCL com a SM (OR ajustado de 3,79) não pode ser confirmada ( $P = 0,273$ ). Um eventual efeito protetor do anticorpo IgG anti- $\beta$ 2-gpl para SM (OR ajustado de 0,62) também não foi confirmado ( $P = 0,618$ ). Enfatizamos que as variáveis hipertensão, hipercolesterolemia e DM não foram utilizadas para ajustes, pois são critérios diagnósticos da SM.

O significado da associação entre anticorpos IgA anti- $\beta$ 2-gpl e SM ainda é desconhecida para nós. Autoanticorpos IgA para  $\beta$ 2-gpl, de acordo com estudos anteriores realizados por nosso grupo, associaram-se de forma independente com doença cerebral isquêmica<sup>23</sup>, infarto agudo do miocárdio<sup>24</sup>, doença arterial periférica sintomática<sup>25</sup> e doença da carótida<sup>26</sup>.

Recentemente, uma associação relevante entre anticorpos IgA anti- $\beta$ 2-gpl e IgG anti-fosfatidilserina e derrame isquêmico foi relatada<sup>27</sup>. É interessante mencionar que anticorpos IgM anti- $\beta$ 2-gpl estavam ligados à distúrbios trombóticos em mulheres jovens sem doença autoimune, particularmente quando os fatores de risco clássicos ou SM estavam ausentes; o isotipo IgA não foi testado nesse estudo<sup>28</sup>. Esses dados sugerem que autoanticorpos IgM anti- $\beta$ 2-gpl podem comportar-se de forma diferente do isotipo IgA em relação à SM.

O teste para anticorpos aCL apresentou resultados negativos na maioria desses estudos<sup>23-28</sup> e também em nossos pacientes com SM. Conjuntamente, esses achados não demonstram um papel relevante dos anticorpos aCL em pacientes com doença aterosclerótica ou SM.

A boa especificidade dos anticorpos anti- $\beta$ 2-gpl em pacientes com aterosclerose e SAF parece ser diferente<sup>29</sup>. Anticorpos anti- $\beta$ 2-gpl de pacientes com SAF tem como alvo o domínio 1 da molécula<sup>30</sup>. Recentemente, tem sido demonstrado que anticorpos IgA de pacientes com aterosclerose reconhecem especificamente o domínio 4 de  $\beta$ 2-gpl<sup>31</sup>. Assim, um subgrupo distinto de anticorpos anti- $\beta$ 2-gpl em pacientes com doença aterosclerótica pode ser postulado.

Sabe-se que o complexo  $\beta$ 2-gpl/LDL oxidado é internalizado para o macrófago via ocupação de receptores Fc para IgG<sup>14,32</sup>. Alternativamente, poderíamos considerar

a hipótese de que anticorpos IgA anti- $\beta$ 2-gpl (que podem ligar-se ao complexo como um todo) também tem esse papel na superfície do macrófago. De fato, os receptores Fc para IgA são encontrados nas membranas dos macrófagos<sup>33</sup>. Esse complexo assim internalizado pode gerar células espumosas.

Nossos dados em pacientes com doença aterosclerótica estabelecida<sup>23-26</sup> e SM parecem ser reprodutíveis em relação à frequência de autoanticorpos IgA anti- $\beta$ 2-gpl. Dados sobre a SM, não relatados anteriormente, sugerem que os autoanticorpos IgA anti- $\beta$ 2-gpl circulantes podem preceder um evento isquêmico.

A razão pela qual o isotopo IgA está envolvido nessa resposta imunológica ainda não está bem definida, mas infecção crônica pode ser postulada. É digno de nota o fato de que mimetismo molecular de produtos virais e bacterianos com  $\beta$ 2-gpl tem sido relatado<sup>34</sup>.

Nosso estudo mostra limitações que devem ser mencionadas. O desenho de caso-controle com pequeno tamanho amostral e uma análise multivariada limitada não é capaz de definir a questão ou controlar todos os fatores de risco: é bastante exploratório e estudos maiores são necessários.

Em resumo, anticorpos IgA anti- $\beta$ 2-gpl foram mais frequentes em pacientes com SM do que nos controles. Essa associação ocorreu independentemente de outros fatores de risco para doença aterosclerótica. As implicações clínicas resultantes desses achados devem ser detalhadas no futuro.

### Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

### Fontes de Financiamento

O presente estudo não teve fontes de financiamento externas.

### Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de dissertação de Mestrado de Rodrigo B. Krás Borges pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

## Referências

- Després JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*. 2006;444(7121):881-7.
- Kahn R, Buse J, Ferrannini E, Stern M. American Diabetes Association, European Association for the Study of Diabetes. The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care*. 2005;28(9):2289-304.
- Juutilainen A, Lehto S, Ronnemaa T, Pyörälä K, Laakso M. Proteinuria and metabolic syndrome as predictors of cardiovascular death in non-diabetic and type 2 diabetic men and women. *Diabetologia*. 2006;49(1):56-65.
- Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J, et al. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA*. 2002;288(21):2709-16.
- Holvoet P, De Keyser D, Jacobs DR. Oxidized LDL and the metabolic syndrome. *Future Lipidol*. 2008;3(6):637-49.
- Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res*. 1999;84(5):489-97.
- Matsuzawa Y. The metabolic syndrome and adipocytokines. *FEBS Lett*. 2006;580(12):2917-21.
- Bécharde D, Scherpereel A, Hammad H, Gentina T, Tscopoulos A, Aumercier M, et al. Human endothelial-cell specific molecule-1 binds directly to the integrin CD11a/CD18 (LFA-1) and blocks binding to intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol*. 2001;167(6):3099-106.
- Wick G, Xu Q. Atherosclerosis: an autoimmune disease. *Exp Gerontol*. 1999;34(4):559-66.

10. 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 APS. *J Thromb Haemost*. 2006;4(2):295-306.
11. Kandiah DA, Krilis SA. Beta 2-glycoprotein I. *Lupus*. 1994;3(4):207-12.
12. George J, Afek A, Gilburd B, Blank M, Levy Y, Aron-Maor A, et al. Induction of early atherosclerosis in LDL-receptor-deficient mice immunized with beta2-glycoprotein I. *Circulation*. 1998;98(11):1108-15.
13. Harats D, George J. Beta2-glycoprotein I and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2001;12(5):543-6.
14. Kobayashi K, Kishi M, Atsumi T, Bertolaccini ML, Makino H, Sakairi N, et al. Circulating oxidized LDL forms complexes with beta2-glycoprotein I: implication as atherogenic autoantigen. *J Lipid Res*. 2003;44(4):716-26.
15. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001;285(19):2486-97.
16. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA*. 2003;289(19):2560-72.
17. Filozof C, Fernandez Pinilla MC, Fernández-Cruz A. Smoking cessation and weight gain. *Obes Rev*. 2004;5(2):95-103.
18. Grundy SM, Cleeman JJ, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. / American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute. Diagnosis and management of the metabolic syndrome. An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. Executive summary. *Cardiol Rev*. 2005;13(6):322-7.
19. Donahue RP, Abott RD, Reed DM, Yano K. Physical activity and coronary heart disease in middle-aged and elderly men: the Honolulu Heart Program. *Am J Public Health*. 1988;78(6):683-5.
20. Gharavi AE, Harris EN, Asherson RA, Hughes GR. Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity. *Ann Rheum Dis*. 1987;46(1):1-6.
21. Lewis S, Keil LB, Binder WL, DeBari VA. Standardized measurement of major immunoglobulin class (IgG, IgA, IgM) antibodies to beta2-glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome. *J Clin Lab Anal*. 1998;12(5):293-7.
22. Hopkins WG. A new view of statistics. [Accessed on 2004 Apr 11]. Available from: <http://sports.org/resource/stats/index.html>
23. Staub HL, Norman GL, Crowther T, da Cunha VR, Polanczyk A, Bohn JM, et al. Antibodies to the atherosclerotic plaque components beta2-glycoprotein I and heat shock proteins as risk factors for acute cerebral ischemia. *Arq Neuropsiquiatr*. 2003;61(3B):757-63.
24. Ranzolin A, Bohn JM, Norman GL, Manenti E, Bodanese LC, von Muhlen CA, et al. Anti-beta2-glycoprotein I antibodies as risk factors for acute myocardial infarction. *Arq Bras Cardiol*. 2004;83(2):141-4.
25. Franck M, Staub HL, Petracco JB, Norman GL, Lassen AJ, Schiavo N, et al. Autoantibodies to the atheroma component beta2-glycoprotein I and risk of symptomatic peripheral artery disease. *Angiology*. 2007;58(3):295-302.
26. Recuero ML, Silva JB, Norman GL, von Mühlen CA, Staub HL. IgA antibodies to beta2-glycoprotein I and carotid disease. *Isr Med Assoc J*. 2007;9(6):495-6.
27. Kahles T, Humpich M, Steinmetz H, Sitzer M, Lindhoff-Last E. Phosphatidylserine IgG and beta-2-glycoprotein I IgA antibodies may be a risk factor for ischaemic stroke. *Rheumatology (Oxford)*. 2005;44(9):1161-5.
28. Salobir B, Sabovic M, Hojnik M, Cucnik S, Kveder T. Anti-beta 2-glycoprotein I antibodies of IgM class are linked to thrombotic disorders in young women without autoimmune disease. *Immunobiology*. 2007;212(3):193-9.
29. Arvieux J, Regnault V, Hachulla E, Darnige L, Roussel B, Bensa JC. Heterogeneity and immunochemical properties of anti-beta2-gpl autoantibodies. *Thromb Haemost*. 1998;80(3):393-8.
30. Iverson GM, Victoria EJ, Marquis DM. Anti-beta2 glycoprotein I (beta2GPI) autoantibodies recognize an epitope on the first domain of beta2GPI. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(26):15542-6.
31. Iverson GM, 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 Autoimmun*. 2006;27(4):266-71.
32. Matsuura E, Kobayashi K, Koike T, Shoenfeld Y. Autoantibody-mediated atherosclerosis. *Autoimmun Rev*. 2002;1(6):348-53.
33. Shen L. Receptors for IgA in phagocytic cells. *Immunol Res*. 1992;11(3-4):273-82.
34. Blank M, Shoenfeld Y. Beta2-glycoprotein I, infections, antiphospholipid syndrome and therapeutic considerations. *Clin Immunol*. 2004;112(2):190-9.