

Danielle Martins de Medeiros Hisano

Imunização contra influenza pandêmica em síndrome antifosfolípide primária:
gatilho para trombose e produção de autoanticorpos?

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas
Área de concentração: Processos Imunes e
Infecciosos
Orientadora: Profa. Dra. Eloísa Silva Dutra de
Oliveira Bonfá

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Hisano, Danielle Martins de Medeiros

Imunização contra influenza pandêmica em síndrome antifosfolípide primária :
gatilho para trombose e produção de autoanticorpos? / Danielle Martins de Medeiros
Hisano. -- São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Processos Imunes e Infeciosos.
Orientadora: Eloísa Silva Dutra de Oliveira Bonfá.

Descritores: 1.Síndrome antifosfolípide 2.Influenza humana 3.Vírus da influenza
A subtipo H1N1 4.Imunização 5.Anticorpos antifosfolípídeos

USP/FM/DBD-506/15

*Aos meus pais, Carlos e Iolanda,
e ao meu esposo, Douglas,
pelo incentivo, amor, dedicação e apoio incondicional.*

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e ao programa de Ciências Médicas, por fornecerem as condições para a realização deste trabalho, e aos professores e funcionários dessa instituição, por todo o suporte necessário.

À minha orientadora, Profa. Dra. Eloísa Silva Dutra de Oliveira Bonfá, pela oportunidade, paciência, ajuda, compreensão, sabedoria e por compartilhar comigo seus conhecimentos e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Clóvis Artur Almeida da Silva, pela paciência, insistência, sabedoria e sobretudo por acreditar que seria possível.

Ao Dr. Jozélio Freire de Carvalho, pela amizade e inspiração.

À Dra. Vilma dos Santos Trindade Viana, Cleonice Bueno e todos os funcionários do LIM-17 pela ajuda para a realização deste trabalho.

À Dra. Ana Cristina de Medeiros Ribeiro, minha eterna preceptora, pela luz, orientação da estatística e disponibilidade sempre que necessário.

À equipe responsável pelo ambulatório de SAF, especialmente Dra. Maria Teresa Correia Caleiro e Dra. Luciana Parente Costa Seguro, pela parceria.

Aos pacientes e controles pela confiança e por concordarem em participar dessa pesquisa.

Ao meu esposo, Douglas, pelo companheirismo, apoio, incentivo, atenção, conselhos e amor dedicados sempre.

Aos meus pais, Carlos e Iolanda, pelo amor, educação e incentivo em cada nova etapa da minha vida.

À minha família, pelo amparo, carinho e dedicação.

À Deus, pelos desafios, conquistas e tropeços que me fazem aprender e amadurecer a cada dia.

*“Só se pode alcançar um grande êxito
quando nos mantemos fiéis a nós mesmos”*

Friedrich Nietzsche

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3^a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. Introdução	1
2. Objetivos	5
3. Materiais e Métodos	6
3.1 Pacientes e controles	6
3.2 Vacina	7
3.3 Avaliação clínica	8
3.4 Análise dos autoanticorpos séricos	9
3.5 Análise estatística	10
4. Resultados	12
5. Discussão	19
6. Conclusões	22
7. Referências	23

LISTA DE ABREVIATURAS

aCL – anticardiolipina

AIT – ataque isquêmico transitório

Ann A5 – anti-anexina A5

aPL – antifosfolípides

aPS – antifosfatidilserina

aPT – antiprotrombina

AVC – acidente vascular cerebral

β 2GPI - β 2-glicoproteína I

DFC – difosfato de cloroquina

ELISA – ensaio imunoenzimático

GMT – média geométrica dos títulos

H1N1 – vírus influenza A subtipo H1N1

HIV – vírus da imunodeficiência humana

IAM – infarto agudo do miocárdio

LAC – anticoagulante lúpico

LES – lúpus eritematoso sistêmico

SAF – síndrome antifosfolípide

SAFP – síndrome antifosfolípide primária

TEP – tromboembolismo pulmonar

TVP – trombose venosa profunda

TLR – *toll-like receptors*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características demográficas e clínico-laboratoriais dos pacientes com SAF primária antes da entrada no estudo	15
Tabela 2. Frequência de anticorpos aPL em pacientes com SAF primária e controles saudáveis pré e pós vacinação	15
Tabela 3. Títulos de anticorpos aPL em pacientes com SAF primária positivos para os diferentes anticorpos específicos pré e pós vacinação	16
Tabela 4. Títulos de anticorpos aPL em controles saudáveis positivos para os diferentes anticorpos específicos pré e pós vacinação	16
Tabela 5. Frequência de anticorpos aPL na SAF primária em pacientes com e sem difosfato de cloroquina pré e pós vacinação	17
Tabela 6. Comparação da frequência de anticorpos aPL na SAF primária com e sem difosfato de cloroquina antes da vacinação	17
Tabela 7. Comparação da frequência de anticorpos aPL na SAF primária com e sem difosfato de cloroquina 3 semanas após vacinação	18
Tabela 8. Comparação da frequência de anticorpos aPL na SAF primária com e sem difosfato de cloroquina 6 meses após vacinação	18

RESUMO

Hisano DMM. *Imunização contra influenza pandêmica em síndrome antifosfolípide primária: gatilho para trombose e produção de autoanticorpos?* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Os pacientes com doenças reumáticas crônicas exibem um risco aumentado de contrair infecções. Consequentemente, sua vacinação é indispensável. Há relatos da produção de anticorpos antifosfolípides e trombozes após infecções e vacinação nesta população, exceto em síndrome antifosfolípide (SAF) primária. O objetivo principal deste estudo foi avaliar a curto e longo prazos um painel de anticorpos antifosfolípides após a vacinação contra influenza A/H1N1 (sem adjuvante) em SAF primária e controles saudáveis. Quarenta e cinco pacientes com SAF primária e 33 controles saudáveis foram imunizados e prospectivamente avaliados antes da vacinação e 3 semanas e 6 meses após a vacinação. Os anticorpos antifosfolípides foram determinados por ensaio imunoenzimático (ELISA) e incluíram os anticorpos IgG e IgM a seguir: anticardiolipina (aCL), anti-beta2glicoproteína I (anti-β2GPI), anti-anexina V, anti-fosfatidilserina e anti-protrombina. O anticorpo anti-Sm foi igualmente determinado por ELISA e o anti-DNA dupla hélice, por imunofluorescência indireta. Avaliamos clinicamente a ocorrência de trombozes arterial e venosa. A frequência pré-vacinação de pelo menos um anticorpo antifosfolípide foi significativamente maior nos pacientes com SAF primária comparados aos controles (58% vs 24%, $p = 0,0052$). A frequência global de anticorpos antifosfolípides pré-vacinação e 03 semanas e 06 meses após a vacinação permaneceu inalterada tanto em pacientes ($p = 0,89$) como em controles ($p = 0,83$). A frequência de cada anticorpo específico nos dois grupos permaneceu estável nas três avaliações ($p > 0,05$). A frequência de cada anticorpo manteve-se invariável nos pacientes tratados com cloroquina ($p > 0,05$). Em 3 semanas, 2 pacientes com SAF primária desenvolveram um anticorpo antifosfolípide novo porém transitório (aCL IgG e IgM), enquanto que em 6 meses novos anticorpos foram observados em 6 pacientes e nenhum apresentou altos títulos. Anti-Sm e anti-DNA dupla hélice foram negativos e nenhuma nova trombose arterial ou venosa foi observada durante o estudo. Este foi o primeiro estudo a demonstrar que a vacina contra influenza pandêmica em pacientes com SAF primária não induz trombozes e uma produção significativa de anticorpos antifosfolípides a curto e longo prazos. (ClinicalTrials.gov, #NCT01151644).

Descritores: síndrome antifosfolípide; influenza humana; vírus da influenza A subtipo H1N1; imunização; anticorpos antifosfolípidos.

ABSTRACT

Hisano DMM. *Pandemic influenza immunization in primary antiphospholipid syndrome: a trigger to thrombosis and autoantibody production?* [Dissertation]. Sao Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

Chronic rheumatic disease patients exhibit an increased risk for infections. Therefore, vaccination is imperative. Antiphospholipid antibodies (aPL) and thrombosis triggering after infections and vaccination in this population were reported, except for primary antiphospholipid syndrome (PAPS). Study's main objective was short and long-term evaluation of a panel of antiphospholipid autoantibodies following pandemic influenza A/H1N1 non-adjuvant vaccine in primary antiphospholipid syndrome patients and healthy controls. Forty-five PAPS and 33 healthy controls were immunized with A/H1N1 pandemic influenza vaccine. They were prospectively assessed at pre-vaccination, 3 weeks and 6 months after vaccination. aPL autoantibodies were determined by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and included IgG/IgM: anti-cardiolipin (aCL), anti- β 2GPI; anti-annexin V, anti-phosphatidyl serine and anti-prothrombin antibodies. Anti-Sm was determined by ELISA and anti-dsDNA by indirect immunofluorescence. Arterial and venous thrombosis were also clinically assessed. Pre-vaccination frequency of at least one aPL antibody was significantly higher in PAPS patients *versus* controls (58% vs. 24%, $p=0.0052$). The overall frequencies of aPL antibody at pre-vaccination, 3 weeks and 6 months after immunization remained unchanged in patients ($p=0.89$) and controls ($p=0.83$). The frequency of each antibody specificity for patients and controls remained stable in the three evaluated period ($p>0.05$). The frequency of each antibody kept invariable in PAPS patients under chloroquine treatment ($p>0.05$). At 3 weeks, 2 PAPS patients developed a new but transient aPL antibody (aCL IgG and IgM), whereas at 6 months new aPL antibodies were observed in 6 PAPS patients and none had high titer. Anti-Sm and anti-dsDNA autoantibodies were uniformly negative and no new arterial or venous thrombosis were observed throughout the study. This was the first study to demonstrate that pandemic influenza vaccine in PAPS patients does not trigger short and long-term thrombosis or a significant production of aPL related antibodies. (ClinicalTrials.gov, #NCT01151644).

Descriptors: antiphospholipid syndrome; influenza, human; influenza A virus, H1N1 subtype; immunization; antibodies, antiphospholipid.

1. Introdução

Os pacientes com doenças reumáticas crônicas apresentam um risco aumentado de contrair infecções, sejam adultos ou crianças, e este risco pode estar relacionado a diversos fatores como o efeito imunossupressor da própria doença de base ou das medicações utilizadas em seu tratamento, levando a um aumento da morbimortalidade. Portanto, a vacinação é uma medida preventiva essencial para pacientes com doenças reumáticas^{1,2}, incluindo a síndrome antifosfolípide (SAF).

A síndrome antifosfolípide é uma doença autoimune sistêmica caracterizada por trombozes recorrentes, que podem afetar ambas as circulações venosa e arterial. Essa síndrome pode se apresentar ainda como complicações obstétricas concomitantes ou isoladas, que incluem abortos, perdas fetais e prematuridade com aspectos bem definidos, na presença de anticorpos antifosfolípidos (aPL) persistentemente positivos. Outras manifestações associadas ao SAF incluem valvulopatia, livedo reticular, plaquetopenia, nefropatia e manifestações neurológicas^{3,4}.

Os anticorpos antifosfolípidos são um grupo heterogêneo de autoanticorpos dirigidos contra os fosfolípidos, as suas proteínas de ligação e os complexos fosfolípide-proteína. Seu principal alvo antigênico é a β 2-glicoproteína I (β 2GPI), que promove a ligação dos anticorpos às células-alvo como células endoteliais, monócitos, plaquetas e trofoblastos, levando a

modificações pró-trombóticas e pró-inflamatórias. Há vários mecanismos propostos na patogênese do SAF como: aumento do estresse oxidativo, aumento da expressão e ativação do fator tecidual, ativação de receptores de superfície celular, ativação de complemento, aumento da expressão de *toll-like receptors* 7 e 8 (TLR7 e TLR8) e prejuízos ao sistema fibrinolítico⁵⁻⁷. A ocorrência de anticorpos aPL nem sempre está associada à doença clinicamente manifesta, podendo ser detectada inclusive em indivíduos aparentemente saudáveis, e sua prevalência pode aumentar com a idade⁸.

Na literatura, há relatos de casos e estudos sugerindo que tanto as vacinas como as infecções em si servem de gatilho para produção de anticorpos aPL e/ou trombose venosa e arterial, mesmo em indivíduos previamente saudáveis. A vacina recombinante contra hepatite B é um exemplo por ser capaz de levar à produção de forma transitória tanto de anticorpo anticardiolipina (aCL) como de anticorpo anti- β 2-glicoproteína I (anti- β 2GPI)⁹. Um outro exemplo é a vacina dupla adulto (contra difteria e tétano) que, aliada à positividade persistente de anticoagulante lúpico (LAC), culminou em trombose venosa profunda (TVP) e tromboembolismo pulmonar (TEP)¹⁰. Em relação aos agentes infecciosos, já foram associados à produção de anticorpos aPL diversos tipos de vírus como: vírus da imunodeficiência humana (HIV), hepatite C, Epstein-Barr, citomegalovírus, parvovírus B19, herpesvírus tipo 6 e vírus varicela-zoster¹¹⁻¹⁹. Da mesma forma, outros agentes infecciosos como *Mycobacterium leprae* e *Mycoplasma pneumoniae* foram implicados²⁰⁻²².

Especificamente quanto ao vírus influenza, alguns trabalhos sugerem que a vacinação contra influenza sazonal e/ou pandêmica (H1N1) leva à produção de autoanticorpos, incluindo anticorpos aPL, em doenças reumáticas autoimunes, particularmente em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES)²³⁻²⁸, todavia manifestação clínica de trombose foi descrita em apenas dois casos^{29,30}. Até o momento, não existem dados sobre a indução de anticorpos aPL e/ou novas tromboses em pacientes com SAF primária vacinados contra o vírus influenza.

Uma grande coorte realizada no Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo vacinou 1.668 pacientes com diversas doenças reumáticas autoimunes, incluindo pacientes com SAF primária, contra o vírus influenza A/H1N1 no ano de 2010 e mostrou altas taxas de soroproteção e soroconversão ao vírus e um aumento significativo na média geométrica dos títulos (GMT) nesta população específica, comparáveis àquelas observadas nos controles saudáveis³¹. O estudo limitou-se à avaliação de 21 dias após a vacinação com um enfoque global de todas as doenças. A avaliação do possível efeito da vacina na produção de autoanticorpos e a segurança em termos de complicações da doença de longo prazo não foi realizada na SAF.

Portanto, o objetivo deste estudo é a avaliação longitudinal de um painel de anticorpos antifosfolípidos em pacientes com SAF primária após a vacinação contra influenza pandêmica A/H1N1. Será avaliada também a

ocorrência de novos desfechos clínico relacionados com a síndrome e a produção de anticorpos marcadores de LES nesses pacientes.

2. Objetivos

- Avaliação longitudinal da produção de anticorpos antifosfolípidos em pacientes com SAF primária pré e pós vacinação contra influenza pandêmica A/H1N1.
- Determinar a ocorrência a longo prazo de trombozes e plaquetopenia após a vacinação contra influenza pandêmica A/H1N1.
- Avaliar se existe a produção de anticorpos específicos de LES induzida pela vacinação contra influenza pandêmica A/H1N1 nos pacientes com SAF primária.

3. Materiais e Métodos

Esse estudo selecionou 60 pacientes com SAF primária incluídos em uma grande coorte prospectiva (n = 1.668) de doenças reumáticas conduzida em um único centro em São Paulo, Brasil (Divisão de Reumatologia, Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo), entre Março e Abril de 2010, conforme referido anteriormente³¹. O grupo controle incluiu 33 indivíduos saudáveis. O protocolo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa e o trabalho, registrado no clinicaltrials.gov sob o número #NCT01151644.

3.1 Pacientes e controles

Todos os paciente ambulatoriais com diagnóstico de SAF primária (de acordo com os critérios de classificação de Sapporo¹⁵) foram inicialmente recrutados por carta para participar da campanha de saúde pública de vacinação contra influenza A/H1N1/2009 no centro de imunização do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. As amostras de sangue foram coletadas de cada participante imediatamente antes da vacinação e 3 semanas e 6 meses pós vacinação. Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido concordando em participar do estudo.

Os critérios de exclusão englobaram:

- Infecção prévia conhecida pela influenza pandêmica A/H1N1/2009;
- Reação anafilática aos componentes da vacina ou a ovos;
- Antecedente de síndrome de Guillain-Barré ou doenças desmielinizantes;
- Vacinação prévia com qualquer vacina de vírus vivo quatro semanas antes do estudo ou qualquer vacina inativada duas semanas antes do estudo;
- Transfusão sanguínea nos últimos seis meses;
- Doença febril aguda (38°C) no momento da vacinação;
- Hospitalização no período do estudo;
- Positividade de anticorpos relacionados ao LES na primeira avaliação;
- Falha em completar o protocolo e recusa em participar do estudo.

Sessenta pacientes com SAF foram recrutados entretanto 15 foram excluídos: 9 por falha em completar o protocolo, 4 por recusa em participar do estudo e 2 por positividade do anticorpo anti-Sm na primeira avaliação. Sendo assim, 45 pacientes completaram o estudo.

3.2 Vacina

A vacina contra influenza A/H1N1, uma vacina monovalente nova, de vírus inativado e fracionado, sem adjuvante, foi produzida pela Sanofi Pasteur em parceria com o Instituto Butantã (São Paulo/Brasil). A substância ativa era

um vírus influenza inativado e fracionado, contendo antígenos equivalentes à cepa análoga à cepa A/Califórnia/7/2009 (H1N1) (NYMC X-179A), um dos vírus vacinais recombinantes recomendados pela Organização Mundial de Saúde³².

A vacina foi preparada em ovos embrionados de galinha com a mesma técnica padrão utilizada para a produção das vacinas trivalentes sazonais inativadas e foi apresentada em fracos multidose de 5mL, com timerosal adicionado como conservante (45µg em cada dose de 0,5mL).

Todos os indivíduos foram imunizados com a vacina contra influenza pandêmica 2009 (A/Califórnia/7/2009/Instituto Butantã/Sanofi Pasteur). Uma única dose intramuscular (0,5mL), contendo 15µg de antígenos hemaglutinina, específico para o vírus H1N1 A/Califórnia/7/2009, foi administrada.

3.3 Avaliação clínica

Na primeira avaliação, foram coletados os dados demográficos acerca de sexo e idade dos pacientes e controles e feita a revisão de prontuários para caracterização da SAF primária (anticorpos prévios, eventos prévios de trombozes arterial e venosa, eventos obstétricos e plaquetopenia) e avaliação quanto às medicações em uso (anticoagulante oral, antiagregante plaquetário e difosfato de cloroquina).

Os seguintes parâmetros clínicos foram avaliados prospectivamente após a vacinação nos pacientes com SAF primária: nova trombose venosa (trombose venosa profunda (TVP) documentada e/ou tromboembolismo pulmonar (TEP)), nova trombose arterial (acidente vascular encefálico (AVC) clinicamente documentado, ataque isquêmico transitório (AIT) ou infarto agudo do miocárdio (IAM)) e plaquetopenia (<100.000 plaquetas/mm³).

3.4 Análise dos autoanticorpos séricos

Os anticorpos antifosfolípides foram determinados por ensaio imunoenzimático (ELISA) e incluíram: anticorpos anticardiolipina (aCL) IgG e IgM e anti-beta2glicoproteína I (anti- β 2GPI) IgG e IgM (Inova Diagnostics, San Diego, CA, EUA), anti-anexina A5 (anti-Ann A5) IgG e IgM, anti-fosfatidilserina (aPS) IgG e IgM e anti-protrombina (aPT) IgG e IgM (Orgentec Diagnostica, Mainz, Alemanha). Os valores de cut-off para esses anticorpos antifosfolípides foram: ≥ 20 GPL/MPL U/mL para aCL IgG e IgM; ≥ 20 U/mL para anti- β 2GPI IgG e IgM; ≥ 8 U/mL para anti-anexina A5 IgG e IgM; ≥ 10 U/mL para anti-fosfatidilserina IgG e IgM e ≥ 10 U/mL para anti-protrombina IgG e IgM.

Anticorpos anti-Sm foram avaliados por ELISA (Inova Diagnostics, San Diego, CA, EUA, cut-off ≥ 40 U) e anti-DNA dupla hélice, por imunofluorescência indireta em *Crithidia luciliae*, utilizando kits comercialmente

disponíveis, seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante (Euroimmun AG, Alemanha, cut-off $\geq 1:10$).

3.5 Análise estatística

Este foi um estudo exploratório com amostra por conveniência, portanto o tamanho da amostra não foi estimado previamente, mas o poder das análises foi calculado no que diz respeito a positividade e títulos dos anticorpos.

Os resultados foram apresentados em mediana (variação) e média (desvio-padrão) para variáveis contínuas e em números (porcentagem) para variáveis categóricas. A análise estatística foi realizada no programa GraphPad InStat versão 2.0.

As variáveis contínuas foram analisadas pelo teste *t* de Student ou teste de Mann-Whitney para os diferentes grupos, quando apropriado, enquanto a análise de variância para medidas repetidas (*one-way* ANOVA) foi usada para medidas sequenciais.

As variáveis categóricas, como a frequência de positividade de autoanticorpos, foram comparadas pelo teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher para os diferentes grupos, quando apropriado, enquanto o teste de

McNemar foi utilizado para análises sequenciais no mesmo grupo. Em todos os testes estatísticos, o nível de significância foi de 5% ($p < 0,05$).

4. Resultados

A média de idade e a frequência de mulheres foi comparável nos pacientes com SAF primária e controles ($45,6 \pm 10,3$ vs. $41,0 \pm 10,4$ anos, $p = 0,06$; 76% vs. 76%, $p = 1,0$). Em relação aos eventos vasculares, 58% apresentaram trombozes venosas, 53% trombozes arteriais, 20% eventos obstétricos e 4% plaquetopenia. Quanto à positividade dos anticorpos aPL prévios que corroboraram para o diagnóstico, os pacientes apresentavam LAC ou aCL positivos de forma isolada em 42% e 29% respectivamente, e 29% dos pacientes eram duplamente positivos (LAC + aCL). À época do estudo, 84% dos pacientes utilizavam varfarina sódica, 33% difosfato de cloroquina, 11% antiagregante plaquetário (ácido acetilsalicílico em baixa dosagem) e 4% femprocumona (Tabela 1).

Na primeira avaliação, a frequência de pelo menos um anticorpo aPL foi significativamente maior nos pacientes comparados aos controles (58% vs. 24%, $p=0,0052$). A frequência global de anticorpos aPL pré-vacinação (26/58%), 03 semanas (24/53%) e 06 meses (25/56%) pós vacinação permaneceu praticamente inalterada em pacientes ($p=0,89$) e controles (8/24% vs. 7/21% vs. 6/18%, $p=0,83$).

As análises da frequência de cada anticorpo avaliado na SAF primária revelou que suas porcentagens pré-vacinação e após 3 semanas e 6 meses também foi comparável: aCL IgG (42%, 38% e 42%, $p=0,89$), aCL IgM (22%,

20% e 24%, $p=0,88$), anti- β 2GPI IgG (22%, 22% e 20%, $p=0,96$), anti- β 2GPI IgM (15%, 15% e 18%, $p=0,95$), anti-anexina A5 IgG (4,5%, 4,5% e 2,5%, $p=0,81$), anti-anexina A5 IgM (igualmente negativos), anti-fosfatidilserina IgG (38%, 35% e 38%, $p=0,97$), anti-fosfatidilserina IgM (15%, 13% e 13%, $p=0,94$), anti-protrombina IgG (20%, 15% e 18%, $p=0,86$) e anti-protrombina IgM (2,5%, 2,5% e 2,5%, $p=1,0$). O mesmo padrão foi observado no grupo controle ($p>0,05$) (Tabela 2).

As tabelas 3 e 4 incluem a mediana da avaliação dos títulos de anticorpos aPL em SAF primária e controles saudáveis, respectivamente, positivos para os diferentes anticorpos específicos antes da vacinação. Nenhuma diferença foi identificada na mediana dos títulos dos cinco anticorpos aPL IgG e IgM testados nos 3 períodos avaliados (pré-vacinação e em 3 semanas e 6 meses pós vacinação) tanto na SAF primária ($p>0,05$) (Tabela 3) como nos controles saudáveis ($p>0,05$) (Tabela 4).

Individualizando os grupos de pacientes com SAF primária com e sem tratamento com difosfato de cloroquina, não houve diferença na frequência dos anticorpos nas 3 avaliações consecutivas dentro de um mesmo grupo ($p>0,05$) (Tabela 5).

A comparação da frequência dos anticorpos aPL em cada período do estudo entre os grupos de pacientes com SAF com e sem tratamento com difosfato de cloroquina não revelou diferença significativa na pré vacinação e em 3 semanas e 6 meses pós vacinação ($p>0,05$) (Tabelas 6, 7 e 8).

A análise do poder do estudo revelou que, em todos os testes sequenciais realizados para frequências e títulos de anticorpos, o poder foi o baixo (<80%), exceto para as frequências de aCL IgM (88%, pré e 3 semanas após) e 99% (pré e 6 meses após)) e aPT IgG 99% (pré e 6 meses após).

Em 3 semanas, 2 pacientes com SAF primária desenvolveram anticorpos aPL novos porém transitórios (um aCL IgG e o outro aCL IgM, ambos em título baixo). O mesmo padrão transitório foi observado no grupo controle onde 2 indivíduos desenvolveram aCL IgM em título baixo em 3 semanas com posterior negatificação. Aos 6 meses, novos anticorpos aPL foram observados em 6 pacientes: 3 aCL IgM, 1 anti- β 2GPI IgM, 1 aPS IgG e 1 aPT IgG em títulos baixos. Por sua vez, no grupo controle, 2 indivíduos apresentaram positificação de aCL IgG: um em título baixo e o outro em título moderado aos 6 meses.

Anticorpos anti-Sm e anti-DNA dupla hélice foram consistentemente negativos nas três avaliações dos pacientes com SAF primária. Nenhum novo evento trombótico arterial ou venoso ocorreu durante o período do estudo e apenas um paciente apresentou plaquetopenia sustentada e assintomática durante o estudo (pré vacinação = 56 mil plaquetas/mm³, 3 semanas pós vacinação = 50 mil plaquetas/mm³ e 6 meses pós vacinação = 56 mil plaquetas/mm³).

Tabela 1. Características demográficas e clínico-laboratoriais dos pacientes com SAF primária antes da entrada no estudo

DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICO-LABORATORIAIS	SAFP (n = 45)
Idade (anos)	45,6±10,3
Sexo feminino, n (%)	34 (76%)
Tromboses venosas, n (%)	24 (58%)
Tromboses arteriais, n (%)	24 (53%)
Eventos obstétricos, n (%)	9 (20%)
Plaquetopenia, n (%)	4 (11%)
LAC isolado, n (%)	19 (42%)
aCL isolado, n (%)	13 (29%)
LAC + aCL, n (%)	13 (29%)

NOTA: LAC – anticoagulante lúpico, aCL – anticardiolipina.

Tabela 2. Frequência de anticorpos aPL em pacientes com SAF primária e controles saudáveis pré e pós vacinação

ANTICORPOS	SAFP (n = 45)				CONTROLES SAUDÁVEIS (n = 33)			
	antes	3S	6M	p	antes	3S	6M	p
aCL IgG	42	38	42	0,89	0	0	3	0,36
aCL IgM	22	20	24	0,88	6	9	9	0,87
anti-β2GPI IgG	22	22	20	0,96	3	3	0	0,60
anti-β2GPI IgM	15	15	18	0,95	6	6	6	1,0
anti-Ann A5 IgG	4,5	4,5	2,5	0,81	3	3	3	1,0
anti-Ann A5 IgM	0	0	0	-	0	0	0	-
aPS IgG	38	35	38	0,97	3	3	3	1,0
aPS IgM	15	13	13	0,94	6	6	6	1,0
aPT IgG	20	15	18	0,86	3	0	0	0,36
aPT IgM	2,5	2,5	2,5	1,0	3	0	0	0,36

NOTA: Os resultados são apresentados em porcentagem (%). SAFP – síndrome antifosfolípide primária, 3S – 3 semanas, 6M – 6 meses, aCL – anticardiolipina, anti-β2GPI – anti-beta2glicoproteína I, anti-Ann A5 – anti-anexina A5, aPS – anti-fosfatidilserina, aPT – anti-protrombina.

Tabela 3. Títulos de anticorpos aPL em pacientes com SAF primária positivos para os diferentes anticorpos específicos pré e pós vacinação

ANTICORPOS	SAF PRIMÁRIA				
	n	antes	3S	6M	p
aCL IgG	19	63 (20-159)	68 (17-158)	70 (24-159)	0,34
aCL IgM	10	31 (20-53)	25 (16-69)	31,5 (8-77)	0,28
anti-β2GPI IgG	10	42,5 (22-134)	44 (20-118)	52 (17-110)	0,61
anti-β2GPI IgM	7	36 (28-150)	40 (24-150)	36 (20-149)	0,07
anti-Ann A5 IgG	2	9 (8-10)	9 (8-10)	7,5 (7-8)	0,50
anti-Ann A5 IgM	0	-	-	-	-
aPS IgG	17	34 (10-194)	31 (7-178)	33 (8-156)	0,79
aPS IgM	7	25 (10-157)	23 (4-133)	22 (7-126)	0,19
aPT IgG	9	35 (10-100)	35 (8-102)	32 (8-97)	0,19
aPT IgM	1	13	12,5	15	-

NOTA: Os resultados são apresentados em mediana (variação). SAF – síndrome antifosfolípide, n – número, 3S – 3 semanas, 6M – 6 meses, aCL – anticardiolipina, anti-β2GPI – anti-beta2glicoproteína I, anti-Ann A5 – anti-anexina A5, aPS – anti-fosfatidilserina, aPT – anti-protrombina.

Tabela 4. Títulos de anticorpos aPL em controles saudáveis positivos para os diferentes anticorpos específicos pré e pós vacinação

ANTICORPOS	CONTROLES SAUDÁVEIS				
	n	antes	3S	6M	p
aCL IgG	0	-	-	-	-
aCL IgM	2	30,5 (24-37)	21 (16-26)	30,5 (23-38)	0,83
anti-β2GPI IgG	1	41,5	32,5	13	-
anti-β2GPI IgM	2	47 (37-57)	32 (29-35)	30,5 (26-35)	0,17
anti-Ann A5 IgG	1	8,5	11	10	-
anti-Ann A5 IgM	0	-	-	-	-
aPS IgG	1	11,5	15	17	-
aPS IgM	2	15,5 (13-18)	13,5 (12-15)	12,5 (12-13)	0,83
aPT IgG	1	11	5	7,5	-
aPT IgM	1	10	3	3	-

NOTA: Os resultados são apresentados em mediana (variação). n – número, 3S – 3 semanas, 6M – 6 meses, aCL – anticardiolipina, anti-β2GPI – anti-beta2glicoproteína I, anti-Ann A5 – anti-anexina V, aPS – anti-fosfatidilserina, aPT – anti-protrombina.

Tabela 5. Frequência de anticorpos aPL na SAF primária em pacientes com e sem difosfato de cloroquina pré e pós vacinação

ANTICORPOS	SAFP com DFC (n = 15)				SAFP sem DFC (n = 30)			
	Antes	3S	6M	p	antes	3S	6M	p
aCL IgG	53	47	53	0,92	37	33	37	0,95
aCL IgM	27	13	33	0,43	20	23	20	0,94
anti-β2GPI IgG	27	27	27	1,0	20	20	17	0,93
anti-β2GPI IgM	13	13	13	1,0	17	17	20	0,93
anti-Ann A5 IgG	0	0	0	-	7	7	3	0,81
anti-Ann A5 IgM	0	0	0	-	0	0	0	-
aPS IgG	53	47	47	0,92	30	30	33	0,95
aPS IgM	13	13	13	1,0	17	13	13	0,91
aPT IgG	20	13	20	0,86	20	17	17	0,93
aPT IgM	0	0	0	-	3	3	3	1,0

NOTA: Os resultados são apresentados em porcentagem (%). SAFP – síndrome antifosfolípide primária, DFC – difosfato de cloroquina, 3S – 3 semanas, 6M – 6 meses, aCL – anticardiolipina, anti-β2GPI – anti-beta2glicoproteína I, anti-Ann A5 – anti-anexina A5, aPS – anti-fosfatidilserina, aPT – anti-protrombina.

Tabela 6. Comparação da frequência de anticorpos aPL na SAF primária com e sem difosfato de cloroquina antes da vacinação

ANTICORPOS	SAF com DFC (n = 15)	SAF sem DFC (n = 30)	p
aCL IgG	53	37	0,29
aCL IgM	27	20	0,71
anti-β2GPI IgG	27	20	0,71
anti-β2GPI IgM	13	17	1,0
anti-Ann A5 IgG	0	7	0,55
anti-Ann A5 IgM	0	0	1,0
aPS IgG	53	30	0,13
aPS IgM	13	17	1,0
aPT IgG	20	20	1,0
aPT IgM	0	3	1,0

NOTA: Os resultados são apresentados em porcentagem (%). SAF – síndrome antifosfolípide, DFC – difosfato de cloroquina, n – número, aCL – anticardiolipina, anti-β2GPI – anti-beta2glicoproteína I, anti-Ann A5 – anti-anexina A5, aPS – anti-fosfatidilserina, aPT – anti-protrombina.

Tabela 7. Comparação da frequência de anticorpos aPL na SAF primária com e sem difosfato de cloroquina 3 semanas pós vacinação

ANTICORPOS	SAF com DFC (n = 15)	SAF sem DFC (n = 30)	p
aCL IgG	47	33	0,76
aCL IgM	13	23	0,70
anti-β2GPI IgG	27	20	0,71
anti-β2GPI IgM	13	17	1,0
anti-Ann A5 IgG	0	7	0,55
anti-Ann A5 IgM	0	0	1,0
aPS IgG	47	30	0,27
aPS IgM	13	13	1,0
aPT IgG	13	17	1,0
aPT IgM	0	3	1,0

NOTA: Os resultados são apresentados em porcentagem (%). SAF – síndrome antifosfolípide, DFC – difosfato de cloroquina, n – número, aCL – anticardiolipina, anti-β2GPI – anti-beta2glicoproteína I, anti-Ann A5 – anti-anexina A5, aPS – anti-fosfatidilserina, aPT – anti-protrombina.

Tabela 8. Comparação da frequência de anticorpos aPL na SAF primária com e sem difosfato de cloroquina 6 meses pós vacinação

ANTICORPOS	SAF com DFC (n = 15)	SAF sem DFC (n = 30)	p
aCL IgG	53	37	0,29
aCL IgM	33	20	0,46
anti-β2GPI IgG	27	17	0,45
anti-β2GPI IgM	13	20	0,70
anti-Ann A5 IgG	0	3	1,0
anti-Ann A5 IgM	0	0	1,0
aPS IgG	47	33	0,39
aPS IgM	13	13	1,0
aPT IgG	20	17	1,0
aPT IgM	0	3	1,0

NOTA: Os resultados são apresentados em porcentagem (%). SAF – síndrome antifosfolípide, DFC – difosfato de cloroquina, n – número, aCL – anticardiolipina, anti-β2GPI – anti-beta2glicoproteína I, anti-Ann A5 – anti-anexina A5, aPS – anti-fosfatidilserina, aPT – anti-protrombina.

5. Discussão

Pelo nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a demonstrar que a vacina contra influenza pandêmica em pacientes com SAF primária não serve de gatilho para trombozes ou uma produção significativa de anticorpos antifosfolípidos a curto e longo prazos.

As vantagens do presente estudo foram o formato prospectivo, incluindo avaliações a curto e longo prazos, e a avaliação simultânea de uma variedade de autoanticorpos. SAF secundária foi excluída, uma vez que a vacina contra influenza pode induzir anticorpos antifosfolípidos em pacientes lúpicos²³⁻²⁸. O uso da vacina sem adjuvante foi selecionado para evitar a síndrome inflamatória autoimune induzida por adjuvantes (ASIA)³³⁻³⁴. Entretanto, uma limitação do estudo foi o uso de uma amostra por conveniência pequena. Além disso, a avaliação de amostras de soro congelado impossibilitou a análise do anticoagulante lúpico.

Os agentes infecciosos e as vacinas podem estimular uma resposta autoimune em indivíduos geneticamente susceptíveis por diversos mecanismos, sobretudo através do mimetismo molecular entre as proteínas estranhas e as próprias do indivíduo³⁵⁻³⁷, particularmente as moléculas de β 2GPI, que são a base da patogênese do SAF^{5-7,37}. Outros mecanismos envolvidos são o aumento de células T auto-reativas e a ativação policlonal de

células B com potencial estímulo à produção de autoanticorpos patogênicos^{26,35}.

A vacinação contra influenza sazonal e pandêmica está associada à produção de anticorpos antifosfolípidos em pacientes lúpicos²³⁻²⁸, conforme referido anteriormente. Essa resposta é sobretudo transitória e mais frequentemente relacionada a títulos baixos e moderados de aCL IgG e/ou IgM^{23,24,26,28} e raramente de anti- β 2GPI²³, conforme observado neste estudo. A avaliação original de três outros anticorpos antifosfolípidos específicos revelou que uma nova resposta imune no período de 6 meses após vacinação a estes antígenos foi raramente observada em SAF primária.

É ainda relevante, que nos pacientes com SAF primária não foi observada a produção de anticorpos específicos de LES como o anticorpo anti-DNA dupla hélice. A segurança da vacina foi reforçada pela ausência de trombose venosa ou arterial durante todo o período do estudo nos pacientes com SAF primária, fato também relatado por outros autores em LES^{24,26}.

Além disso, este estudo evidenciou a presença de anticorpos antifosfolípidos antes e após a vacinação em indivíduos saudáveis, sem associação com trombose. Tais achados estão de acordo com os achados de Toplak *et al* que demonstram o surgimento de novos anticorpos aCL e anti- β 2GPI ou o aumento dos seus níveis em uma pequena porcentagem de indivíduos aparentemente saudáveis, sem eventos trombóticos detectados num seguimento de 6 meses após a vacina contra influenza sazonal³⁸. Da mesma

forma, foi demonstrado por Martinuc Porobic *et al* que a vacina recombinante contra hepatite B raramente induz o surgimento de aCL e anti- β 2GPI de caráter transitório em estudo conduzido com a participação de 85 indivíduos saudáveis⁹.

O uso de antimaláricos está indicado no tratamento de pacientes lúpicos com títulos moderados a altos de anticorpos aPL para redução do risco de trombose³⁹ e nos pacientes com SAF refratária⁴⁰ pelos seus efeitos na agregação plaquetária, na ligação dos fosfolípidos de membrana aos anticorpos, inibição de TLRs, na redução de citocinas inflamatórias e na formação de imunocomplexos⁴¹⁻⁴³. Broder e Putterman demonstraram que o uso de hidroxiquina foi associado a menor probabilidade de LAC e/ou aPL (incluindo a avaliação de aCL, anti- β 2GPI e antifosfatidilserina) persistentemente positivos em pacientes lúpicos⁴⁴. No nosso estudo, em pacientes exclusivamente com SAF primária, não confirmamos essa observação, pois a frequência dos diferentes anticorpos antifosfolípidos analisados foi similar em pacientes com e sem DFC. Estudos futuros serão realizados para avaliar parâmetros que possam justificar essa discrepância, como tempo de uso da droga, viés de indicação e diferença entre as doenças avaliadas.

Concluindo, a vacina contra influenza pandêmica 2009 A/H1N1 sem adjuvante mostrou ser segura e não induzir alterações significativas na produção e nos títulos dos anticorpos antifosfolípidos, bem como novas trombozes, e deve ser indicada aos pacientes com SAF primária.

6. Conclusões

- A vacinação contra influenza pandêmica A/H1N1 não induz uma produção significativa de anticorpos antifosfolípides em pacientes com SAF primária e controles saudáveis a curto e longo prazos.
- A vacinação contra influenza pandêmica A/H1N1 não estimula a ocorrência de novas trombozes e plaquetopenia a curto e longo prazos.
- A vacinação contra influenza pandêmica A/H1N1 não induz a produção de anticorpos específicos de LES nos pacientes com SAF primária.

7. Referências

1. Silva CAA, Terreri MTRA, Aikawa NE, Carvalho JF, Pileggi GCS, Ferriani VPL et al. Vaccination practice in children with rheumatic disease. *Revista Brasileira de Reumatologia*. 2010; 50(4): 351-61.
2. Van Assen S, Agmon-Levin N, Elkayama O, Cervera MF, Doran MF, Dougados M et al. EULAR recommendations for vaccination in adult patients with autoimmune inflammatory rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis*. 2011; 70(6): 414-22.
3. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum*. 1999; 42(7): 1309–11.
4. 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(2): 295-306.
5. Giannakopoulos B, Krilis S. The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *NEJM*. 2013; 368(11): 1033-44.
6. Harper BE, Wills R, Pierangeli SS. Pathophysiological mechanisms in antiphospholipid syndrome. *Int J Clin Rheumatol*. 2011; 6(2): 157-71.
7. Krone ka, Allen KL, McGrae KR. Impaired fibrinolysis in the antiphospholipid syndrome. *Curr Rheumatol Rep*. 2010; 12(1): 53-7.

8. Biggioggero M, Meroni PL. The geoepidemiology of the antiphospholipid antibody syndrome. *Autoimmun Rev.* 2010; 9(5): A299-A304.
9. Martinuc Porobic J, Avcin T, Bozic B, Kuhar M, Cucnik S, Zupancic M et al. Anti-phospholipid antibodies following vaccination with recombinant hepatitis B vaccine. *Clin Exp Immunol.* 2005; 142(2): 377-80.
10. Meyer A, Rotman-Pikielny P, Natour A, Levy Y. Antiphospholipid syndrome following a diphtheria-tetanus vaccination: coincidence vs casuality. *Isr Med Assoc J.* 2010; 12(10): 638-9.
11. Bloom EJ, Abrams DI, Rodgers G. Lupus anticoagulant in the acquired immunodeficiency syndrome. *JAMA.* 1986; 256(4): 491-3.
12. Stimmler MM, Quismorio FP Jr, McGehee WG, Boylen T, Sharma OP. Anticardiolipin antibodies in acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Int Med.* 1989; 149(8): 1833-5.
13. Puri V, Bookman A, Yeo E, Cameron R, Heathcote EJ. Antiphospholipid antibody syndrome associated with hepatitis C infection. *J Rheumatol.* 1999; 26(2): 509-10.
14. Prieto J, Yuste JR, Beloqui O, Civeira MP, Riezu J, Aguirre B et al. Anticardiolipin antibodies in chronic hepatitis C: implication of hepatitis C virus as the cause of the antiphospholipid syndrome. *Hepatology.* 1996; 23(2): 199-204.
15. Van Hal S, Senanayake S, Hardiman R. Splenic infarction due to transient antiphospholipid antibodies induced by acute Epstein-Barr virus infection. *J Clin Virol.* 2005; 32(3): 245-7.

16. Labarca JA, Rabagliati RM, Radrigan FJ, Rojas PP, Perez CM, Ferrés MV et al. Antiphospholipid syndrome associated with cytomegalovirus infection: case report and review. *Clin Infect Dis*. 1997; 24(2): 197-200.
17. Asano Y, Sarukawa M, Idezuki T, Harada S, Kaji K, Nakasu I et al. Multiple small pulmonary emboli associated with transient antiphospholipid syndrome in human Parvovirus B19 infection. *Clin Rheumatol*. 2006; 25(4): 585-7.
18. Toyoshima M, Maegaki Y, Yotsumata K, Takei S, Kawano Y. Antiphospholipid syndrome associated with human herpesvirus-6 infection. *Pediatr Neurol*. 2007; 37(6): 449-51.
19. Tezcan ME, Teksut TK, Onal AB, Ozturk MA. Reactivated varicela zoster vírus may cause peripheral arterial thrombosis. *J Rheumatol*. 2010; 37(8): 1785-6.
20. Rugman FP, Pinn G, Palmer MF, Waite M, Hay CRM. Anticardiolipin antibodies in leptospirosis. *J Clin Pathol*. 1991; 44(6): 517-9.
21. Ribeiro SLE, Pereira HLA, Silva NS, Souza AWS, Sato EI. Anti- β 2-glycoprotein I antibodies are highly prevalente in a large number of brazilian leprosy patients. *Acta Reumatol Port*. 2011; 36(1): 30-7.
22. Ascer E, Marques M, Gildlund M. *M pneumoniae* infection, pulmonary thromboembolism and antiphospholipid antibodies. *BMJ Case Rep*. 2011; doi 10.1136/bcr.12.2010.3561, publicado on line em 20 Abril 2011.
23. Perdan-Pirkmajer K, Thallinger GG, Snoj N, Cucnik S, Zigon P, Kveder T et al. Autoimmune response following influenza vaccination in patients with autoimmune inflammatory rheumatic disease. *Lupus*. 2012; 21(2): 175-83.

24. Abu-Shakra M, Press J, Sukenik S, Buskila D. Influenza virus vaccination of patients with SLE: effects on generation of autoantibodies. *Clin Rheumatol*. 2002; 21(5): 369-72.
25. Tarjan P, Sipka S, Lakos G, Kiss E, Ujj G, Szegedi G. Influenza vaccination and the production of antiphospholipid antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol*. 2006; 35(3): 241-3.
26. Lu CC, Wang YC, Lai JH, Lee TSH, Lin HT, Chang DM. A/H1N1 influenza vaccination in patients with systemic lupus erythematosus: safety and immunity. *Vaccine*. 2011; 29(3): 444-50.
27. Crowe SR, Merrill JT, Vista ES, Dedeker AB, Thompson DM, Stewart S et al. Influenza vaccination responses in human systemic lupus erythematosus: impact of clinical and demographic features. *Arthritis Rheum*. 2011; 63(8): 2396-406.
28. Vista ES, Crowe SR, Thompson LF, Air GM, Robertson JM, Guthridge JM, James JA. Influenza vaccination can induce new onset anticardiolipins but not beta2glycoprotein antibodies among patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2012; 21(2): 168-74.
29. Vainer-Mossel ED, Mekori YA, Mor A. Ischemic stroke in a patient with lupus following influenza vaccination: a questionable association. *Isr Med Assoc J*. 2009; 11(3): 186-7.
30. Lin YP, Li TH, Chen WH. Ischaemic stroke and influenza A H1N1 vaccination: a case report. *Arch Med Sci*. 2011; 7(2): 345-8.
31. Saad CGS, Borba EF, Aikawa NE, Silva CA, Pereira RMR, Calich AL et al. Immunogenicity and safety of the 2009 non-adjuvanted influenza

- A/H1N1 vaccine in a large cohort of autoimmune rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis*. 2011; 70(6): 1068-73.
32. World Health Organization. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2010 influenza season (southern hemisphere winter). *Weekly Epidemiological Record*. 2009; 84(41): 421-32.
 33. Shoenfeld Y, Agmon-Levin N. 'ASIA' - autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants. *J Autoimmun*. 2011; 36(1): 4-8.
 34. Blank M, Israeli E, Shoenfeld Y. When APS (Hughes syndrome) met the autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA). *Lupus*. 2012; 21(7): 711-4.
 35. Agmon-Levin N, Kivity S, Shoenfeld Y. Influenza vaccine and autoimmunity [editorial]. *Isr Med Assoc J*. 2009; 11(3): 183-5.
 36. Dimitrijevic L, Zivkovic I, Stojanovic M, Petrusic V, Zivancevic-Simonovic S. Vaccine model of antiphospholipid syndrome induced by tetanus vaccine. *Lupus*. 2012; 21(2): 195-202.
 37. Cruz-Tapias P, Blank M, Anaya JM, Shoenfeld Y. Infections and vaccines in the etiology of antiphospholipid syndrome. *Curr Opin Rheumatol*. 2012; 24(4): 389-93.
 38. Toplak N, Kveder T, Trampus-Bakija A, Subelj V, Cucnik S, Avcin T. Autoimmune response following annual influenza vaccination in 92 apparently healthy adults. *Autoimmun Rev*. 2008; 8(2): 134-8.
 39. Ruiz-Irastoza G, Egurbide MV, Pijoan JI, Garmendia M, Villar I, Martinez-Berriotxoa A et al. Effect of antimalarials on thrombosis and survival in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2006; 15(9): 577-83.

40. Scoble T, Wijetilleka S, Khamashta MA. Management of refractory antiphospholipid syndrome. *Autoimmun Rev.* 2011; 10(11): 669-73.
41. Rand JH, Wu XX, Quin AS, Chen PP, Hathcock JJ, Taatjes. Hydroxychloroquine directly reduces the binding of antiphospholipid antibody-2glycoprotein I complexes to phospholipid bilayers. *Blood.* 2008; 112(5): 1687-95.
42. Rand JH, Wu XX, Quin AS, Ashton AW, Chen PP, Hathcock JJ et al. Hydroxychloroquine protects the annexin A5 anticoagulant shield from disruption by antiphospholipid antibodies: evidence for a novel effect for an old antimalarial drug. *Blood.* 2010; 115(11): 2292-9.
43. Petri M. Use of hydroxychloroquine to prevent thrombosis in systemic lupus erythematosus and in antiphospholipid antibody-positive patients. *Curr Rheumatol Rep.* 2011; 13(1): 77-80.
44. Broder A, Putterman C. Hydroxychloroquine use is associated with lower odds of persistently positive antiphospholipid antibodies and/or lupus anticoagulant in SLE. *J Rheumatol.* 2013; 40(1): 30-3.