



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

Sabrina da Silva Saraiva Mangolin

Estudo do papel da hidroxicloroquina na imunomodulação e no controle da hipercoagulabilidade em pacientes com diagnóstico de síndrome antifosfolípide primária.

CAMPINAS
2019

SABRINA DA SILVA SARAIVA MANGOLIN

Estudo do papel da hidroxicloroquina na imunomodulação e no controle da hipercoagulabilidade em pacientes com diagnóstico de síndrome antifosfolípide primária.

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de doutora em Ciências, na área de concentração Clínica Médica.

ORIENTADORA: PROF^a DR^a FERNANDA LOUREIRO DE ANDRADE ORSI

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA SABRINA DA SILVA SARAIVA MANGOLIN E ORIENTADA PELA PROF. DRA. FERNANDA LOUREIRO DE ANDRADE ORSI.

CAMPINAS

2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Saraiva Mangolin, Sabrina da Silva, 1984-
Sa71e Estudo do papel da hidroxicloroquina na imunomodulação e no controle da hipercoagulabilidade em pacientes com diagnóstico de síndrome antifosfolípide primária / Sabrina da Silva Saraiva Mangolin. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Fernanda Loureiro de Andrade Orsi.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Síndrome antifosfolípide. 2. Hidroxicloroquina. 3. Imunomodulação. 4. Trombofilia. I. Orsi, Fernanda Loureiro de Andrade, 1975-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Study of the role of hydroxichloroquine in immunomodulation and control of hypercoagulability in patients diagnosed with primary antiphospholipid syndrome

Palavras-chave em inglês:

Antiphospholipid syndrome
Hydroxychloroquine
Immunomodulation
Thrombophilia

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Fernanda Loureiro de Andrade Orsi [Orientador]
Joyce Maria Annichino Bizzacchi
Simone Appenzeller
Dayse Maria Lourenço
Danieli Castro Oliveira de Andrade

Data de defesa: 06-08-2019

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a) -
ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-7835-7486> -
Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7777169195626601>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

SABRINA DA SILVA SARAIVA MANGOLIN

ORIENTADOR: PROF^a. DR^a. FERNANDA LOUREIRO DE ANDRADE ORSI

MEMBROS:

1. PROF^a. DR^a. FERNANDA LOUREIRO DE ANDRADE ORSI

2. PROF^a. DR^a. JOYCE MARIA ANNICHINO BIZZACCHI

3. PROF^a. DR^a. SIMONE APPENZELLER

4. PROF^a. DR^a. DAYSE MARIA LOURENÇO

5. PROF^a. DR^a. DANIELI CASTRO OLIVEIRA DE ANDRADE

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no
SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 06/08/2019

Dedico esse trabalho a todos os pacientes que convivem com as repercussões da síndrome antifosfolípide, muitas vezes limitantes. Espero poder contribuir para um futuro mais promissor e com uma melhor qualidade de vida.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer as pessoas que ajudaram, direta ou indiretamente, na realização desse trabalho.

Inicialmente, gostaria de agradecer a Prof^a Dr^a Joyce Bizzacchi pela receptividade no Ambulatório de Hemostasia e pela oportunidade dada a mim de ingressar na vida científica. Sua competência e brilhantismo fazem da hemostasia da UNICAMP um local de orgulho.

Especial gratidão a minha orientadora Prof^a Dr^a Fernanda Orsi, que com tanta maestria me possibilitou o desenvolvimento do raciocínio científico. Sinto-me privilegiada de ter tido a honra de sua convivência neste período tão transformador, com exemplos de condutas pessoal e profissional extremamente enriquecedores. Muito obrigada pela paciência, pela orientação maternalmente firme, pelos ensinamentos e por me inspirar a buscar o crescimento – técnico e humano. Levo a missão de tentar exercer o conceito de docência com o qual você me agradeceu.

Agradeço à carinhosa assistência da Dr^a Marina Colela e do Prof^o Dr^o Erich de Paula, que muito colaboraram durante a elaboração desse projeto e na produção científica dele oriunda.

Obrigada, também, à Prof^a Dr^a Simone Appenzeller, por suas relevantes contribuições especialmente no início do projeto e no exame de qualificação.

À Dr^a Bruna Mazetto, de importância vital em todas as fases do projeto. Obrigada pela padronização de técnicas, pelos ensinamentos de bancada, pelas discussões sempre proveitosas, pelas considerações durante todos esses anos e, principalmente, pela amizade. Nossa parceria tornou essa jornada muito mais agradável.

Ao enfermeiro Marcos dos Santos (Hemocentro/UNICAMP) que exerce, de maneira tão competente, ética e humana, seu ofício. Um exemplo de profissional que dignifica a área da saúde e nos provoca a ser cada vez melhores. Muito obrigada pelo suporte fundamental e despretensioso: você foi imprescindível para a concretização desse projeto.

Às biólogistas Ana Leda e Irene, pela disponibilidade e pelo apoio no laboratório de Citometria de Fluxo (Hemocentro/UNICAMP).

Agradeço à equipe de assistência social do Hemocentro/UNICAMP, que possibilitou uma integração extremamente eficiente das demandas dos pacientes ao serviço de saúde.

À aluna e nutricionista Thays Rodrigues, pelo acompanhamento multidisciplinar dos nossos pacientes e pelo impacto dessa abordagem ampla na qualidade de vida deles.

Às alunas Fernanda Talge, Laís Quinteiro, Ingrid Brito e Karina Lins, pelo apoio na realização de alguns procedimentos de bancada.

Aos pacientes que participaram deste estudo, minha sincera gratidão.

Gratidão também ao Prof^o Dr^o José Salvador e ao colega Dr^o Alessandro Clayton da Cruz (Hospital Santa Marcelina), por tornarem a hematologia cada vez mais fascinante.

Gostaria de agradecer também a FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Por fim, mas de maneira essencial, gostaria de agradecer a minha família. Meus avós, d. Neurides e sr. César e d. Alzira e sr. Seraphim pelo incentivo ao estudo desde sempre e pelo amor. Aos meus pais, Elenice e Celso, pelo apoio incondicional, pelos meus maiores -e melhores- exemplos e por todas as abdições em prol da nossa educação. Aos meus irmãos, Celso Jr. e Gian, pela parceria, pela fidelidade e por todo o incentivo. Ao meu marido Fernando, pela compreensão da minha ausência em nossa casa e pela generosidade em dividir o tempo, que dele era por direito, com esse projeto. Tudo tem mais sentido com vocês!

RESUMO

A síndrome antifosfolípide (SAF) é uma doença autoimune pró-trombótica caracterizada pela ocorrência de trombose ou complicações gestacionais associadas à presença de anticorpos antifosfolípidos. Estes autoanticorpos têm como alvo principal proteínas plasmáticas, especialmente a beta2-glicoproteína I (β 2GPI). Apesar de o tratamento atual estar baseado na terapia anticoagulante para profilaxia secundária dos eventos trombóticos, tratamentos complementares para o controle da resposta imune e manifestações da doença vem sendo discutidos. Nesse contexto, o uso de hidroxycloroquina (HCQ) pode ser um tratamento alternativo para a SAF primária com trombose se confirmada a capacidade da droga em reduzir o risco trombótico conferido pela doença. Nesta tese, nós investigamos se a HCQ afeta a resposta imune, a coagulação e o metabolismo bioquímico na SAF primária com trombose.

Pacientes com SAF primária em anticoagulação oral foram selecionados para o uso de HCQ na dose diária de 400mg por 6 meses. Após a suspensão da HCQ e um período de *wash out* de 6 meses, os mesmos pacientes foram acompanhados por mais 6 meses. Foram analisadas amostras de sangue coletadas no início do estudo e a cada 6 meses através de ensaios bioquímicos e de citometria de fluxo.

Vinte e sete pacientes foram incluídos, com idade média de 44 anos; 78% eram do sexo feminino, 44% apresentavam hipertensão arterial sistêmica, 44% dislipidemia, 7% diabetes mellitus, 77% apresentaram trombose em sítio venoso, 30% em sítio arterial e 33% apresentaram trombozes recorrentes. A tripla positividade de anticorpos foi detectada em 37% dos pacientes. A contagem de linfócitos diminuiu durante o uso da HCQ (média de variação de $-318/\text{mm}^3$; 95%CI -438 a -198), mas não sofreu alteração durante o período sem uso de HCQ. As células T CD8⁺ e CD4⁺ apresentaram diminuição da contagem durante o tratamento e permaneceram sem alterações durante o período sem tratamento. Já a contagem de linfócitos TREG (FoxP3⁺) aumentou durante o tratamento com a HCQ (variação média de 0.2U; 95%CI 0 a 0.4) e diminuiu no período sem tratamento com a medicação (variação média de -0.6U ; 95%CI -0.9 a -0.1). Níveis de glicemia sérica e da lipoproteína de baixa densidade (LDL) diminuíram durante o uso da HCQ (7% e 12% de diminuição, respectivamente) e não sofreram alteração no período sem o uso da HCQ. Em relação

aos parâmetros de coagulação estudados, não observamos alterações significativas nos níveis de D-dímero, na expressão de FT em monócitos e de FT em plaquetas.

Concluimos que a HCQ pode reduzir a quantidade de linfócitos T citotóxicos circulantes, aumentar a quantidade de linfócitos TREG e diminuir os níveis de LDL-colesterol e da glicemia em pacientes com SAF primária, sem, entretanto, alterar substancialmente parâmetros da coagulação. É possível que a redução dos níveis de LDL-colesterol contribuía para diminuir o risco trombótico na SAF primária, entretanto esta hipótese ainda precisa ser confirmada. Os resultados dessa tese podem encorajar a realização de estudos randomizados com o objetivo de avaliar se o uso de HCQ reduz a ocorrência de eventos trombóticos na SAF primária.

Palavras chaves: Síndrome antifosfolípide, hidroxicloroquina, imunomodulação, trombofilia

ABSTRACT

Antiphospholipid syndrome (APS) is a pro-thrombotic autoimmune disease characterized by the occurrence of thrombosis or gestational complications associated with the presence of antiphospholipid antibodies. These autoantibodies target mainly plasma proteins, in particular beta2-glycoprotein I (β 2GPI). The current treatment is based on secondary prophylaxis of thrombotic events with anticoagulant therapy. However, it is possible that treatments that alter the immune response have a role in controlling the manifestations of the disease. In this context, the use of hydroxychloroquine (HCQ) has been discussed in the medical literature as a complementary treatment to oral anticoagulation in cases of APS. HCQ may be an alternative treatment for primary APS with thrombosis if the ability of the drug to reduce the thrombotic risk conferred by the disease is confirmed. In this thesis, we investigated whether HCQ affects the immune response, coagulation and biochemical metabolism in primary APS with thrombosis.

HCQ at 400mg/day was given to anticoagulated thrombotic APS patients for 6 months. After HCQ withdrawal and a wash-out period of 6 months, the same patients were followed for further 6 months. Blood samples taken at baseline and at the end of each 6-months follow-up period were analyzed employing flow cytometry and biochemical assays.

Twenty-seven patients were included, with a mean age of 44 years; 78% were females, 44% had systemic arterial hypertension, 44% dyslipidemia, 7% diabetes mellitus, 77% had thrombosis in a venous site, 30% had an arterial site, and 33% had a recurrence of thrombosis. Triple antibody positivity was detected in 37% of patients. The lymphocyte count decreased during the use of HCQ (mean variation of -318 mm³, 95% CI -438 to -198), but did not change during the period without HCQ use. CD8 + and CD4 + T cells showed decreased counts during treatment and remained unchanged during the untreated period. The TREG (FoxP3 +) lymphocyte count increased during treatment with HCQ (mean variation of 0.2U, 95% CI 0 to 0.4) and decreased in the period without treatment with the medication (mean variation of -0.6U, 95% CI -0.9 to -0.1). Serum glycemia and low density lipoprotein (LDL) levels decreased during HCQ use (7% and 12% respectively) and did not change significantly in the period without the use of HCQ. Regarding the coagulation parameters studied, we did not observe significant changes in D-dimer, at monocyte-related tissue factor and in platelet-related tissue factor levels.

We conclude that HCQ can reduce the amount of circulating cytotoxic T lymphocytes, increase the amount of TREG lymphocytes, and decrease LDL-cholesterol and glycemia levels in patients with primary APS, without, however, substantially modifying coagulation parameters. It is possible that the reduction of LDL-cholesterol levels contributed to decrease the thrombotic risk in primary APS. The results of this thesis may encourage randomized studies to evaluate whether the use of HCQ reduces the occurrence of thrombotic events in primary APS.

Keywords: Antiphospholipid syndrome, hydroxychloroquine, immunomodulation, thrombophilia

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1	Este quadro descreve os critérios clínicos e laboratoriais necessários para o diagnóstico de SAF.....	19
Quadro 2	Definição dos perfis de risco trombótico para pacientes com diagnóstico de SAF.....	20
Figura 1	Representação do novo modelo da cascata de coagulação.....	22
Figura 2	Mecanismos patogênicos da SAF.....	23
Figura 3	Mecanismos de controle da autoimunidade.....	25
Figura 4	Esquema representando seguimento clínico-laboratorial do estudo.....	28
Figura 5	Estratégia de análise utilizada para identificar a população de linfócitos T CD4+.....	31
Figura 6	Estratégia de análise utilizada para identificar a população de linfócitos T CD8+.....	31
Figura 7	Estratégia de análise utilizada para identificar a população de linfócitos NK.....	32
Figura 8	Estratégia de análise utilizada para identificar a população de linfócitos B.....	32
Figura 9	Estratégia de análise utilizada para identificar a população de linfócitos TREG.....	32
Figura 10	Estratégia de análise utilizada para marcação do FT em plaquetas.....	33
Figura 11	Estratégia de análise utilizada para marcação do FT em monócitos.....	33
Figura 12	Estratégias da análise estatística.....	34
Figura 13	Fluxograma do estudo com seleção dos pacientes e critérios para exclusão.....	35
Figura 14	Variação da presença do anticorpo anticardiolipina IgG pré e pós tratamento com hidroxicloroquina.....	41
Figura 15	Variação da presença do Anticorpo anti- β 2GPI pré e pós tratamento com hidroxicloroquina.....	41
Figura 16	Tempo em faixa terapêutica (TTR) nos 2 períodos em estudo.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características demográficas e comorbidades dos pacientes na data de inclusão do estudo.....	36
Tabela 2	Características clínicas associadas a SAF na data de inclusão do estudo.....	37
Tabela 3	Dados laboratoriais de exames de hematologia e exames bioquímicos na data de inclusão do estudo.....	38
Tabela 4	Efeitos da hidroxicloroquina nos parâmetros imunológicos.....	40
Tabela 5	Efeitos da HCQ nos parâmetros hematológicos para controle de toxicidade hematológica.....	43
Tabela 6	Efeitos da hidroxicloroquina nos parâmetros da hemostasia.....	44
Tabela 7	Efeitos da hidroxicloroquina nos parâmetros bioquímicos.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SAF	Síndrome Antifosfolípide
β2GPI	Beta-glicoproteína I
LES	Lupus eritematoso sistêmico
TEV	Tromboembolismo venoso
FvW	Fator de von Willebrand
F	Fator
TFPI	Inibidor da via do fator tecidual
EPCR	Receptor endotelial da proteína C
t-PA	Ativador de plasminogênio tecidual
μ-PA	Ativador de plasminogênio uroquinase
PAI-1	Inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
APC	Célula apresentadora de antígeno
Th	Célula T efetora
TREG	Célula T reguladora
IL	Interleucina
RNI	Relação normatizada internacional
HCQ	Hidroxicloroquina
pH	Potencial hidrogeniônico
GP	Glicoproteína
NK	Célula <i>Natural Killer</i>
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
mg	Miligrama
HMG	Hemograma
GJ	Glicemia de jejum
HbA1c	Hemoglobina glicada
Cr	Creatinina
U	Uréia
Prot/crea	Relação proteína/creatinina urinária
AST	Aspartato aminotransferase
ALT	Transaminase glutâmico-oxalacética
Ddim	Dímero-D

C3	Fração C3 do complemento
C4	Fração C4 do complemento
CD	<i>Cluster</i> de diferenciação
FoxP3	<i>Forkhead box</i> P3
ELISA	<i>Enzima-linked immunosorbent assay</i>
USA	<i>United States of America</i>
μl	Microlitro
ml	Mililitro
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
LPS	Lipopolissacarídeo
°C	Grau centígrado
FT	Fator tecidual
DP	Desvio padrão
IC	Intervalo de confiança
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
FAN	Fator antinuclear
dl	Decilitro
IMC	Índice de massa corpórea
kg	Quilograma
m ²	Metro quadrado
LAC	Anticoagulante lúpico
aCL	Anticorpo anticardiolipina
AVC	Acidente vascular cerebral
TEP	Tromboembolismo pulmonar
Hb	Hemoglobina
mm ³	Milímetro cúbico
HDL	Lipoproteína de alta densidade
TTP	Tempo em faixa terapêutica
AR	Artrite reumatoide
DM	Diabetes melitus

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	18
1.1.Aspectos gerais da síndrome antifosfolípide.....	18
1.2.Condição pró-trombótica na síndrome antifosfolípide.....	20
1.2.1. Fisiologia da hemostasia	20
1.2.2. Trombose e síndrome antifosfolípide	22
1.3.Imunopatogênese da síndrome antifosfolípide	23
1.4.Tratamento da síndrome antifosfolípide com trombose	25
1.5. Papel do tratamento imunomodulador na síndrome antifosfolípide	26
2. HIPÓTESE	27
3. OBJETIVOS	27
4. METODOLOGIA	28
4.1. Desenho do estudo	28
4.2. Seleção dos participantes do estudo	29
4.3. Avaliação clínica e tratamento dos pacientes	29
4.4. Desfechos do estudo	30
4.4.1.Dosagem do dímero-D e complemento (C3 e C4)	30
4.4.2. Dosagem dos marcadores de risco cardiovascular e hemograma	30
4.4.3. Quantificação das diferentes populações linfocitárias por citometria de fluxo	30
4.4.4. Quantificação da expressão de fator tecidual em plaquetas e monócitos	32
4.5. Análise estatística	33
5. RESULTADOS	33
5.1. População estudada	34
5.1.1. Características demográficas e comorbidades dos pacientes na inclusão do estudo	35
5.1.2. Características clínicas associadas a SAF na inclusão do estudo.....	36
5.1.3. Dados laboratoriais hematológicos e bioquímicos na inclusão do estudo	38
5.2. Comparação dos resultados entre os períodos sem e com tratamento com hidroxicloroquina	39
5.2.1. Efeito da HCQ no perfil imunológico	39

5.2.2. Efeito da HCQ nos parâmetros hematológicos	42
5.2.3. Efeito da HCQ no perfil hemostático	43
5.2.4. Efeito da hidroxiclороquina nos parâmetros bioquímicos	45
6.DISSCUSSÃO	46
7.CONCLUSÃO	53
8.REFERÊNCIAS	55

1.INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais da síndrome antifosfolípide

A síndrome antifosfolípide (SAF) é uma condição pró-trombótica, adquirida, que se caracteriza clinicamente pela ocorrência de trombooses ou complicações gestacionais (1). Ocorre devido à produção de autoanticorpos, chamados anticorpos antifosfolípidos, que atuam contra proteínas que se ligam aos fosfolípidos de membranas celulares, como plaquetas, monócitos e células endoteliais (2). A proteína alvo principal desses anticorpos é a beta2-glicoproteína I (β 2GPI) (2).

O diagnóstico da SAF baseia-se na detecção de pelo menos um critério clínico e um critério laboratorial (3, 4), descritos no quadro 1. A SAF é classificada como secundária, principalmente a doenças autoimunes como o lúpus eritematoso sistêmico (LES), ou pode ser primária, quando não há outra doença imune associada.

O padrão de presença dos anticorpos antifosfolípidos e a clínica do paciente sugerem que haja pelo menos dois perfis de risco trombótico. Pacientes com alto risco seriam os com trombooses recorrentes, concomitância de trombooses arterial e venosa, concomitância de morbidade obstétrica e trombose, tripla positividade dos anticorpos e associação com LES (5). Pacientes com baixo risco seriam os com trombose venosa profunda única, associada a um fator precipitante, anticorpo anticardiolipina ou anti- β 2GPI isoladamente positivos (5) (Quadro 2).

Quadro 1: Este quadro descreve os critérios clínicos e laboratoriais necessários para o diagnóstico de SAF (3).

Critério Clínico (pelo menos 1)	Critério Laboratorial (pelo menos 1)
Trombose vascular • Tromboembolismo venoso (TEV); • Trombose arterial; • Trombose da microcirculação. Morbidade obstétrica • Óbito fetal $\geq$ 10 semanas, feto morfológicamente normal; • Parto prematuro antes de 34 semanas de gestação causado por pré-eclampsia, eclampsia ou insuficiência placentária; • Abortos de repetição (≥ 3 abortos antes de 10 semanas de gestação), sem outra causa identificada.	Positividade de pelo menos 1 dos 3 testes; em 2 ocasiões distintas, com 12 semanas de intervalo entre os testes • Anticoagulante lúpico; • Anticardiolipina IgM ou IgG, em título médio ou alto (i.é. > 40 GPL ou MPL); • Anticorpo anti- $\beta 2$GPI (IgM ou IgG $>$ percentil 99).

Quadro 2: Definição dos perfis de risco trombótico para pacientes com diagnóstico de SAF (5).

	Alto Risco	Baixo Risco
Critérios Clínicos	Tromboses recorrentes, concomitância de trombozes arterial e venosa, concomitância de morbidade obstétrica e trombose.	Trombose venosa profunda única, associada a um fator precipitante.
Critérios laboratoriais	Anticoagulante lúpico positivo, tripla positividade dos anticorpos, associação com LES.	Anticorpo anticardiolipina ou anti- β 2GPI isoladamente positivos.

1.2. Condição pró-trombótica na síndrome antifosfolípide

1.2.1. Fisiologia da hemostasia

A hemostasia é o processo fisiológico responsável pela manutenção do fluxo sanguíneo, evitando complicações hemorrágicas e trombóticas (6). A hemostasia é dividida em 3 etapas: hemostasia primária, coagulação e fibrinólise. A hemostasia primária é caracterizada pela formação do trombo plaquetário através da interação entre a camada média da parede vascular, as plaquetas e o fator de von Willebrand (FvW) (6). A coagulação (hemostasia secundária) é uma cascata de reações enzimáticas que culminam na geração de grandes quantidades de trombina e consolidação do trombo inicialmente formado pelas plaquetas. A coagulação pode ser dividida em duas fases: iniciação e amplificação. A fase de iniciação ocorre quando o fator tecidual (FT), expresso nas células endoteliais ativadas, forma um complexo com o fator (F) VII ativado que ativa o FX e gera pequenas quantidades de trombina. Na fase de amplificação, essas pequenas quantidades de trombina ativam o FVIII e o FV. O FVIIIa promove a formação do complexo tenase (FIX-FVIIIa), que ativa o FX. O FXa liga-se ao FVa formando o complexo protrombinase, que leva à produção de

grandes quantidades de trombina. Por fim, a trombina promove a conversão do fibrinogênio em fibrina e a consolidação do trombo (7). A trombina também é responsável pela ativação do sistema anticoagulante natural, promovendo um controle das fases de iniciação e amplificação. A trombina ativa o inibidor da via do fator tecidual (TFPI), que controla a fase de iniciação da coagulação. Além disso, a trombina liga-se com a trombomodulina e com o receptor endotelial da proteína C (EPCR) para formar um complexo que promove a conversão da proteína C em proteína C ativada. A proteína C ativada une-se a proteína S para então inativar o FVa e o FVIIIa (8).

A fibrinólise, última etapa do processo de hemostasia, promove a dissolução do trombo de fibrina. O processo de fibrinólise é iniciado pela liberação de ativador de plasminogênio tecidual (t-PA) pelas células endoteliais e de ativador de plasminogênio-uroquinase (u-PA) pelos monócitos. Ambos os ativadores levam à conversão de plasminogênio em plasmina e são inibidos pelo inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 (PAI-1). Desta forma, é estabelecido pelo processo fibrinolítico o equilíbrio entre condições pró-coagulantes e pró-hemorragicas (9)(Figura 1).

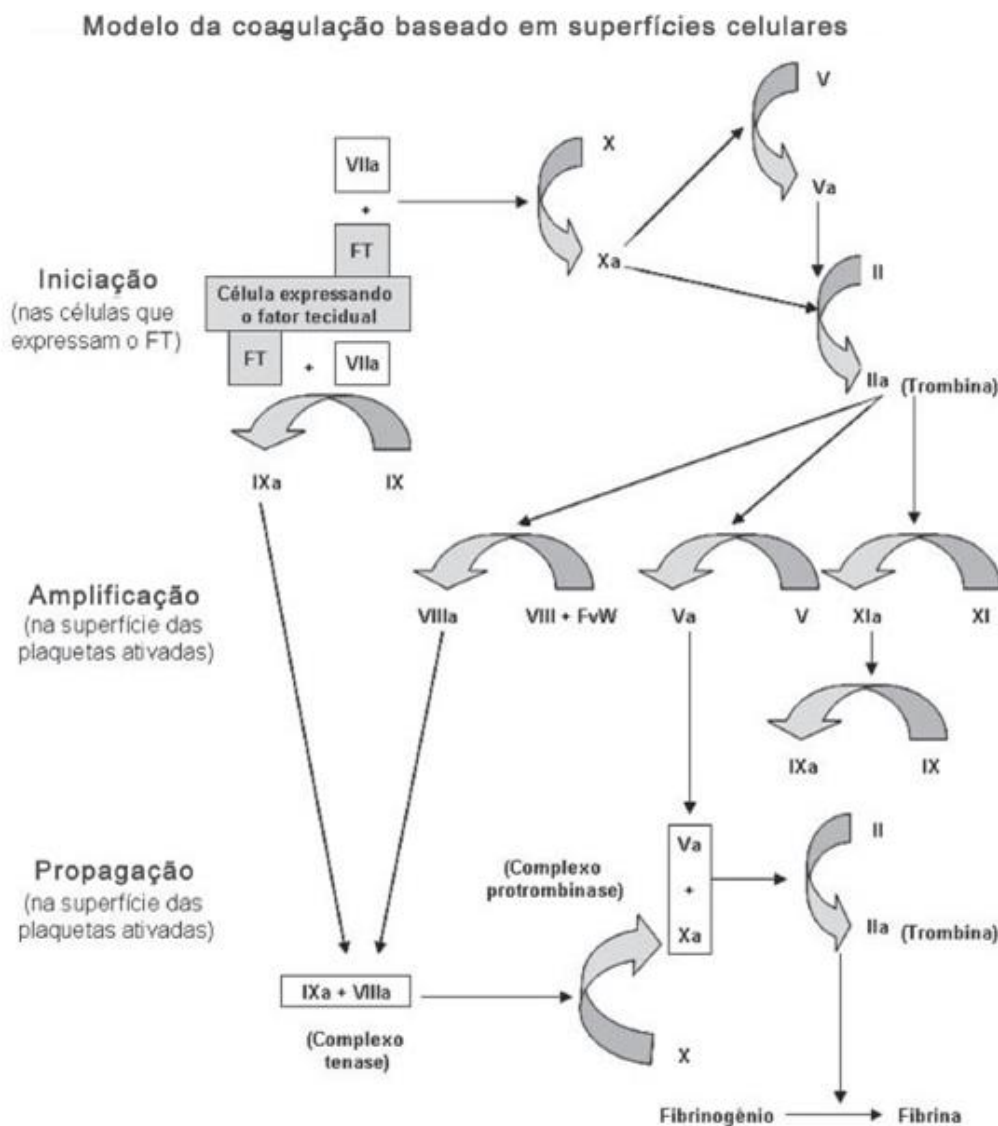


Figura 1- Representação do novo modelo da cascata de coagulação (10).

1.2.2. Trombose e síndrome antifosfolípide

Na SAF, a formação de trombos pode ocorrer indistintamente em qualquer veia, artéria ou capilar do corpo humano, atingindo diferentes órgãos ou tecidos (11). A fisiopatologia da formação desses trombos não está bem elucidada, mas provavelmente há hiperestímulo à coagulação pela ação dos anticorpos antifosfolípides (12). Em particular, acredita-se que anticorpos anti-β2GPI tenham importância fundamental no desenvolvimento da trombose e outras características clínicas da SAF. A β2GPI é uma glicoproteína plasmática que liga vários elementos carregados negativamente, incluindo fosfolípides, lipoproteínas, plaquetas ativadas e

células endoteliais ativadas (13). Supõe-se que os anticorpos antifosfolípides, ou o complexo formado entre os anticorpos e a β 2GPI aderida à superfície lipídica da membrana celular, possam levar à expressão de proteínas de adesão e do FT em plaquetas, monócitos e células endoteliais (14, 15, 16). Os anticorpos antifosfolípides interferem na cascata de coagulação ao promoverem a ativação da via do FT e a inibição dos anticoagulantes naturais e da fibrinólise, levando, assim, a um estado pró-coagulante (17). Células endoteliais ativadas parecem perpetuar o estado pró-trombótico na SAF (7) (Figura 2). Outro possível mecanismo imunopatológico seria a ligação dos anticorpos anti- β 2GPI a lipoproteínas de baixa densidade (LDL) através da β 2GPI aderida a estas, o que pode favorecer a fagocitose do LDL pelos macrófagos e o desenvolvimento de aterosclerose (18).

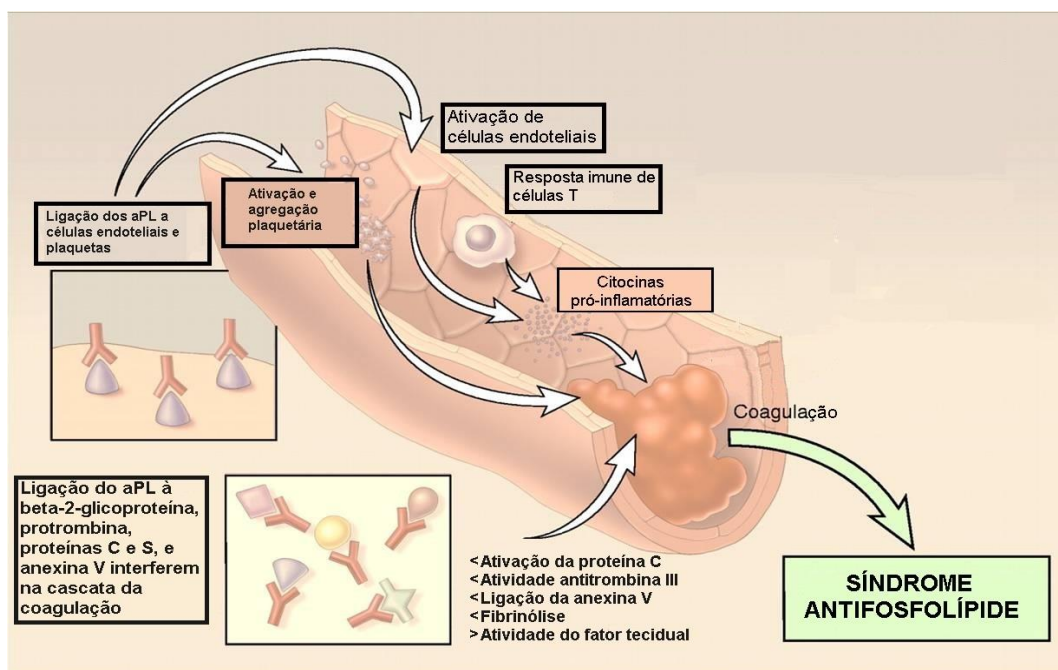


Figura 2- Mecanismos patogênicos da SAF – adaptado de John G. Hanly, JAMC, 2003 (17).

1.3. Imunopatogênese da síndrome antifosfolípide

A maturação dos linfócitos T helper CD4+ acontece no timo, após exposição a citocinas ou antígenos específicos. As células T diferenciadas migram do timo como células T *naïve* para os órgãos linfóides secundários. Uma vez na periferia, citocinas específicas liberadas pelas células apresentadoras de antígenos (APC) promovem ativação ou inibição desses linfócitos, o que resulta na diferenciação de

subpopulações de células T efectoras (Th1, Th2 e Th17) e de linfócitos T reguladores (TREG) (19) (Figura 3). As células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ (TREG) são linfócitos primordialmente envolvidos na manutenção da autotolerância e prevenção da autoimunidade (20). As TREG podem inibir as células T efectoras e as APC através da supressão da via dependente da exposição celular, pela liberação da granzima e porfirina ou, ainda, através de citocinas imunossupressoras como a interleucina (IL)10 e IL-35 (20).

Em condições fisiológicas, mecanismos de imunotolerância central impedem que ocorra a proliferação de células T estimuladas por autoantígenos. Entretanto, em alguns indivíduos, células T autoreativas escapam desse mecanismo regulatório imune e tornam-se ativadas e proliferantes, o que leva ao desenvolvimento de doenças autoimunes (19). Os mecanismos que levam à perda da imunotolerância e produção de autoanticorpos não são completamente conhecidos, entretanto dois mecanismos são descritos: a apresentação de autodeterminantes crípticos e a ação das TREG.

Dos inúmeros peptídeos definidos pelas sequências de aminoácidos do autoantígeno, uma pequena proporção é apresentada às células T pelas APC como parte do processamento antigênico e apresentação de antígeno. Estes peptídeos são representantes dos autoantígenos e denominados autodeterminantes dominantes, enquanto os peptídeos remanescentes, que não foram eficientemente apresentados pelas APC e estão normalmente escondidos do sistema imune, são chamados de autodeterminantes crípticos. O reconhecimento das células T dos autodeterminantes dominantes nas APC determina deleção no timo ou inativação periférica. Por outro lado, células T específicas para os autodeterminantes crípticos são componentes do repertório normal dessas células, mas sem contato com peptídeos antigênicos na periferia. Essas células T podem se tornar ativadas e autoagressivas se houver a apresentação prévia, em alta concentração, de autodeterminantes crípticos (21). Esse conceito representa a principal hipótese para a patogênese de doenças autoimunes.

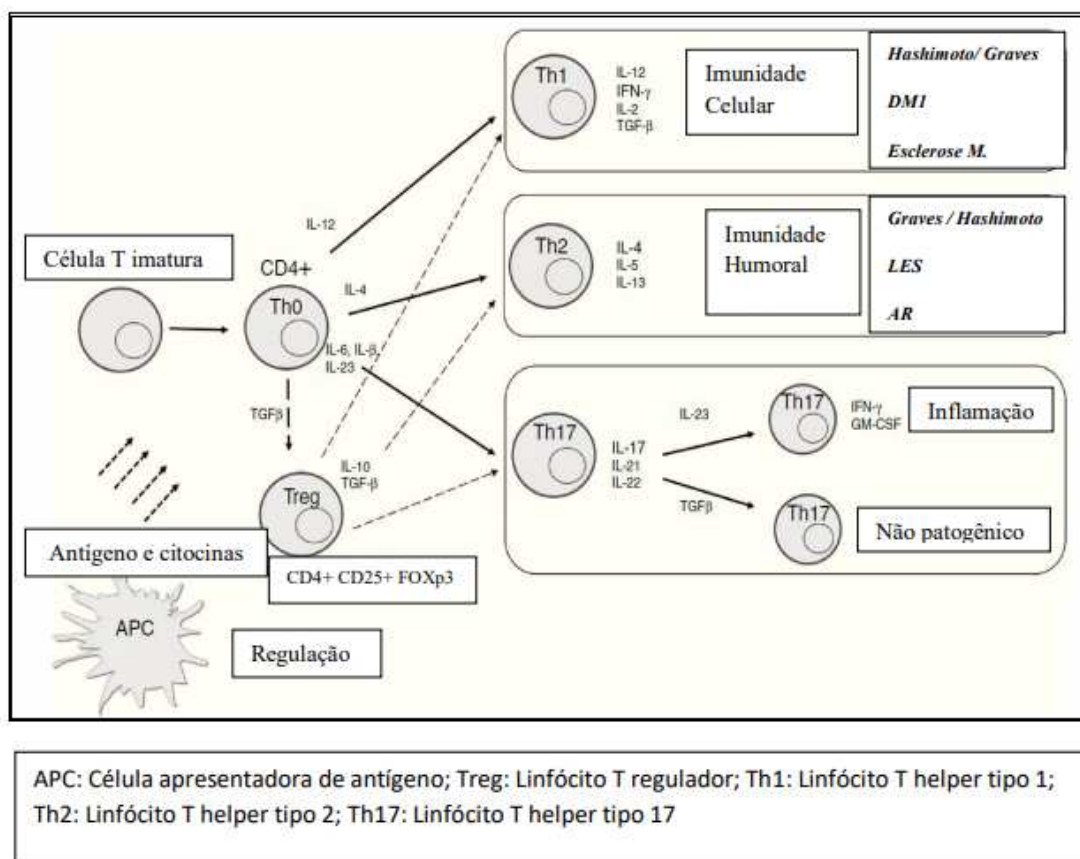


Figura 3. Mecanismos de controle da autoimunidade (22).

Na SAF, ambos os mecanismos de perda de imunotolerância já foram sugeridos. Estudos laboratoriais demonstraram que anticorpos antifosfolípides são direcionados principalmente contra o epítipo p276—290 da proteína β2GPI, um autodeterminante críptico. Esse peptídeo é apresentado ao linfócito T CD4+ por APC. O linfócito T CD4+ subsequentemente ativa o linfócito B, que produziria anticorpos específicos anti-β2GPI (23,24). Além disso, a disfunção das TREG também foi relatada na SAF. Um estudo clínico recente demonstrou que pacientes com SAF apresentam níveis diminuídos de IL-10, citocina produzida pelas TREG, quando comparados com controles (25).

1.4. Tratamento da síndrome antifosfolípide com trombose

Pacientes com SAF e antecedentes trombóticos são tratados com terapia anticoagulante oral definitiva, em particular com anticoagulantes do tipo antagonistas da vitamina K (AVK) e alvo terapêutico da anticoagulação de RNI entre 2,0 – 3,0 (26, 27). Esta orientação terapêutica vem da observação de que a taxa de recorrência de

eventos trombóticos em pacientes com SAF está em torno de 5 a 16% (27), sendo a descontinuidade da terapia anticoagulante a principal causa de recorrência.

Entretanto, em mais de 5% dos casos, o tratamento anticoagulante pode não ser suficiente para prevenir a recidiva da trombose (28). Nesse contexto, terapias complementares à anticoagulação convencional podem constituir tratamentos de interesse (29). O atual entendimento dos mecanismos imunopatológicos envolvidos nas trombozes mediadas pela SAF amplia as possibilidades de associação do tratamento imunomodulador ao tratamento antitrombótico (30).

1.5. Papel do tratamento imunomodulador na síndrome antifosfolípide

Hidroxicloroquina (HCQ) é uma droga antimalárica que apresenta efeito no controle de doenças autoimunes. Os efeitos imunomoduladores da HCQ incluem: aumento do pH nos vacúolos intracelulares dos fagócitos com interferência no processo de apresentação do antígeno, inibição do reconhecimento de antígenos pelos linfócitos T e B, e inibição da via de sinalização dos receptores “TOLL-like”(31).

Sugere-se que a HCQ possua, ainda, efeitos antitrombóticos. Em modelos murinos, a HCQ diminuiu o tamanho e o tempo de estabilidade do trombo de maneira dose-dependente e inibiu a expressão do receptor plaquetário GPIIb/IIIa (29). Há evidências de que a HCQ promova a inibição da agregação plaquetária, induzida pelo ácido araquidônico e pelo colágeno (29). Na SAF, demonstrou-se que a HCQ reverte a ligação do complexo antifosfolípide - β 2GPI com as bicamadas de fosfolípide das membranas celulares, podendo atuar como imunomodulador nesta condição (32).

Historicamente, a HCQ já foi usada como agente profilático contra trombose venosa profunda e embolia pulmonar após cirurgia de quadril (33). Em pacientes com LES, o uso da HCQ está associado a menor risco de complicações da doença e menor risco trombótico. Estudos populacionais mostraram que a HCQ reduz em cerca de 70% o risco de trombozes arteriais e venosas nos pacientes com LES (34, 35), o que sugere que a droga tem efeitos antitrombóticos. Entretanto, esse possível efeito antitrombótico permanece controverso, uma vez que alguns estudos populacionais em LES não confirmaram que o uso crônico de HCQ reduz a incidência de trombose nos pacientes (36). O provável efeito protetor da HCQ contra trombose nos pacientes

com LES pode ser derivado do efeito da droga em controlar a atividade do LES, os danos associados à doença e promover a diminuição dos níveis de colesterol (37).

Nos casos de SAF primária, a eficácia da HCQ nas prevenções primária e secundária de trombozes não está estabelecida. Embora dois *guidelines* para o tratamento da SAF sugiram a possibilidade de uso da HCQ em situações de maior gravidade, o nível de evidência clínica que sustenta essa sugestão é baixo (32,38). Há apenas um estudo clínico, recente, não randomizado, que demonstrou que o uso da HCQ diminui o risco de recidiva da trombose em paciente com SAF (39). Esse achado, entretanto, não foi confirmado em estudos subsequentes (40,41).

Em conclusão, a HCQ, associada à anticoagulação convencional, pode ter impacto favorável no tratamento dos pacientes com SAF primária e trombose. Porém, há a necessidade de evidências clínicas adicionais que apoiem a decisão pelo uso desta medicação no tratamento da SAF primária.

2. HIPÓTESE

HCQ é uma medicação acessível e já utilizada com sucesso no controle da resposta imune e do risco trombótico dos pacientes com LES. Na SAF primária, o uso de HCQ é sugerido como tratamento complementar à anticoagulação oral, principalmente em casos mais graves da doença. Acredita-se que a ação imunomoduladora da HCQ possa intervir na patogênese da SAF, inibindo a atividade dos anticorpos antifosfolípidos e otimizando o tratamento anticoagulante.

Entretanto, o potencial da HCQ em levar a imunomodulação e ao controle do estado de hipercoagulabilidade em pacientes com SAF primária não está estabelecido. Há poucos dados em literatura que avaliam o papel da HCQ no tratamento da SAF primária, e, portanto, sua aplicabilidade clínica é ainda controversa.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo é avaliar o efeito do uso da HCQ como terapia complementar à anticoagulação no perfil imunológico e hemostático de pacientes com SAF primária.

Objetivos específicos listados abaixo foram definidos para avaliação nos pacientes ao longo do tratamento.

1. Avaliação do perfil imunológico pela quantificação de linfócitos T, B, NK e TREG.
2. Determinação do valor circulante de dímero-D e da expressão do FT nos monócitos e plaquetas, como marcadores de coagulação.
3. Avaliação dos fatores de risco cardiovascular através da dosagem dos perfis lipídico e glicêmico.

4. METODOLOGIA

4.1. Desenho do estudo

Trata-se de um estudo prospectivo e intervencionista em que os mesmos pacientes foram acompanhados durante um período de 6 meses de exposição ao tratamento com HCQ e durante um período de 6 meses sem esse tratamento. Detalhes do desenho do estudo e do seguimento clínico estão ilustrados na Figura 4. Nesse estudo, os pacientes são seus próprios controles e os períodos com e sem uso de HCQ são comparados.

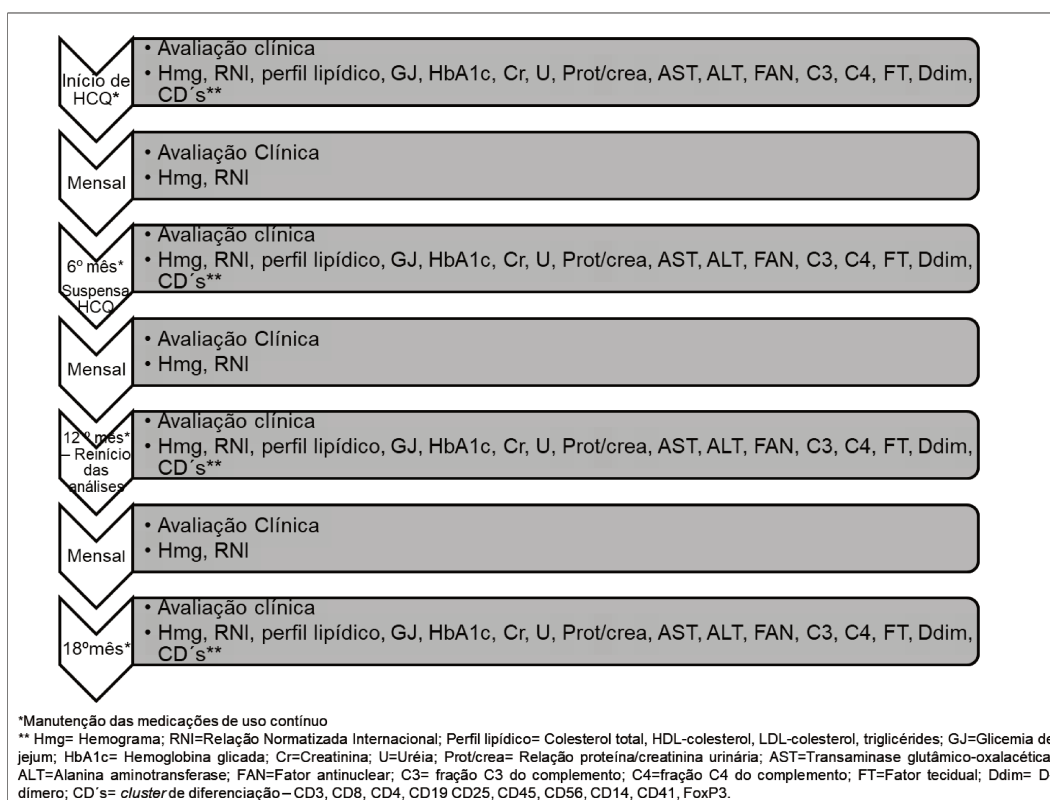


Figura 4 – Esquema representando o seguimento clínico-laboratorial do estudo.

4.2. Seleção dos participantes do estudo

Os participantes do estudo foram recrutados entre os pacientes com diagnóstico de SAF primária do ambulatório de Hemostasia do Hemocentro da UNICAMP. Os critérios de inclusão eram: diagnóstico confirmado de SAF primária com trombose e idade entre 17 e 65 anos. Os critérios de exclusão foram: diagnóstico de neoplasia em atividade, outras doenças autoimunes associadas, gravidez e SAF com complicações obstétricas isoladas.

4.3. Avaliação clínica e tratamento dos pacientes

Os pacientes que aceitaram participar do estudo preencheram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), anexo II. Após a assinatura do termo, os pacientes foram encaminhados para avaliação clínica, coleta de amostras e início do tratamento com HCQ.

Os pacientes incluídos no estudo foram tratados com HCQ 400mg via oral ao dia, fornecida pelo Hemocentro e manipulada por farmácia conveniada, em associação com o anticoagulante oral já em uso por eles e de eventuais outras medicações de uso contínuo. Os pacientes foram avaliados clinicamente antes do início do tratamento, utilizando-se formulário padronizado (anexo III), contendo:

- Dados da anamnese: nome, sexo, data de nascimento, descrição do evento trombótico, recidiva da trombose e comorbidades;
- Dados do exame físico: medidas antropométricas como peso, altura, índice de massa corpórea e circunferência abdominal.

Nas consultas subsequentes, os pacientes foram avaliados em relação à presença de complicações clínicas relativas à doença de base e aos efeitos adversos da terapia HCQ e anticoagulante oral (espontaneamente e interrogatório ativo). Foram realizadas avaliações clínica e laboratorial mensalmente para controle dos sintomas, hemograma e da anticoagulação, e, ao final de 6 meses de tratamento, a coleta dos exames do estudo (Figura 4). O tratamento com HCQ durou 6 meses. Após 6 meses da interrupção da medicação (período de *wash out*), foi iniciado um novo período semestral de seguimento, mantendo o mesmo cronograma de avaliações clínicas e

laboratoriais, com a manutenção do anticoagulante oral e eventuais outras medicações de uso contínuo (Figura 4).

4.4. Desfechos do estudo

Os desfechos avaliados nesse estudo foram laboratoriais e avaliados durante os períodos com HCQ e sem esse tratamento.

4.4.1. Dosagem do dímero-D e complemento (C3 e C4)

Níveis plasmáticos de dímero-D foram determinados utilizando kit imunoenzimático que emprega a técnica de ELISA do tipo sanduíche (VIDAS D-dimer exclusion kit, BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France), pelo laboratório de Hematologia do Hospital das Clínicas da Unicamp.

Para a determinação dos níveis de C3 e C4, foi utilizado o equipamento automatizado BNProSpec Analyzer (Siemen Healthcare Diagnostics Inc., USA), que utiliza o princípio nefelométrico, no laboratório de Imunologia do Hospital das Clínicas da Unicamp.

4.4.2. Dosagem dos marcadores de risco cardiovascular e hemograma

Os hemogramas foram realizados no laboratório de Hematologia do Hemocentro da UNICAMP no equipamento ADVIA® Hematology System (Siemen Healthcare Diagnostics Inc., USA). Os testes de colesterol, triglicérides, glicemia, uréia, creatinina, aspartato-aminotransferase, alanina-aminotransferase e proteína urinária foram realizados no Laboratório de Bioquímica Clínica da UNICAMP usando o equipamento AU5800 (Beckman-Coulter, USA) e reagentes específicos.

4.4.3. Quantificação das diferentes populações linfocitárias por citometria de fluxo

A expressão das moléculas de superfície CD3, CD8, CD4, CD 19, CD25, CD16, CD 45, CD56 e da proteína citoplasmática FoxP3 foi determinada pela técnica de citometria de fluxo. Para a avaliação, foram adicionadas alíquotas de 100 µL da

suspensão ajustada para 1×10^6 células/mL em tubos próprios para citometria. Após, foram adicionados anticorpos monoclonais específicos (BD-Pharmingen, USA) para a marcação da população celular a ser analisada, conjugado com os fluorocromos FITC, PE, PerCP e APC, dependendo do painel empregado para a fenotipagem celular. As células foram então incubadas por 20 minutos para a marcação dos antígenos de superfície. No caso da marcação intracelular da proteína citoplasmática FoxP3, após a marcação dos antígenos de superfície, foi realizada a permeabilização (Citoperm/Citofix) das células seguida por adição do anticorpo anti-FoxP3. As células marcadas, assim como as células com os isotipos controles, foram suspensas e lidas em citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD BioSystems). A análise dos resultados foi realizada no programa FlowJo, versão 10 (FlowJo, LLC, EUA).

Linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺ foram identificados pela marcação com CD45⁺ (PerCP), CD3⁺ (FITC) e CD4⁺ (APC) ou CD8⁺ (PE), respectivamente (Figura 5 e 6). A determinação de linfócitos NK seguiu a seguinte ordem: CD45⁺ (PerCP), CD3⁻ (FITC), CD56⁺ (PE) (Figura 7). Linfócitos B foram identificados pela marcação com CD45⁺ (PerCP) e CD19⁺ (APC) (Figura 8). Os linfócitos TREG foram detectados pela marcação CD45⁺ (FITC), CD4⁺ (PerCP), CD25⁺ (PE) e FoxP3⁺ (APC) (Figura 9).

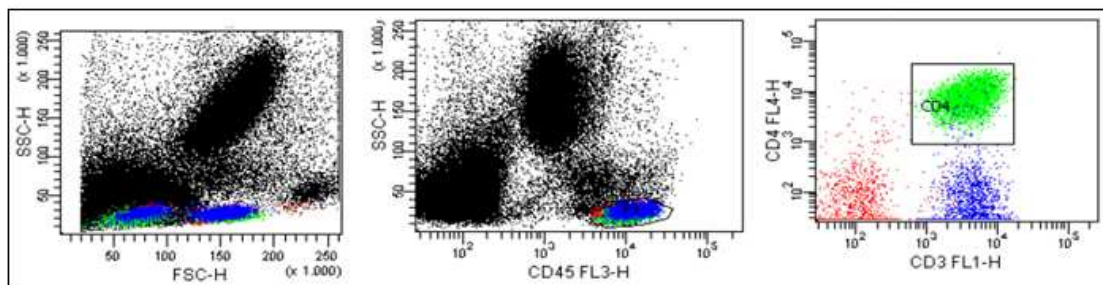


Figura 5– Estratégia de análise utilizada para identificar a população de linfócitos T CD4⁺.

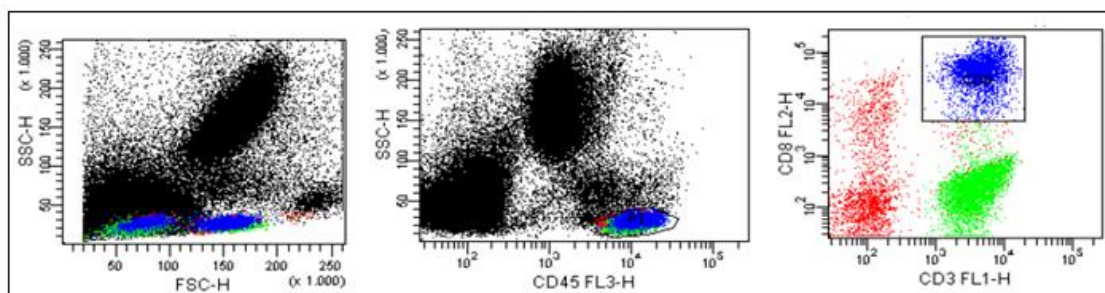


Figura 6 – Estratégia de análise utilizada para identificar a população de linfócitos T CD8⁺.

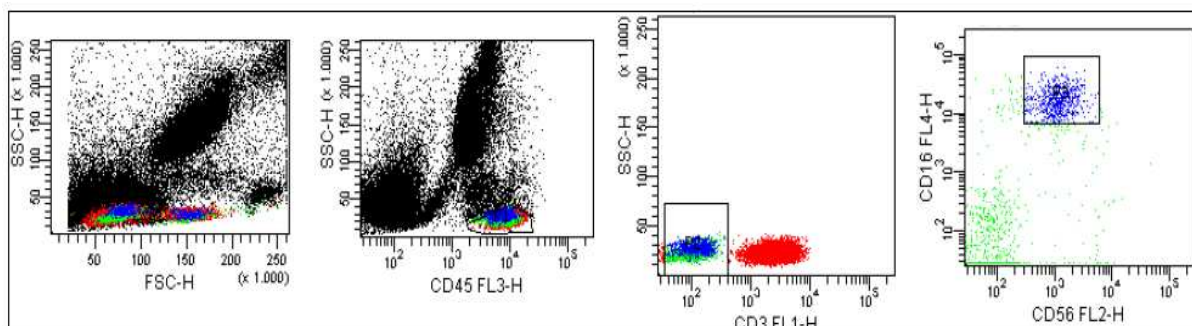


Figura 7 – Estratégia de análise utilizada para identificar a população de linfócitos NK.

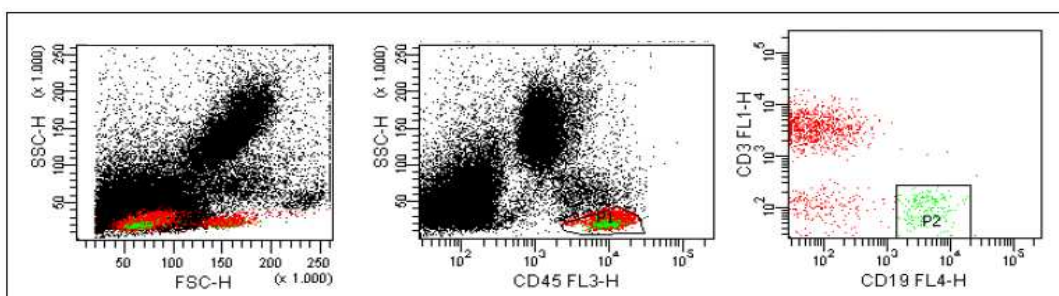


Figura 8 – Estratégia de análise utilizada para identificar a população de linfócitos B.

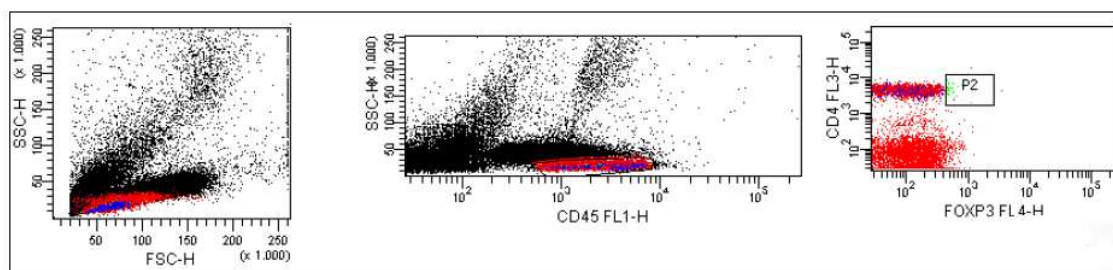


Figura 9 - Estratégia de análise utilizada para identificar a população de linfócitos TREG.

4.4.4. Quantificação da expressão de fator tecidual em plaquetas e monócitos

A quantificação da expressão de FT em plaquetas e monócitos foi avaliada através de uma amostra de 100ul de sangue coletado em tubo de EDTA ou citrato após estímulo com LPS e incubação por 1 hora em 37°C.

Para a marcação do FT em plaquetas foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais: CD41 (PE) e anti-TF (CD 142, FITC) (BD Bioscience, EUA). Para a marcação do FT em monócitos foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais: CD14 (PE) e anti-TF (CD 142, FITC) (BD Bioscience, EUA). As células marcadas,

assim como as células com os isotipos controles, foram analisadas em citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD BioSystems). A análise dos resultados foi realizada no programa FlowJo, versão 10 (FlowJo, LLC, EUA) (Figuras 10 e 11). Os resultados foram expressos como intensidade da expressão do FT nas plaquetas e nos monócitos.

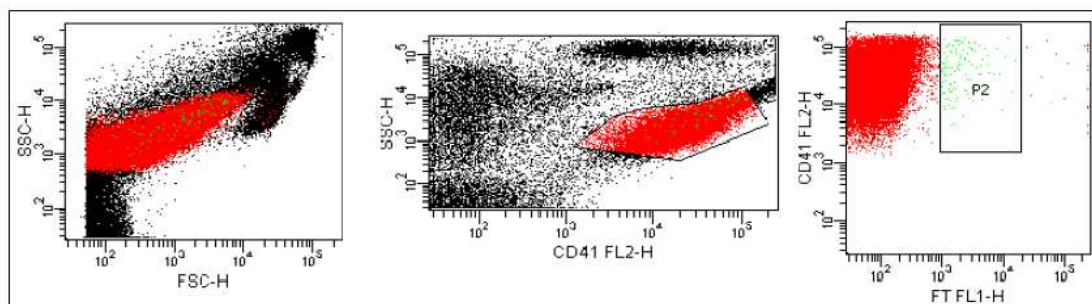


Figura 10 - Estratégia de análise utilizada para marcação do FT em plaquetas.

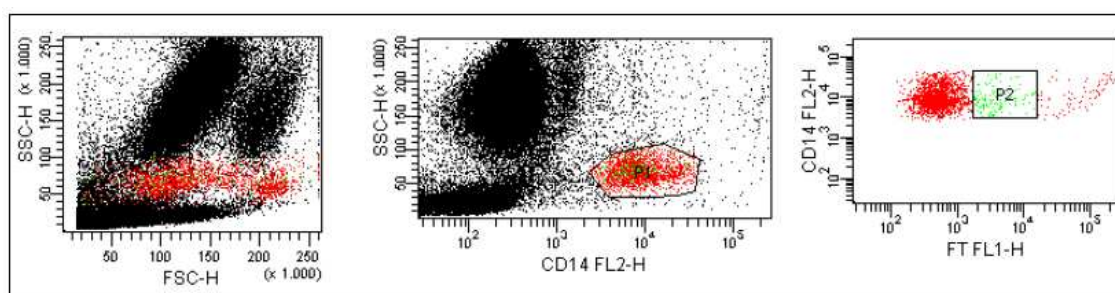


Figura 11 - Estratégia de análise utilizada para marcação do FT em monócitos.

4.5. Análise estatística

Os valores médios e o desvio padrão (DP) de todos os parâmetros laboratoriais estudados foram calculados no início e fim dos períodos de seguimento. Foram definidos dois períodos de seguimento: com HCQ e sem esse tratamento. Os períodos com e sem HCQ foram comparados quanto aos valores dos parâmetros dosados.

A variação (delta) dos níveis dos parâmetros imunológicos e hemostáticos durante os períodos com e sem HCQ foi calculada através de teste t pareado. A diferença de variação dos parâmetros laboratoriais entre os dois períodos de seguimento foi calculada através de métodos de regressão linear. Essas diferenças

foram expressas como média e 95% intervalo de confiança (95% IC). A Figura 12 ilustra as estratégias de análise estatística utilizadas. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa SPSS versão 23.0 (SPSS Inc, Chicago, Ill).

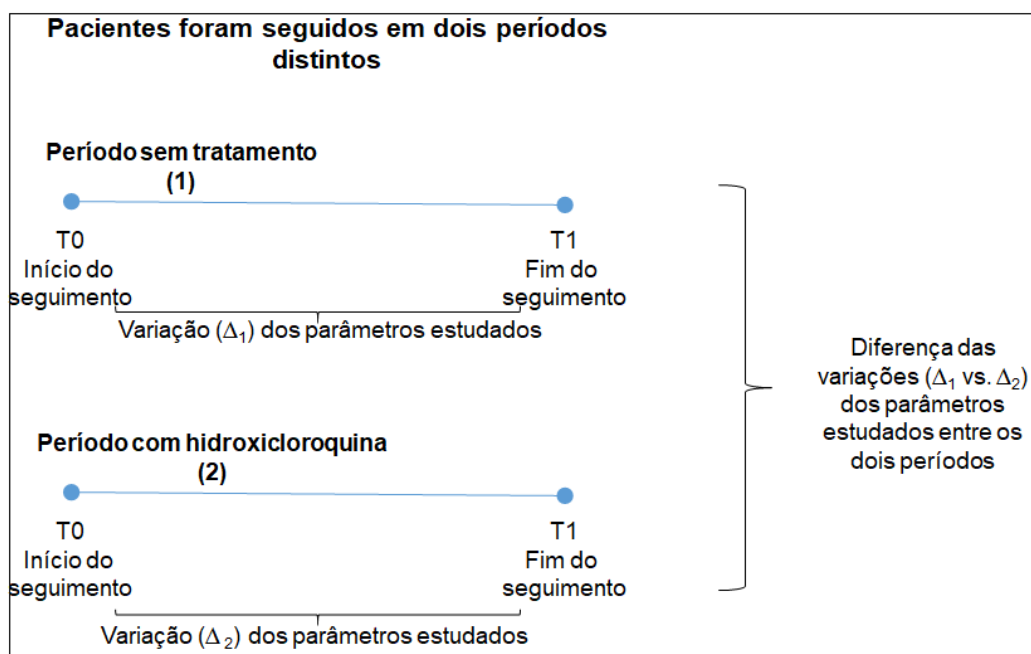


Figura 12 – Estratégias da análise estatística.

5. RESULTADOS

5.1. População estudada

Foram selecionados trinta e sete pacientes candidatos ao estudo no período de dezembro/2014 a dezembro/2016. Destes, houve duas recusas à participação e uma exclusão por constatação de presença de outra doença autoimune associada à SAF em revisão de história clínica (artrite psoriásica). A medicação foi, portanto, introduzida para trinta e quatro pacientes.

Após a introdução da medicação, totalizamos sete perdas de seguimento durante o estudo: duas exclusões por intercorrências clínicas - uma aos dois meses de tratamento devido intolerância à medicação pelos efeitos gastrintestinais apresentados (náuseas e epigastralgia de difícil controle) e a outra por diagnóstico de gestação durante o segundo mês do uso da medicação. Ocorreram dois óbitos, ambos no segundo mês de tratamento. Uma paciente teve o primeiro atendimento em sua

cidade de procedência, porém foi posteriormente transferida para o Hospital das Clínicas da UNICAMP, com desfecho relacionado a complicações de insuficiência cardíaca grave pré-existente. A segunda paciente apresentava previamente ao estudo quadro de cardiopatia congestiva com agudizações frequentes, porém sem acompanhamento cardiológico regular; o óbito ocorreu em sua cidade de origem, de maneira súbita, com relatos familiares frustrados e sem acesso à declaração de óbito. Houve três abandonos de seguimento por causas desconhecidas. Dessa forma, obtivemos vinte e sete pacientes que concluíram o estudo. O fluxograma do estudo está ilustrado na Figura 13.

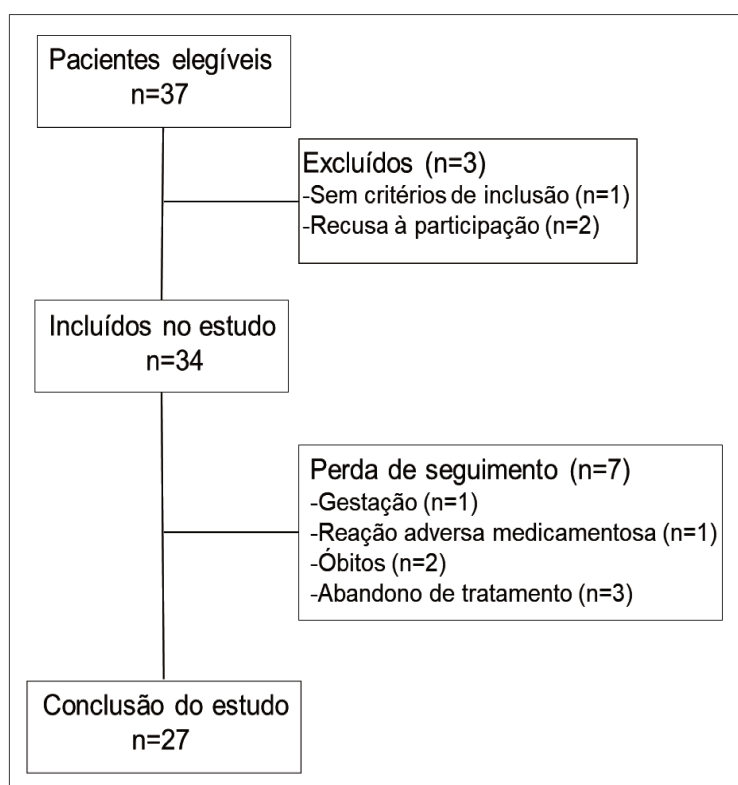


Figura 13- Fluxograma do estudo com seleção dos pacientes e critérios para exclusão.

5.1.1. Características demográficas e comorbidades dos pacientes na inclusão do estudo

Entre os vinte e sete pacientes incluídos no estudo, houve predomínio do sexo feminino (78%), sendo a média de idade de 44 anos (DP = 12 anos). Dentre as comorbidades detectadas, a hipertensão arterial sistêmica (HAS) foi diagnosticada em 44% dos pacientes, dislipidemia em 44% e diabetes mellitus (DM) em 7%. A positividade do fator antinúcleo (FAN), em títulos maiores que 1:320, foi observada

em 11% dos pacientes, a média do nível de C3 foi de 1,3 mg/dl (DP=0,2 mg/dl) e a de C4 foi de 0,2mg/dl (DP=0,1 mg/dl) (Tabela 1).

Tabela 1 - Características demográficas e comorbidades dos pacientes na data de inclusão do estudo.

Participantes	
n=27	
Idade, média (DP) anos	44 (12)
Sexo feminino , n (%)	21 (78)
Uso de estatina, n(%)	11(40)
Hipertensão Arterial Sistêmica, n (%)*	12 (44)
Dislipidemia, n (%)*	12 (44)
Sobrepeso, (IMC>25 e <30kg/m²)*	7 (26)
Obesidade, (IMC>30kg/m²)*	10 (37)
Tabagismo, n (%)	5 (18)
Diabetes Mellitus, n (%)*	2 (7)
Positividade de FAN, n (%)	3 (11)
Níveis de C3, média (DP) mg/dl	1,3 (0,2)
Níveis de C4, média (DP) mg/dl	0,2 (0,1)

*Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia- 2016/2017

5.1.2 -Características clínicas associadas a SAF na inclusão do estudo

Ao traçarmos o perfil da presença de anticorpos antifosfolípides, observamos que, ao diagnóstico, oito pacientes (30%) apresentavam positividade isolada para o anticorpo anticoagulante lúpico (LAC); seis pacientes (22%) tinham dupla positividade para LAC e anticorpo anticardiolipina (aCL) ou anticorpo antiβ2-GPI e a tripla positividade de anticorpos foi descrita em 10 (37%) dos pacientes (Tabela 2).

Em relação à condição trombótica dos pacientes na inclusão do estudo, observamos a predominância do primeiro evento trombótico em sítio venoso (22 casos; 77%), mais comumente com episódio de trombose venosa profunda (TVP). Em

todos os casos cuja apresentação inicial foi em leito arterial (8 casos; 30%), o evento trombótico foi o acidente vascular cerebral (AVC) (Tabela 2).

Tabela 2 - Características clínicas associadas a SAF na data de inclusão do estudo.

	Participantes n=27
Perfil de Anticorpos Antifosfolípides	
Positividade isolada para aCL ou a β 2GPI, n (%)	0 (0)
Positividade isolada para LAC, n (%)	8 (30)
Dupla positividade para aCL e a β 2GPI, n (%)	3 (11)
Dupla positividade para LAC e a β 2GPI (ou aCL), n (%)	6 (22)
Tripla positividade, n (%)	10 (37)
Sítio do primeiro episódio trombótico	
Trombose Venosa, n (%)	22 (77)
TVP, n(%)	21 (77)
TEP n (%)	5 (18)
Sítio incomum, n (%)	1 (3)
Trombose Arterial, n (%)	8 (30)
AVC, n (%)	8 (30)
Periférica , n (%)	0 (0)
Trombose Recorrente, n(%)	9 (33)
Sítio de recidiva da trombose	
Trombose Venosa, n(%)	7 (26)
Trombose Arterial, n(%)	2 (11)
Número de eventos trombóticos, média (DP)	1 (1)
Tratamento antitrombótico	
Varfarina, n(%)	27 (100)
Ácido acetilsalicílico, n(%)	8 (30)
Tempo desde a primeira trombose, média (DP) anos	8 (9)
Tempo desde a última trombose, média (DP) anos	4 (6)
Complicações obstétricas* , n (%)	5 (33)

*Complicações (aborto, perda fetal ou outras complicações relacionadas à SAF) autorreportadas em 15 pacientes com histórico de gestação.

5.1.3- Dados laboratoriais hematológicos e bioquímicos na inclusão do estudo

Foram realizadas análises dos principais parâmetros hematológicos dos pacientes. Não observamos alterações importantes destes parâmetros, especialmente em condições que poderiam estar relacionadas a manifestações da SAF como anemia (média hemoglobina [Hb] basal:13,7g/dl e DP=1,8g/dl), plaquetopenia (média plaquetometria: 216000/mm³; DP=37881/mm³) e linfopenia (mediana 1630/mm³; DP=391/mm³). Também não evidenciamos estado de hipercoagulabilidade avaliado pelo D-dímero nestes pacientes (média 144 ug/L; DP=99,3 ug/dl) (Tabela 3). É importante notar, entretanto, que os pacientes estavam em uso de anticoagulante oral.

Tabela 3- Dados laboratoriais de exames de hematologia e exames bioquímicos na data de inclusão no estudo dos pacientes que concluíram os estudo.

Parâmetros	Participantes n=27
Hb g/dl, média (DP)	13,9 (1,5)
Ht %, média (DP)	42,1 (4,9)
Leucócitos totais(/mm ³), média (DP)	6490 (1756)
Neutrófilos (/mm ³), média (DP)	3719 (1144)
Linfócitos(/mm ³), média (DP)	1869 (474)
Monócitos (/mm ³), média (DP)	379 (139)
Plaquetas (/mm ³), média (DP) x10 ³	221 (42,6)
Glicemia de jejum (mg/dl), média (DP)	96,5 (38,4)
Colesterol total (mg/dl), média (DP)	171 (37,5)
Triglicérides (mg/dl) média (DP)	165 (119)
Colesterol LDL (mg/dl), média (DP)	112,7 (35,9)
Colesterol HDL (mg/dl), média (DP)	48,7 (13,8)
Creatinina (mg/dl), média (DP)	0,7 (0,2)
Uréia (mg/dl), média (DP)	26 (11,1)
AST (mg/dl), média (DP)	19,7 (8,9)
ALT (mg/dl), média (DP)	20,6 (4,6)
Dímero-D (ug/L), média (DP)	141 (61,2)
Proteína/creatinina urinária média, (DP)	0,12 (0,20)

5.2. Comparação dos resultados entre os períodos com e sem tratamento com hidroxicloroquina

5.2.1. Efeito da HCQ no perfil imunológico

Observamos que no período de tratamento com HCQ houve queda da quantidade circulante de linfócitos CD8+ (média -4.9, 95% IC -8,01 a -1,85), enquanto no período sem HCQ a quantidade de linfócitos CD8+ aumentou. Desta forma, o tratamento com HCQ diminuiu em 56.7% a quantidade de CD8+ circulante em relação ao não tratamento.

Fenômeno contrário foi observado em relação aos linfócitos TREG circulantes. Houve incremento no período de tratamento com HCQ (média 0,21, 95% IC -0,01 a 0,44), enquanto no período sem HCQ a quantidade de linfócitos TREG diminuiu. Desta forma, o tratamento com HCQ aumentou em 75% a quantidade de TREG circulante em relação ao não tratamento. Constatamos, também, uma tendência à diminuição da quantidade de linfócitos CD4+ circulantes durante o tratamento. No período de tratamento com HCQ não houve variação da quantidade de CD4+ (média 0,54, IC -2,59 a 3,66). Já no período sem HCQ, houve aumento significativo da quantidade circulante de CD4+ (média 4,25, 95% IC 1,28 a 7,23). O tratamento com HCQ levou à diminuição relativa de CD4+ em 8.8%, quando comparado ao não tratamento.

Não foi observado efeito da HCQ nos outros parâmetros do perfil imunológico (frações C3 e C4 do complemento, linfócito CD19+ e linfócito CD56) (Tabela 4).

Tabela 4- Efeitos da hidroxiclороquina nos parâmetros imunológicos

	Níveis no período, média (DP)		Varição no período, média (95% IC)	P	Diferença entre os períodos, média (95% IC)	P
	Início	Fim				
C3 (mg/dl)						
Não tratamento	1,25 (0,15)	1,24 (0,15)	-0,01 (-0,06 a 0,05)	0,84	Referência	
Tratamento	1,23 (0,19)	1,22 (0,21)	-0,01 (-0,05 a 0,03)	0,56	-0,01 (-0,07 a 0,06)	0,84
C4 (mg/dl)						
Não tratamento	0,24 (0,07)	0,25 (0,07)	0,01 (-0,01 a 0,02)	0,36	Referência	
Tratamento	0,24 (0,08)	0,24 (0,08)	0,00 (-0,01 a 0,01)	0,94	-0,01 (-0,02 a 0,01)	0,49
CD4 (%)						
Não tratamento	41,8 (8,41)	46,1 (7,45)	4,25 (1,28 a 7,23)	0,01	Referência	
Tratamento	44,72 (9,21)	45,2 (7,69)	0,54 (-2,59 a 3,66)	0,73	-3,72 (-7,94 a 0,50)	0,08
CD8 (%)						
Não tratamento	18,23 (8)	24,18 (25,2)	5,95 (-4,64 a 16,54)	0,26	Referência	
Tratamento	23,64 (6,93)	18,71 (8,97)	-4,93 (-8,01 a -1,85)	0,001	-10,88 (-21,64 a -0,12)	0,05
CD19 (%)						
Não tratamento	10,08 (3,7)	12,3 (17,5)	2,24 (-5,10 a 9,58)	0,54	Referência	
Tratamento	10,24 (3,81)	9,75 (3,75)	-0,49 (-1,78 a 0,80)	0,44	-2,73 (9,86 a 4,40)	0,45
CD56 (%)						
Não tratamento	9,54 (5,9)	9,3 (4,9)	-0,21 (-1,46 a 1,04)	0,74	Referência	
Tratamento	10,92 (8,6)	11,37 (6,15)	0,46 (-2,63 a 3,54)	0,76	0,76 (0,32 a 1,20)	0,69
TREG (%)						
Não tratamento	1,36 (0,84)	0,81 (0,3)	-0,55 (-0,95 a -0,14)	0,01	Referência	
Tratamento	0,94 (0,56)	1,15 (0,65)	0,21 (-0,01 a 0,44)	0,07	0,76 (0,32 a 1,20)	0,001

Analizamos, também, a variação no perfil de autoanticorpos diagnósticos de SAF dos pacientes entre os períodos com e sem tratamento com HCQ. No início do estudo, o anticorpo anticardiolipina IgG estava positivo em 9 pacientes. Após 6 meses de uso de HCQ, o anticorpo anticardiolipina IgG tornou-se negativo em 77,8% desses pacientes (n=7). Dentre os 16 pacientes com anticorpo anticardiolipina IgG negativo, houve positividade do anticorpo após o uso de HCQ em 12,5% (n=2). A mudança de perfil do anticorpo anticardiolipina IgG, ilustrada na figura 14, foi estatisticamente significativa (P=0,009).

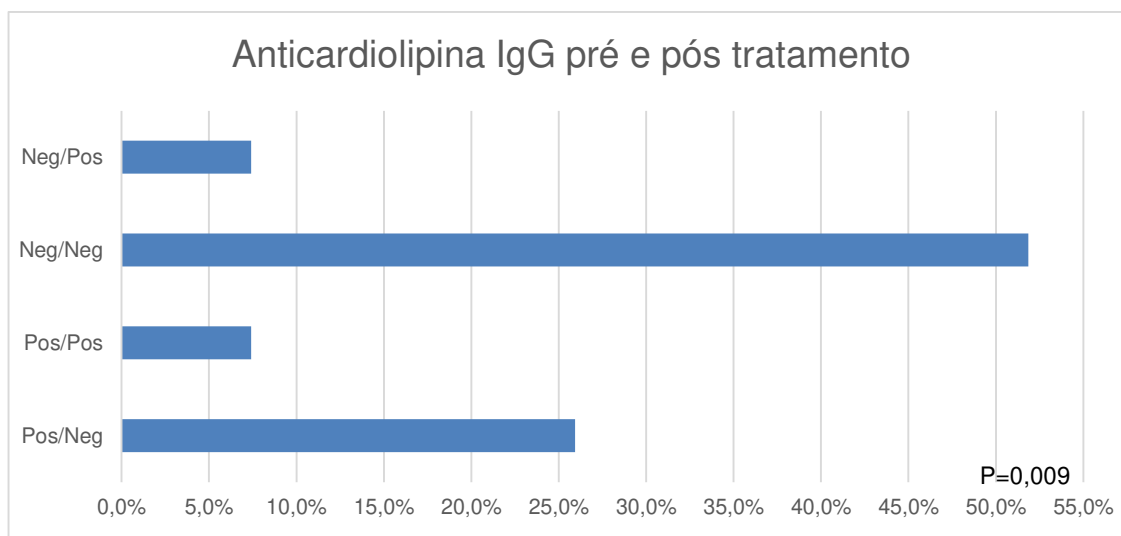


Figura 14- Variação da presença do anticorpo anticardiolipina IgG pré e pós tratamento com hidroxicloroquina

O anticorpo anti- β 2GPI estava presente em 15 pacientes. Após 6 meses de uso de HCQ, o anticorpo anti- β 2GPI tornou-se negativo em 33,3% desses pacientes (n=5). Dentre os 9 pacientes com anticorpo anti- β 2GPI negativo na data da inclusão do estudo, houve positividade após o uso de HCQ em 11,1% (n=1). A mudança de perfil do anticorpo anti- β 2GPI está ilustrada na figura 15.

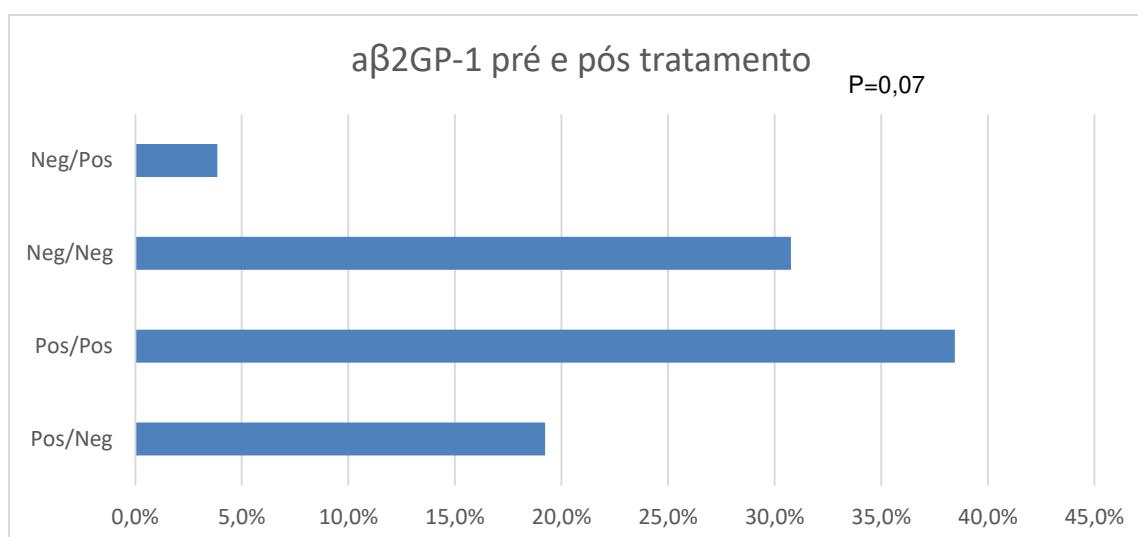


Figura 15 - Variação da presença do Anticorpo anti- β 2GPI pré e pós tratamento com hidroxicloroquina

5.2.2. Efeito da HCQ nos parâmetros hematológicos

O efeito da HCQ nos parâmetros hematológicos está descrito na Tabela 5. A média dos valores de linfócitos era 1869/mm³ (DP=474/mm³) no início do período de tratamento com HCQ e caiu para 1551/mm³ (DP=384/mm³) ao final desse período. Durante o período de não tratamento, a média dos valores de linfócitos era 1626/mm³ (DP=404/mm³) no início e 1668/mm³ (DP=438/mm³) ao final do período. Os níveis de hemoglobina não variaram significativamente nem no período de tratamento com HCQ (média 13,9g/dl, [DP=1,58g/dl] no início; média 13,7g/dl, [DP=1,78g/dl] no fim do período de tratamento; P=0,23) e nem no período sem HCQ (média 13,8 g/dl [DP=1,9g/dl] no início; média 13,8g/dl [DP=1,9g/dl] no fim do período sem tratamento; P=0,98).

A diferença média da contagem de leucócitos entre os períodos com e sem HCQ foi de -871,67/mm³ (95% IC -1484,08 a -259,27/mm³), o que resultou num efeito do tratamento com HCQ em reduzir a contagem de leucócitos totais em 15% quando comparado ao não tratamento. A diferença média da contagem de linfócitos entre os períodos com e sem HCQ foi de -360,92/mm³ (95% IC -519,86 a -201,97/mm³), o que resultou num efeito do tratamento com HCQ em reduzir a contagem de linfócitos em 16% quando comparado ao não tratamento.

Tabela 5 – Efeitos da HCQ nos parâmetros hematológicos para controle de toxicidade hematológica.

	Níveis no período, média (DP)		Variação no período, média (95%IC)	P	Diferença entre os períodos, média (95%IC)	P
	Início	Fim				
Hemoglobina, g/dl						
Não tratamento	13,88 (1,9)	13,88 (1,9)	0,00 (-0,34 a 0,34)	0,98	Referência	
Tratamento	13,9 (1,58)	13,7 (1,78)	-0,26 (-0,69 a 0,18)	0,23	-0,26 (-0,81 a 0,28)	0,34
Leucócitos,/mm3						
Não tratamento	5700 (1334)	5860 (1724)	127,60 (-372,71 a 627,91)	0,60	Referência	
Tratamento	6490 (1756)	5720 (1477)	-744,07 (-1132,59 a -355,56)	0,001	-871,67 (-1484,08 a -259,27)	0,006
Neutrófilos,/mm3						
Não tratamento	3480 (984)	3474 (1300)	-5,72 (-459,75 a 448,81)	0,98	Referência	
Tratamento	3719 (1144)	3341 (960)	-377,78 (-728,34 a -27,21)	0,04	-372,06 (-926,50 a 182,38)	0,19
Linfócitos,/mm3						
Não tratamento	1626 (404)	1668 (438)	42,40 (-66,71 a 151,51)	0,43	Referência	
Tratamento	1869 (474)	1551 (384)	-318,52 (-438,39 a -198,64)	0,001	-360,92 (-519,86 a -201,97)	<0,0001
Monócitos,/mm3						
Não tratamento	357 (114)	327 (97)	-29,60 (-66,24 a 7,04)	0,11	Referência	
Tratamento	379 (139)	339 (124)	-39,63 (-91,34 a 12,08)	0,13	-10,03 (-72,78 a 52,72)	0,75
Plaquetas,10⁹/mm3						
Não tratamento	20,8 (3,78)	21,4 (4,09)	6,060 (-7,089 a 19,409)	0,35	Referência	
Tratamento	22,1 (4,26)	21,5 (5,31)	-6,000 (-19,411 a 7,411)	0,37	-12,160 (-30,584 a 6,264)	0,19

5.2.3. Efeito da HCQ no perfil hemostático

Os resultados do efeito da HCQ no perfil hemostático estão detalhados na Tabela 6. Os níveis de D-dímero aumentaram (no período sem o tratamento, início com média de 177,5 ug/dl (DP=103,9u/dl) e fim de 228 ug/dl (DP=132,6), P=0,04; no período com a HCQ, a média inicial foi de 141,9 (DP=61,2) e a média ao final do período foi de 175,4 ug/dl (DP=88,8), P=0,03, entretanto deve-se considerar o fato dos pacientes estarem em anticoagulação oral e dos valores de D-dímero permaneceram baixos durante todo o estudo. A média da expressão do FT em plaquetas foi de 5,95U (DP=7,74U) no início do período de tratamento com HCQ e 3,88U (DP=1,84U) no final desse período (P=0,19). No início do período sem tratamento a média da expressão foi de 3,07U (DP=1,8U) e se manteve no término

desse período (média 3,6U [DP=2,75U]). A expressão de FT em monócitos diminuiu no período sem tratamento (médias no início e fim do período sem tratamento de 20,74U (DP=24,17U) e 4,38U (DP=3,88U), respectivamente (P=0,001). Já com o tratamento, não houve variação significativa na expressão de FT em monócitos, médias no início e fim do período foram de 48,95U (DP=42,4U) e 27,9 U (DP=34,1U), respectivamente (P=0,10). O tratamento com HCQ não teve efeito sobre a expressão do FT em monócitos, quando comparado ao não tratamento (P=0,73).

Tabela 6- Efeitos da hidroxiclороquina nos parâmetros da hemostasia

	Níveis no período, média (DP)		Varição no período, média (95%IC)	P	Diferença entre os períodos, média (95%IC)	P
	Início	Fim				
Dímero D(u/dl)						
Não tratamento	177,5 (103,9)	228 (132,6)	50,95 (1,77 a 100,13)	0,04	Referência	
Tratamento	141,9 (61,2)	175,4 (88,8)	33,42 (3,71 a 63,13)	0,03	-17,53 (-71,97 a 36,91)	0,52
C41-FT (U)						
Não tratamento	3,07 (1,8)	3,6 (2,75)	0,52 (-0,10 a 1,13)	0,09	Referência	
Tratamento	5,95 (7,74)	3,88 (1,84)	-2,07 (-5,26 a 1,12)	0,19	-2,59 (-5,67 a 0,50)	0,1
CD14-FT (U)						
Não tratamento	20,74 (24,1)	4,38 (3,88)	-16,36 (-26,00 a -6,72)	0,001	Referência	
Tratamento	48,95 (42,4)	27,9 (34,1)	-21,02 (-46,29 a 4,24)	0,10	-4,66 (-31,43 a 22,10)	0,73

Ainda sobre a avaliação da variação de condições relacionadas à hemostasia nos pacientes, procedemos o cálculo do percentual de tempo dentro do alvo terapêutico (TTR) da anticoagulação oral, obtido pelo método Rosendaal (42). Não houve variação entre os dois períodos do estudo, sendo a média de TTR 55,5% (DP=28%) durante o uso da HCQ e 58,2% (DP= 26,3%) durante período sem esse tratamento (P=0,65) (Figura 16).

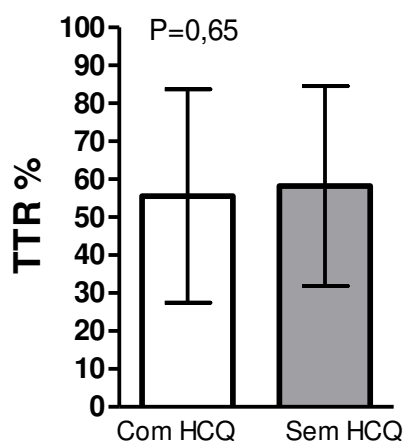


Figura 16 – Tempo em faixa terapêutica (TTR) nos 2 períodos em estudo.

5.2.4. Efeito da hidroxicloroquina nos parâmetros bioquímicos

Houve variação negativa em alguns parâmetros bioquímicos durante o tratamento com HCQ, conforme demonstrado na Tabela 7. A diferença média dos níveis de glicemia de jejum entre os períodos com e sem HCQ foi de -8,75mg/dl (95% IC -16,77 a -0,73 g/dl; $P=0,03$), o que resultou no efeito do tratamento com HCQ em reduzir os níveis de glicemia de jejum em 9,8% quando comparado ao não tratamento. A diferença média dos níveis de LDL-colesterol entre os períodos com e sem HCQ foi de -14,36mg/dl (95% IC -27,75 a -0,97, $P=0,04$), o que resultou em uma redução nos níveis LDL-colesterol em 14% quando comparado ao não tratamento. Níveis de hemoglobina glicada não apresentaram variação com o tratamento quando comparados os períodos com e sem HCQ ($P=0,28$). Também não foram observadas alterações nos níveis de HDL-colesterol (médias inicial e final sem o tratamento: 45,4 mg/d [DP=13,9mg/dl] e 45,9mg/dl [DP=13,5mg/dl], $P=0,76$; com o tratamento: 48,7mg/dl [DP=13,8mg/dl] e 48,4mg/dl [DP=14mg/dl], $P=0,83$) e de triglicérides (médias inicial e final sem tratamento: 143,8mg/dl [DP=98,0mg/dl] e 114,8 mg/dl [DP=52,7mg/dl], $P=0,13$; com a HCQ, o nível médio no início do período foi de 165mg/dl [119mg/dl] e final de 133mg/dl [DP=88,1mg/dl], $P=0,11$). A diferença média dos níveis de creatinina entre os períodos com e sem HCQ foi de 0,07mg/dl (95% IC 0,01 a 0,14g/dl; $P=0,03$) o que resultou no aumento de 8% dos níveis da creatinina com o uso da HCQ, porém esse aumento não foi acompanhado por alteração da relação proteína/creatinina urinária (variação entre os períodos foi nula, 0,95% IC -0,04 a 0,03 mg/dl, $P=0,93$). Transaminase glutâmico-oxalacética e alanina

aminotransferase não sofreram variações com o tratamento. (Tabela 7).

Tabela 7- Efeitos da hidroxicloroquina nos parâmetros bioquímicos

	Níveis no período, média (DP)		Variação no período, média (95%CI)	P	Diferença entre os períodos, média (95%CI)	P
	Início	Fim				
Glicemia de jejum (mg/dl)						
Não tratamento	89 (9,4)	91 (13,4)	1,7 (-3,7 a 7)	0,51	Referência	
Tratamento	96,5 (38,4)	89,4 (31,1)	-7,1 (-12,2 a -2,0)	0,01	-8,75 (-16,77 a -0,73)	0,03
Hb glicada (%)						
Não tratamento	5,89 (1,5)	5,62 (1,02)	-0,27 (-0,52 a -0,01)	0,04	Referência	
Tratamento	5,8 (1,32)	5,6 (1,04)	-0,11 (-0,27 a 0,06)	0,19	0,16 (-0,13 a 0,45)	0,28
LDL-colesterol (mg/dl)						
Não tratamento	102,3 (31,0)	103,4 (31,7)	1,13 (-7,56 a 9,8)	0,79	Referência	
Tratamento	112,7 (35,9)	99,5 (23,9)	-13,23 (-23,7 a -2,7)	0,02	-14,36 (-27,75 a -0,97)	0,04
HDL-colesterol (mg/dl)						
Não tratamento	45,4 (13,93)	45,9 (13,5)	0,50 (-2,83 a 3,83)	0,76	Referência	
Tratamento	48,7 (13,8)	48,4 (14)	-0,37 (-3,73 a 2,99)	0,83	-0,87 (-5,50; a 3,76)	0,71
Triglicérides-colesterol (mg/dl)						
Não tratamento	143,8 (98,05)	114,8 (52,7)	-28,96 (-66,63 a 8,71)	0,13	Referência	
Tratamento	165 (119)	133 (88,1)	-32,52 (-72,97 a 7,94)	0,11	-3,56 (-57,88 a 50,76)	0,90
Creatinina (mg/dl)						
Não tratamento	0,81 (0,28)	0,80 (0,3)	-0,01 (-0,05 a 0,03)	0,61	Referência	
Tratamento	0,78 (0,20)	0,84 (0,27)	0,06 (0,01 a 0,11)	0,02	0,07 (0,01 a 0,14)	0,03
Relação proteína/creatina urinária						
Não tratamento	0,07 (0,04)	0,07 (0,05)	0,00 (-0,02 a 0,02)	0,95	Referência	
Tratamento	0,12 (0,20)	0,12 (0,16)	0,00 (-0,03 a 0,03)	0,93	0 (-0,04 a 0,03)	0,93
ALT (U/l)						
Não tratamento	20,5 (7,5)	22,4 (22,8)	1,84 (-5,52 a 9,20)	0,61	Referência	
Tratamento	20,6 (4,64)	19,8 (5,44)	-0,78 (-2,31 a 0,75)	0,30	-2,62 (-11,22 a 5,99)	0,93
AST (U/l)						
Não tratamento	20,9 (9,1)	20,1 (10,5)	-0,80 (-4,26 a 2,66)	0,64	Referência	
Tratamento	19,7 (8,9)	19,9 (9,01)	0,22 (-2,08 a 2,53)	0,84	1,02 (-3,9 a 5,43)	0,64

6. DISCUSSÃO

A SAF primária é uma condição clínica autoimune, com prevalência predominante em adultos jovens, que pode cursar com fenômenos trombóticos em qualquer leito vascular. Caracterizada pela presença dos anticorpos antifosfolípidos, a fisiopatogenia dos eventos trombótico é bastante estudada e compreende a ativação de células endoteliais, o estímulo do FT, a hiperagregação plaquetária e a

hipercoagulabilidade (2). Menos estabelecida, porém, é a importância das alterações imunológicas associadas à SAF primária na hipercoagulabilidade e no risco trombótico (26). Do ponto de vista clínico, nota-se que pacientes com SAF primária podem ter trombooses de repetição mesmo em vigência de anticoagulação eficaz (27), o que sugere que tratamentos além da anticoagulação possam ser necessários para o controle do risco trombótico. Nesse contexto, o tratamento imunomodulador poderia ser benéfico na SAF caso comprovado seu efeito no controle da resposta imunológica e da hipercoagulabilidade relacionadas à doença.

A HCQ é uma medicação antimalárica de metabolismo hepático e excreção renal lenta, com tempo de eliminação total de aproximadamente 50 dias (31). A droga tem ação imunomoduladora em diversas doenças reumatológicas, em especial no LES e artrite reumatóide (AR), em que é utilizada para prevenir crises de exacerbação e complicações trombóticas (36). Entretanto, em algumas doenças, como na síndrome de Sjogren (43), esse efeito clínico da HCQ não é observado. No contexto da SAF primária, há poucas evidências clínicas sobre o potencial imunomodulador e antitrombótico da HCQ na doença.

No presente estudo pudemos observar que, em pacientes com SAF primária, o tratamento com HCQ está associado à diminuição da contagem de linfócitos totais, de linfócitos CD4+ e CD8+ e ao aumento de linfócitos TREG. Apesar das alterações do perfil imunológico, o tratamento com HCQ não alterou o perfil hemostático dos pacientes, avaliado pela quantificação de Dímero-D no plasma e da expressão de FT em monócitos. Observamos, ainda, que o uso de HCQ foi associado à queda da glicemia de jejum, LDL-colesterol e triglicérides.

Em relação ao efeito imunomodulador, o tratamento com HCQ foi associado à redução relativa de 23% na quantidade de linfócitos totais circulantes, redução relativa de 10% nos linfócitos CD4+ circulantes, redução relativa de 58% nos linfócitos CD8+ circulantes e aumento relativo de 174% na quantidade circulante de TREG. É importante notar que o grupo de pacientes deste estudo foi caracterizado pelo predomínio por mulheres na 5ª década de vida, com perfil predominante de dupla e tripla positividade para anticorpos antifosfolípides e valores limítrofes de C3 e C4, o que sugere que sejam pacientes de maior complexidade imunológica (44). Estudos anteriores já demonstraram que tal complexidade imunológica é compatível com a SAF primária trombótica, tendo sido descritos na SAF primária a diminuição de

linfócitos TREG (45), o aumento da ativação de células CD4+ e CD8+ (46) e o consumo do complemento (47). Um estudo brasileiro prévio mostrou que a quantidade de linfócitos TREG circulante é 2.7 vezes menor em pacientes com SAF primária (quantidade média de TREG=0,71%) quando comparados a controles saudáveis (quantidade média de TREG=1,93%) (45). A quantidade de TREG circulante também foi aproximadamente duas vezes menor em pacientes com SAF secundária a LES (média = 2.4%) em comparação com pacientes lúpicos sem SAF (média = 2.4%) e com controles (média = 4.3%) (48). Outro estudo clínico demonstrou que os níveis de TREG circulantes em pacientes com LES em atividade (média = 2.24%) eram duas vezes menos que em pacientes com LES fora de atividade (média = 4.41%) e 1.73 vezes menor que em controles (3.89%) (49). A associação entre aumento da quantidade de TREG e controle da atividade do LES já foi demonstrada também em estudos que avaliaram a resposta a corticosteroides (50). Não há, até o momento, valores de referência para níveis patológicos de TREG circulante e tampouco se sabe quais seriam os níveis de TREG necessários para o controle terapêutico da atividade autoimune. Entretanto, como há registros na literatura de que valores duas vezes aumentados de TREG estão associados à doença autoimune em atividade, acreditamos que o efeito da HCQ em aumentar aproximadamente duas vezes os níveis de TREG circulante, como observado neste estudo, possa ser suficiente para promover um controle da atividade autoimune da SAF primária.

Além da diminuição de TREG, o aumento de linfócitos T CD4+, T CD8+ e a polarização para resposta linfocitária tipo Th1 parecem estar associados à patogênese da SAF (51). Estudos em modelo animal mostraram que a transferência de linfócitos T de camundongos com SAF pode induzir a doença em camundongos saudáveis (52). Há evidências da presença de linfócitos T CD4+ autorreativos contra a proteína β 2-GPI em pacientes com SAF e em indivíduos saudáveis (53), entretanto, somente os linfócitos T CD4+ autorreativos dos pacientes com SAF teriam a capacidade de promover a produção dos anticorpos anti- β 2GPI pelos linfócitos B (54). Em modelos murinos com SAF, durante a doença em atividade, foi observado aumento de IL-10 e diminuição da produção de interferon – gama e IL-2, que resulta em diminuição das citocinas do tipo 1 (55). O tratamento com anticorpo monoclonal idiopático (MoAb) melhorou as manifestações clínicas e laboratoriais da doença e esteve associado com o incremento dos níveis das citocinas tipo 1 e da supressão das do tipo 2, o que pode indicar que a polarização das citocinas tipo 1 participa da patogênese da SAF (51,55).

Em humanos, os dados da literatura sobre o tipo de resposta imune celular predominante na SAF ainda são inconclusivos. Em um estudo, linfócitos T CD4 autorreativos de pacientes com SAF apresentaram uma resposta do tipo Th1 (54), enquanto outros estudos em linhagens celulares procedentes de linfócitos T CD4+ autorreativos demonstraram a existência de clones com o perfil de citocinas Th0/Th2 e também do tipo Th1 (56,57). O efeito da HCQ em diminuir a quantidade de linfócitos T CD4+, quando comparado ao não tratamento, observado nesta tese sugere um impacto da HCQ no controle da resposta do tipo Th1, resposta esta que faz parte da fisiopatologia da SAF.

Estudos clínicos prévios demonstraram que o aumento de linfócitos T CD 8+ estava diretamente correlacionado a ativação endotelial (58). Além disso, estudos em modelos murinos de SAF mostraram que o controle da atividade de linfócitos T CD8+ pode levar a imunotolerância nesses animais (59). Apesar de não haver estudos de indução de imunotolerância em humanos com SAF com os quais possamos comparar nossos resultados, acreditamos que a redução dos níveis de linfócitos T CD8+ pela HCQ, como observado neste estudo, possa contribuir para o controle da citotoxicidade associada à doença. Desta forma, nossos achados mostraram que a HCQ tem efeito modulador sobre linfócitos T, em especial os TREG, que são linfócitos potencialmente associados à patogênese da SAF. Esses resultados sugerem que a droga possa ter efeito em controlar as alterações imunológicas da doença.

Assim como a resposta celular contra *self* é bem definida nas doenças autoimunes, a função da resposta autoimune humoral também é bastante detalhada. Trata-se de uma resposta altamente específica para cada doença autoimune e que resulta na produção de autoanticorpos definidores do diagnóstico e, algumas vezes, do prognóstico dessas doenças (60). Na SAF primária, reconhece-se como alto risco trombótico a tripla positividade de anticorpos, cuja presença pode indicar um tratamento mais agressivo do ponto de vista da anticoagulação e do controle de fatores de risco cardiovasculares (43). Entretanto, o valor dos autoanticorpos no seguimento dos pacientes ainda é pouco esclarecido, mas alguns dados sugerem que eles podem atuar como preditores da resposta ao tratamento (60). Em nosso estudo, observamos que cerca de 77% dos pacientes inicialmente positivos para o anticorpo anticardiolipina IgG tornaram-se negativos após o uso por seis meses da HCQ, o que sugere que a HCQ pode regular a produção dos autoanticorpos na SAF. Entretanto, tal análise foi limitada devido à anticoagulação oral com varfarina, comprometendo a

confiabilidade dos resultados do anticorpo anticoagulante lúpico, que não puderem ser re-testados ao longo do estudo. Outra limitação foi a impossibilidade de seguir a avaliação no período sem o uso da HCQ, por questões técnicas. Portanto, entendemos os nossos dados como preliminares, sendo necessários estudos futuros para confirmar o papel da HCQ na negatificação dos autoanticorpos nos pacientes com SAF primária.

As principais manifestações da SAF, entretanto, são a hipercoagulabilidade e a trombose e, para que uma medicação seja efetiva, é necessário que controle esses aspectos da doença. Em relação a um possível efeito anticoagulante da HCQ, nosso estudo mostrou que a medicação aparentemente não altera o perfil hemostático dos pacientes com SAF primária. Os parâmetros de coagulação, avaliados pelos valores de D-dímero, não foram alterados pelo tratamento com HCQ. Além dos valores de D-dímero, a expressão do FT nos monócitos, uma das principais alterações pró-trombóticas associadas à SAF, também não sofreu alteração com o tratamento com HCQ. Observamos apenas a diminuição não significativa da expressão do FT nas plaquetas após o uso da HCQ. Todavia, o significado clínico da expressão do FT em plaquetas é menos estabelecido e não há evidências que permitam associar este parâmetro ao risco trombótico do paciente. Dessa forma, apesar de termos observado que a HCQ provoca imunomodulação na SAF, um potencial efeito de modulação da coagulação não foi observado.

Resultados de um estudo recente, em que vinte e dois pacientes com SAF primária foram avaliados imediatamente antes e após três meses de uso de HCQ 200mg ao dia, também sugerem que a HCQ não tem ação anticoagulante. Nesse estudo, o tratamento com HCQ, apesar de estar associado à redução de 25% dos níveis séricos de FT, não foi capaz de alterar o potencial de geração de trombina dos pacientes (61). É possível, porém, que a HCQ exerça ação antitrombótica através do controle de outros elementos envolvidos na hemostasia que não foram avaliados neste estudo. Como exemplos, um estudo recente em voluntários sadios mostrou que a HCQ pode diminuir a agregação plaquetária dependente do tromboxano A2 (62) e estudos *in vitro* mostraram que a HCQ pode reverter o bloqueio da ligação entre anexina V (um potente anticoagulante natural) e fosfolípides promovido pelos anticorpos antifosfolípides em células endoteliais de veia umbilical (63) e diminuir a liberação de redes extracelulares de neutrófilos em amostras de sangue de pacientes com neoplasia pancreática (64). Portanto, uma avaliação mais extensa do perfil

hemostático dos pacientes em uso de HCQ é necessária antes que possamos afirmar que a medicação não tem efeito anticoagulante em humanos. Entretanto, é importante ressaltar que tal análise ampliada da coagulação em pacientes com SAF primária trombótica pode não ser viável, uma vez que esses pacientes fazem uso obrigatório de anticoagulantes, que interferem em quase todos os testes da coagulação, e a retirada destes medicamentos para fins de pesquisa poderia ser antiético. Até o momento, nossos resultados e os resultados de outros estudos não confirmam que a HCQ tenha efeito anticoagulante em pacientes com SAF primária.

O risco trombótico na SAF e em outras doenças autoimunes é resultado não apenas da hipercoagulabilidade sanguínea, mas também da ação de fatores de risco cardiovascular como a hipertensão arterial sistêmica e a hiperlipidemia (65,66). Considerando tal contexto, a escala global de SAF (GAPSS), baseada no perfil de anticorpos antifosfolípidos e autoimunes e nos riscos cardiovasculares convencionais, é uma importante ferramenta para a estratificação de risco trombótico nesses pacientes (66) e pode auxiliar, na prática clínica, uma proposta terapêutica mais ampla. Por essa escala, fatores como hipertensão arterial sistêmica e hiperlipidemia estão tão associados com o risco de trombose na SAF quanto à positividade para os anticorpos antifosfolípidos. Há, ainda, modelos experimentais e estudos clínicos que mostraram uma associação entre a SAF e a formação precoce e acelerada de placas aterosclóticas (67), endossando ainda mais esses conceitos.

É interessante notar que nesse estudo observamos que o uso da HCQ esteve associado à diminuição dos níveis de LDL-colesterol e glicemia. Tal efeito da HCQ sobre esses marcadores, especialmente sobre o LDL-colesterol, já foi descrito em estudos com outras doenças autoimunes. Uma avaliação longitudinal de pacientes com diagnóstico de LES constatou a queda nos níveis de LDL-colesterol após o uso de HCQ (43,68). Há evidências na literatura sobre o efeito redutor da HCQ nos níveis glicêmicos. Um estudo retrospectivo em uma coorte de pacientes com diagnóstico de AR constatou diminuição do risco de DM com o uso da droga (69). Uma revisão sistemática reforçou o achado do efeito da HCQ sobre o controle glicêmico e na diminuição do risco de DM tipo II (70). O estudo de coorte de Baltimore evidenciou a melhora, pela HCQ, do perfil glicêmico de pacientes lúpicos através da diminuição da resistência insulínica e da hemoglobina glicada (37,71). Diversos estudos prévios apontam para um efeito antitrombótico da HCQ que aparentemente está associado ao controle da aterosclerose acelerada, observada em doenças como LES e AR,

através da ativação de monócitos e de linfócitos T e atuação sobre a disfunção endotelial e o estresse oxidativo comuns na dislipidemia (72). Soma-se, ainda, a descrição em um estudo da diminuição, pela HCQ, do risco de eventos trombóticos particularmente arteriais em pacientes com AR (73). Desta forma, é possível que o efeito da HCQ em atenuar os fatores de risco cardiovasculares através, especialmente, dos controles lipídico e glicêmico (40, 68, 72, 73) contribua para que a medicação também diminua o risco trombótico dos pacientes.

Em relação aos efeitos adversos, a HCQ é uma droga bem tolerada, segura em dose padronizada; contudo, seu uso contínuo ou em altas doses pode apresentar alguns efeitos adversos, principalmente pela sua capacidade de acúmulo em hemácias e em alguns órgãos como olhos, rins e fígado (74). Sintomas relacionados à intolerância gástrica e diarreia são comuns e em geral tratáveis com sintomáticos (74). Outros eventos induzidos pela HCQ, também descritos como comuns, são miopatia, cardiomiopatia, psicose, alopecia e retinopatia (75). A retinopatia é a complicação relacionada ao uso prolongado da HCQ mais amplamente estudada, justificável pelo dano irreversível potencialmente associado à perda da visão, mesmo após descontinuidade da medicação (76). Estudo recente indicou que a toxicidade ocular não é rara, entretanto, está diretamente relacionada à dosagem diária e à duração do uso da HCQ, assim como a outros fatores de risco, mas confirma o uso da medicação como seguro mesmo por períodos prolongados, com vigilância a sinais precoces de toxicidade (77). Entre os nossos pacientes foram realizados exames oftalmológicos durante o uso da medicação e após sua suspensão, sem achados de toxicidade local.

Apesar de a HCQ apresentar excreção renal predominante, um estudo de coorte retrospectivo com pacientes lúpicos e doença renal avançada foi inconclusivo quanto à nefrotoxicidade e a necessidade de ajuste de dose neste estágio de acometimento (78). Estudo em modelo murino de LES evidenciou prevenção de proteinúria e injúria renal com o uso diário da medicação (79). Em nosso estudo, observamos um aumento do nível plasmático de creatinina após o período de tratamento com a medicação, sem, entretanto, caracterizar injúria renal.

Algumas limitações do nosso estudo devem ser destacadas. Primeiramente, o número de pacientes incluídos é pequeno, o que pode ser justificado pela raridade da SAF primária. Apesar do número, o estudo teve poder suficiente para demonstrar o efeito da HCQ no perfil imunológico e bioquímico dos pacientes com SAF primária.

Segundo, as análises do perfil hemostático foram comprometidas pelo fato dos pacientes estarem em uso de anticoagulantes e, como discutido acima, a retirada do anticoagulante para a realização de testes da coagulação não poderia ser realizada por questões éticas. Terceiro, analisando nossos resultados, observamos que o período de seis meses estabelecido como *wash out* pode ter sido insuficiente para que o efeito da HCQ fosse dissipado, isso porque os níveis de alguns parâmetros ao início do período sem HCQ permaneciam alterados, aparentemente por um efeito residual do tratamento com HCQ. Um estudo chinês que objetivava analisar a farmacocinética da HCQ em uma formulação de referência de HCQ constatou o longo tempo de meia-vida da droga, porém não há evidência em literatura sobre a quantificação temporal da duração dos seus efeitos após sua descontinuidade (80). É possível, portanto, que o desenho do estudo não seja adequado para avaliar os efeitos da HCQ caso a droga tenha um efeito residual que se mantenha por tempo prolongado após a suspensão do tratamento. Finalmente, os desfechos deste estudo são intermediários, e estudos que avaliem desfechos clínicos são necessários para estabelecer o papel da HCQ no tratamento da SAF primária.

7. CONCLUSÃO

Através da avaliação comparativa dos parâmetros de coagulação, quantificação de linfócitos T, B e TREG por citometria de fluxo e análise de condições metabólicas entre os períodos com e sem HCQ, pudemos descrever efeitos da droga nos sistemas imunológico e hemostático nos pacientes com SAF primária. Houve ação imunomoduladora especialmente às custas da supressão dos linfócitos CD8+ e CD4+ e aumento quantitativo dos linfócitos TREGs, em acordo com o descrito na literatura, ainda que em pacientes com diagnóstico de LES associado. Não observamos, entretanto, uma regulação da hipercoagulabilidade uma vez que os parâmetros da coagulação estudados não sofreram variação com o tratamento. Finalmente, observamos um efeito hipolipemiante da HCQ que, apesar de não ter por ora justificativa biológica, já foi descrito também no contexto de outras doenças autoimunes.

Concluimos, dessa maneira, que há uma ação imunomoduladora da HCQ que possivelmente contribui com a atividade autoimune da SAF, com alteração da quantificação especialmente de linfócitos T CD8, CD4 e TREG circulantes. Além

disso, ainda que a modulação da atividade pró-coagulante não tenha sido observada, o efeito da medicação sobre o perfil metabólico dos pacientes, especialmente o metabolismo lipídico, pode ter algum papel como profilaxias primária e secundária para eventos trombóticos eventuais. Entretanto, esse possível efeito deve ser confirmado em estudos futuros.

Julgamos necessário, por fim, estudos com desfecho clínico para avaliar a eficácia da HCQ na prevenção da trombose na SAF primária e confirmar a potencialidade da HCQ como droga de tratamento em pacientes com diagnóstico de SAF primária, associada à anticoagulação oral já amplamente estabelecida.

8. REFERÊNCIAS

1. Gardiner C, Hills J, MacHin SJ, Cohen H. Diagnosis of antiphospholipid syndrome in routine clinical practice. *Lupus*. 2013;22(1):18–25.
2. Meroni PL, Borghi MO, Raschi E, Tedesco F. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: Understanding the antibodies. *Nat Rev Rheumatol*. 2011;7(6):330–9.
3. 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.
4. Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, et al. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. *J Thromb Haemost*. 2009;7(10):1737–40.
5. Pengo V, Ruffatti A, Legnani C, Gresele P, Barcellona D, Erba N, et al. Clinical course of high-risk patients diagnosed with antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost*. 2010;8(2):237–42.
6. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med*. 2008;359(9):938–49.
7. Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost*. 2001;85(6):958–65.
8. Brummel KE, Paradis SG, Butenas S, Mann KG. Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation. *Blood*. 2002;100(1):148–52.
9. Chapin JC, Hajjar KA. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev*. 2015;29(1):17–24.
10. Maria L, Ana S. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações A cell-based model of coagulation and its implications *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*.(55 31).
11. Cervera R, Piette J-C, Font J, Khamashta MA, Shoenfeld Y, Camps MT, et al. Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis Rheum*. 2002;46(4):1019–27.
12. Clark KEN, Giles I. Antiphospholipid syndrome. *Med (United Kingdom)*. 2018;46(2):118–25.

13. Shi BW, Chong H. Activated Platelets: Differences With Lupus Anticoagulants. *Blood*. 1993;81:1255–62.
14. Meroni PL, Raschi E, Testoni C. Endothelium as a target for anti-phospholipid antibodies and for therapeutical intervention. *Autoimmun Rev*. 2002;1(1–2):55–60.
15. Lim, W. Antiphospholipid antibody syndrome. *ASH Education Book*. 2009; 1:233-39.
16. Wurm H. B2-glycoprotein I (apolipoprotein H) interactions with phospholipid vesicles. *Int J Biochem*, 1984; 16, p.511–5.
17. Hanly JG. Antiphospholipid syndrome: An overview. *Cmaj*. 2003;168(13):1675–82.
18. Kobayashi K, Kishi M, Atsumi T, Bertolaccini ML, Makino H, Sakairi N, et al. Circulating oxidized LDL forms complexes with β 2 -glycoprotein I . *J Lipid Res*. 2003;44(4):716–26.
19. Ramos-Leví AM, Marazuela M. Patogenia de la enfermedad tiroidea autoinmune: papel de los mecanismos celulares. *Endocrinol y Nutr*. 2016;63(8):421–9.
20. Yamaguchi T, Wing JB, Sakaguchi S. Two modes of immune suppression by Foxp3⁺ regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions. *Semin Immunol*. 2011;23(6):424–30.
21. Espinosa G, Cervera R. Antiphospholipid syndrome: Frequency, main causes and risk factors of mortality. *Nat Rev Rheumatol*. 2010;6(5):296–300.
22. Botelho, IM. Vitamina D em doenças tireoidianas autoimunes e relação com perfil hormonal tireodiano e atividade inflamatória de células Th1, Th2 e Th17. [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas; 2018.
23. Hirano T. Interleukin-6 and its relation to inflammation and disease. *Clin Immunol Immunopathol*. 1992;62(1 PART 1):17–22.
24. Fanopoulos D, Teodorescu MR, Varga J, Teodorescu M. High frequency of abnormal levels of IgA anti- β 2 -glycoprotein I antibodies in patients with systemic lupus erythematosus: Relationship with antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol*. 1998;25(4):675–80.
25. Itoh K, Hirohata S, Sims GP, Sheng C, Phillips TM, Lipsky PE, et al. The role of IL-10 in human B cell activation, proliferation, and differentiation. *J Immunol*.

- 1995;154(9):4341–50.
26. Turiel M, Sarzi-Puttini P, Peretti R, Rossi E, Atzeni F, Parsons W, et al. Thrombotic risk factors in primary antiphospholipid syndrome: A 5-Year prospective study. *Stroke*. 2005;36(7):1490–4.
 27. Crowther MA, Ginsberg JS, Julian J, Denburg J, Hirsh J, Douketis J, et al. A Comparison of Two Intensities of Warfarin for the Prevention of Recurrent Thrombosis in Patients with the Antiphospholipid Antibody Syndrome. *N Engl J Med*. 2003;349(12):1133–8.
 28. Finazzi G, Brancaccio V, Schinco P, Wisloff F, Musial J, Baudo F, et al. A randomized clinical trial of high-intensity warfarin vs. conventional antithrombotic therapy for the prevention of recurrent thrombosis in patients with the antiphospholipid syndrome (WAPS). *J Thromb Haemost*. 2005;3(5):848–53.
 29. Belizna C. Hydroxychloroquine as an anti-thrombotic in antiphospholipid syndrome. *Autoimmun Rev*. 2015;14(4):358–62.
 30. Ruiz-Irastorza G, Cuadrado MJ, Ruiz-Arruza I, Brey R, Crowther M, Derksen R, et al. Evidence-based recommendations for the prevention and long-term management of thrombosis in antiphospholipid antibody-positive patients: Report of a Task Force at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. *Lupus*. 2011;20(2):206–18.
 31. Hu C, Lu L, Wan J-P, Wen C. The Pharmacological Mechanisms and Therapeutic Activities of Hydroxychloroquine in Rheumatic and Related Diseases. *Curr Med Chem*. 2017;24(20):2241–9.
 32. Rand JH, Wu XX, Quinn AS, Chen PP, Hathcock JJ, Taatjes DJ. Hydroxychloroquine directly reduces the binding of antiphospholipid antibody- β 2-glycoprotein I complexes to phospholipid bilayers. *Blood*. 2008;112(5):1687–95.
 33. Johnson R, Gharnley J. Hydroxychloroquine in Prophylaxis of Pulmonary Embolism Following Hip Arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res*. 1979;NA;(144):174-77.
 34. Wallace DJ. Does hydroxychloroquine sulfate prevent clot formation in systemic lupus erythematosus? *Arthritis Rheum*. 1987;30(12):1435–6.
 35. Ruiz-Irastorza G, Egurbide M V., Pijoan JI, Garmendia M, Villar I, Martinez-Berriotxo A, et al. Effect of antimalarials on thrombosis and survival in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2006;15(9):577–83.
 36. Hsu CY, Lin YS, Su YJ, Lin HF, Lin MS, Syu YJ, et al. Effect of long-term

- hydroxychloroquine on vascular events in patients with systemic lupus erythematosus: A database prospective cohort study. *Rheumatol (United Kingdom)*. 2017;56(12):2212–21.
37. Petri M. Hidroxychloroquine use in Blatimore lúpus cohort: effects on lipids, glucose and thrombosis. *Lupus*. 1996; 5 (Supp1):S16-22.
 38. Keeling D, Mackie I, Moore GW, Greer IA, Greaves M. Guidelines on the investigation and management of antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol*. 2012;157(1):47–58.
 39. Schmidt-Tanguy A, Voswinkel J, Henrion D, Subra J, Loufrani L, Rohmer V, et al. Anti-thrombotic effects of hydroxychloroquine in primary antiphospholipid syndrome patients. *J Thromb Haemost*. 2013;n/a-n/a.
 40. Nuri E, Taraborelli M, Andreoli L, Tonello M, Gerosa M, Calligaro A, et al. Long-term use of hydroxychloroquine reduces antiphospholipid antibodies levels in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Immunol Res*. 2017;65(1):17–24.
 41. Erkan D, Unlu O, Sciascia S, Belmont HM, Branch DW, Cuadrado MJ, et al. Hydroxychloroquine in the primary thrombosis prophylaxis of antiphospholipid antibody positive patients without systemic autoimmune disease. *Lupus*. 2018;27(3):399–406.
 42. Reiffel JA. Time in the Therapeutic Range for Patients Taking Warfarin in Clinical Trials: Useful, but Also Misleading, Misused, and Overinterpreted. *Circulation*. 2017;135(16):1475–7.
 43. Gottenberg JE, Ravaud P, Puéchal X, Le Guern V, Sibilia J, Goeb V, et al. Effects of hydroxychloroquine on symptomatic improvement in primary sjögren syndrome: The JOQUER randomized clinical trial. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2014;312(3):249–58.
 44. da Silva Saraiva S, de Moraes Mazetto B, Quinteiro Tobaldine L, Pereira Colella M, Vinícius De Paula E, Annichinno-Bizzachi J, et al. The impact of antibody profile in thrombosis associated with primary antiphospholipid syndrome. *Am J Hematol*. 2017;92(11):1163–9.
 45. Dal Ben ERR, Do Prado CH, Baptista TSA, Bauer ME, Staub HL. Decreased levels of circulating CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in patients with primary antiphospholipid syndrome. *J Clin Immunol*. 2013;33(4):876–9.
 46. J.E. S, Ph.G. DG. Pathogenic role of antiphospholipid antibodies. *Lupus*.

- 2008;17(5 SPEC. ISS.):405–11.
47. Arachchillage DRJ, Mackie IJ, Efthymiou M, Chitolie A, Hunt BJ, Isenberg DA, et al. Rivaroxaban limits complement activation compared with warfarin in antiphospholipid syndrome patients with venous thromboembolism. *J Thromb Haemost.* 2016;14(11):2177–86.
 48. Lai Z wei, Marchena-Mendez I, Perl A. Oxidative stress and Treg depletion in lupus patients with anti-phospholipid syndrome. *Clin Immunol.* 2015;158(2):148–52.
 49. Habibagahi M, Habibagahi Z, Jaberipour M, Aghdashi A. Quantification of regulatory T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int.* 2011;31(9):1219–25.
 50. Cepika AM, Marinic I, Morovic-Vergles J, Soldo-Juresa D, Gagro A. Effect of steroids on the frequency of regulatory T cells and expression of FOXP3 in a patient with systemic lupus erythematosus: a two-year follow-up. *Lupus.* 2007;16(5):374–7.
 51. Karakantza M, Theodorou GL, Meimaris N, Mouzaki A, John E, Andonopoulos AP, et al. Type 1 and type 2 cytokine-producing CD4⁺ and CD8⁺ T cells in primary antiphospholipid syndrome. *Ann Hematol.* 2004;83(11):704–11.
 52. Blank M, Tomer Y. Induction of Tolerance to Experimental Anti-Phospholipid Syndrome (APS) by Syngeneic Bone Marrow Cell Transplantation. *Scand. J. Immunol.* 1995; 42, 226–34.
 53. Hattori N, Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, Ikeda Y, Kawakami Y. T cells that are autoreactive to β 2-glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome and healthy individuals. *Arthritis Rheum.* 2000;43(1):65–75.
 54. Arai T, Yoshida K, Kaburaki J, Inoko H, Ikeda Y, Kawakami Y, et al. Autoreactive CD4⁺ T-cell clones to β 2-glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome: Preferential recognition of the major phospholipid-binding site. *Blood.* 2001;98(6):1889–96.
 55. Krause I, Blank M, Levi Y, Koike T, Barak V, Shoenfeld Y. Anti-idiotypic immunomodulation of experimental anti-phospholipid syndrome via effect on Th1/Th2 expression. *Clin Exp Immunol.* 1999;117(1):190–7.
 56. Ito H, Matsushita S, Tokano Y, Nishimura H, Tanaka Y, Fujisao S, et al. Analysis of T cell responses to the β 2 -glycoprotein I-derived peptide library in patients with anti- β 2 -glycoprotein I antibody-associated autoimmunity. *Hum*

- Immunol. 2000;61(4):366–77.
57. Visvanathan S, McNeil HP. Cellular immunity to beta 2-glycoprotein-1 in patients with the antiphospholipid syndrome. *J Immunol.* 1999;162(11):6919–25.
 58. Soltesz P, Der H, Veres K, Laczik R, Sipka S, Szegedi G, et al. Immunological features of primary anti-phospholipid syndrome in connection with endothelial dysfunction. *Rheumatology.* 2008;47(11):1628–34.
 59. Krause I, Blank M, Sherer Y, Gilburd B, Kvapil F. Induction of oral tolerance in experimental antiphospholipid syndrome by feeding with polyclonal immunoglobulins. 2002;3414–24.
 60. Kapsogeorgou EK, Tzioufas AG. Autoantibodies in Autoimmune Diseases: Clinical and Critical Evaluation. *Isr Med Assoc J.* 2016 Sep;18(9):519-24.
 61. Schreiber K, Breen K, Parmar K, Rand JH, Wu XX, Hunt BJ. The effect of hydroxychloroquine on haemostasis, Complement, Inflammation and angiogenesis in patients with antiphospholipid antibodies. *Rheumatol (United Kingdom).* 2018;57(1):120–4.
 62. Achuthan S, Ahluwalia J, Shafiq N, Bhalla A, Pareek A, Chandurkar N, et al. Hydroxychloroquine's efficacy as an antiplatelet agent study in healthy volunteers: A proof of concept study. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2015;20(2):174–80.
 63. Rand JH, Wu X-X, Quinn AS, Ashton AW, Chen PP, Hathcock JJ, et al. 1. Rand JH, Wu X-X, Quinn AS, 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):2292-99.
 64. Boone BA, Murthy P, Miller-Ocuin J, Doerfler WR, Ellis JT, Liang X, et al. Chloroquine reduces hypercoagulability in pancreatic cancer through inhibition of neutrophil extracellular traps. *BMC Cancer.* 2018;18(1):1–12.
 65. Saraiva SDS, Custódio IF, Mazetto BDM, Collela MP, De Paula EV, Appenzeller S, et al. Recurrent thrombosis in antiphospholipid syndrome may be associated with cardiovascular risk factors and inflammatory response. *Thromb Res.* 2015;136(6):1174–8.
 66. Sciascia S, Sanna G, Murru V, Roccatello D, Khamashta MA, Bertolaccini ML. GAPSS: The global anti-phospholipid syndrome score. *Rheumatol (United Kingdom).* 2013;52(8):1397–403.

67. da Silva FF, Levy RA, de Carvalho JF. Cardiovascular Risk Factors in the Antiphospholipid Syndrome. *J Immunol Res*. 2014;2014:1–6.
68. Cairoli E, Rebella M, Danese N, Garra V, Borba EF. Hydroxychloroquine reduces low-density lipoprotein cholesterol levels in systemic lupus erythematosus: a longitudinal evaluation of the lipid-lowering effect. *Lupus*. 2012;21(11):1178–82.
69. Bili A, Sartorius JA, Kirchner HL, Morris SJ, Ledwich LJ, Antohe JL, et al. Hydroxychloroquine use and decreased risk of diabetes in rheumatoid arthritis patients. *J Clin Rheumatol*. 2011;17(3):115–20.
70. Rainsford KD, Parke AL, Clifford-Rashotte M, Kean WF. Therapy and pharmacological properties of hydroxychloroquine and chloroquine in treatment of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and related diseases. *Inflammopharmacology*. 2015;23(5):231–69.
71. Rekedal LR, Massarotti E, Garg R, Bhatia R, Gleeson T, Lu B, et al. Changes in glycosylated hemoglobin after initiation of hydroxychloroquine or methotrexate treatment in diabetes patients with rheumatic diseases. *Arthritis Care Res*. 2010;62(12):3569–73.
72. Floris A, Piga M, Mangoni AA, Bortoluzzi A, Erre GL, Cauli A. Protective Effects of Hydroxychloroquine against Accelerated Atherosclerosis in Systemic Lupus Erythematosus. *Mediators Inflamm*. 2018;2018:1–11.
73. Hung YM, Wang YH, Lin L, Wang PYP, Chiou JY, Wei JCC. Hydroxychloroquine may be associated with reduced risk of coronary artery diseases in patients with rheumatoid arthritis: A nationwide population-based cohort study. *Int J Clin Pract*. 2018;72(5):1–10.
74. Hu C, Lu L, Wan J-P, Wen C. The Pharmacological Mechanisms and Therapeutic Activities of Hydroxychloroquine in Rheumatic and Related Diseases. *Curr Med Chem*. 2017;24(20):2241–9.
75. Rainsford KD, Parke AL, Clifford-Rashotte M, Kean WF. Therapy and pharmacological properties of hydroxychloroquine and chloroquine in treatment of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and related diseases. *Inflammopharmacology*. 2015;23(5):231–69.
76. Geamănu Pancă A, Popa-Cherecheanu A, Marinescu B, Geamănu CD, Voinea LM. Retinal toxicity associated with chronic exposure to hydroxychloroquine and its ocular screening. Review. *J Med Life*. 2014;7(3):322–6.

77. Costedoat-Chalumeau N, Dunogu   B, Leroux G, Morel N, Jallouli M, Le Guern V, et al. A Critical Review of the Effects of Hydroxychloroquine and Chloroquine on the Eye. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2015;49(3):317–26.
78. Bethel M, Yang FM, Li S. Hydroxychloroquine in patients with systemic lupus erythematosus with end-stage renal disease. *J Investig Med*. 2016 Apr;64(4):908-10.
79. Gómez-Guzmán M, Jiménez R, Romero M, Sánchez M, Zarzuelo MJ, Gómez-Morales M, et al. Chronic hydroxychloroquine improves endothelial dysfunction and protects kidney in a mouse model of systemic lupus erythematosus. *Hypertension*. 2014;64(2):330–7.
80. Fan H, Ma Z, Chen J, Yang X, Cheng J, Li Y. Pharmacokinetics and Bioequivalence Study of Hydroxychloroquine Sulfate Tablets in Chinese Healthy Volunteers by LC–MS/MS. *Rheumatol Ther*. 2015;2(2):183–95.

ANEXO I – Aprovação da Comissão de Ética

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo do papel da hidroxicloroquina na imunomodulação e no controle da hipercoagulabilidade em pacientes com diagnóstico de síndrome antifosfolípide

Pesquisador: Sabrina da Silva Saraiva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 32201014.9.0000.5404

Instituição Proponente: Centro de Hematologia e Hemoterapia - HEMOCENTRO

Patrocinador Principal: Centro de Hematologia e Hemoterapia - HEMOCENTRO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 729.220

Data da Relatoria: 28/07/2014

Apresentação do Projeto:

Resumo: A síndrome antifosfolípide (SAF) é uma doença autoimune pró-trombótica, caracterizada pela ocorrência de trombose ou complicações gestacionais; suas manifestações ocorrem pela ação de anticorpos antifosfolípidos. Estes autoanticorpos tem como alvo principal proteínas plasmáticas, em particular a beta2-glicoproteína I (2GPI), que se ligam a membranas lipídicas de diversas células, como plaquetas e células endoteliais. Embora os mecanismos fisiopatogênicos da trombose na SAF sejam desconhecidos, a ação dos anticorpos antifosfolípidos pode provocar o estímulo a várias vias da coagulação, como a ativação de plaquetas, o aumento da expressão do fator tecidual e a ativação da cascata da coagulação. A apresentação clínica da SAF é heterogênea, com complicações trombóticas, obstétricas ou mistas. O diagnóstico baseia-se na detecção de pelo menos um critério clínico, que é a presença de trombose vascular ou morbidade obstétrica, e um critério laboratorial, que é a positividade persistente de 1 dos 3 testes: anticoagulante lúpico, anticardiolipina em altos títulos ou anticorpo anti-beta2 glicoproteína. O tratamento atual é sintomático e está baseado na profilaxia dos eventos trombóticos com terapia anticoagulante. Porém, é possível que tratamentos que alterem a resposta imune, como imunossuppressores e imunomoduladores, tenham papel no controle das manifestações da doença.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

**FACULDADE DE CIENCIAS
MEDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)**



Continuação do Parecer: 729.220

Nesse contexto, o emprego da hidroxicloroquina (HCQ) vem sendo discutida, na literatura médica, como tratamento complementar à anticoagulação oral nos casos de SAF. A HCQ é eficaz no tratamento de doenças autoimunes por mecanismos de ação ainda pouco elucidados. Em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES), a HCQ pode prevenir reativações da doença e diminuir a incidência de trombose, porém, ainda não há evidências clínicas da eficácia da medicação nos casos de SAF. Este estudo tem o objetivo de avaliar o impacto clínico do uso da HCQ nos pacientes com SAF. Para tal, propomos associar o tratamento com HCQ à terapia anticoagulante convencional, em uma coorte de pacientes com SAF primário. Serão avaliados o perfil imunológico e marcadores de hipercoagulabilidade antes e após o início do tratamento com HCQ, e a avaliação desses parâmetros será utilizada para evidenciar se a HCQ pode promover controle da resposta imune e também controle adicional da atividade pró-coagulante nos pacientes com SAF primário.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: O objetivo primário deste estudo é avaliar o impacto clínico do uso da HCQ, como terapia complementar à anticoagulação, no tratamento de pacientes com SAF. O impacto clínico do tratamento será avaliado pelo perfil imunológico e de parâmetros de coagulação em uma coorte de pacientes com SAF primário pré e pós-tratamento com HCQ.

Objetivo Secundário: 1. Avaliar parâmetros da coagulação através da quantificação dos níveis plasmáticos do fator tecidual e da determinação do valor do dímero-D no plasma pré, após 6 meses e após 12 meses do uso de HCQ 2. Quantificar linfócitos T, B e TREG nos pacientes pré, após 6 meses e após 12 meses do uso de HCQ 3. Dosar os níveis séricos de PCR, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 nos pacientes pré, após 6 meses e após 12 meses do uso de HCQ. 4. Correlacionar os parâmetros imunológicos estudados com o tipo e titulação do anticorpo presente, e com a apresentação clínica da doença e presença de comorbidades associadas a risco cardio-reno-vascular (obesidade, dislipidemia, diabetes, hipertensão).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os riscos a que o paciente estará sujeito ao participar da coleta são hematoma e/ou pequena dor no local da punção venosa. Além disso, pode haver alguma reação adversa medicamentosa relacionada à HCQ, tais como: toxicidade ocular, neuromiopia, ototoxicidade, convulsão, depressão da medula óssea, cardiomiopia, sintomas gastrointestinais, cefaleia, prurido e reações urticariformes. **Benefícios:**

Possibilidade de melhora em perfis imunológico e pró-coagulante do paciente, com

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

**FACULDADE DE CIENCIAS
MEDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)**



Continuação do Parecer: 729.220

melhor potencial de controle da doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pendências emitidas em parecer anterior:

Sobre o estudo:

1)Este é um estudo fase 2, com custo previsto de R\$ 38.500,00 e descrição de financiamento próprio.

Apresentar forma de financiamento da pesquisa.

RESPOSTA: O laboratório de Pesquisa em Hemostasia do Hemocentro-UNICAMP dispõe do convênio nº 630AIU, cuja verba é fornecida por empresa particular e administrada pela FUNCAMP. Essa verba é suficiente para os custos planejados em nosso orçamento". PENDÊNCIA RESOLVIDA.

2)Apesar de informar que haverá ressarcimento se o paciente vier à instituição apenas para a pesquisa, não consta este valor no planejamento de custos.

RESPOSTA: Foram incluídos os valores estimados, referentes a possíveis ressarcimentos com transporte e alimentação (R\$5000,00). foram adicionados, ainda, o custo da medicação hidroxycloquina a ser disponibilizada aos pacientes durante o período da pesquisa (R\$ 15000,00)". PENDÊNCIA RESOLVIDA.

3)Coloca gravidez como critério de exclusão, mas não informa se haverá comprovação deste dado antes do início do tratamento.

RESPOSTA "Incluímos, como critério de seleção dos pacientes, a avaliação inicial de mulheres em idade fértil com HCG plasmático, considerando a gestação como critério de exclusão. Tal exame poderá ser repetido em qualquer fase do estudo na suspeita de estado gravídico". PENDÊNCIA RESOLVIDA.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os seguintes termos foram apresentados, em acordo com os preceitos da res. 466-2012 e Res. 441-2011:

- Folha de rosto assinada pela coordenação do HEMOCENTRO-UNICAMP.
- Regulamento de biorrepositório, identificando o projeto associado e profissionais responsáveis pela guarda do material biológico.
- TCLE reformulado, com identificação do pesquisador, linguagem acessível ao participante, esclarecimentos sobre participação voluntária,confidencialidade, descrição dos procedimentos, seus riscos e possíveis benefícios. Foi colocado objetivamente a independência do participante de

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: oep@fcm.unicamp.br

**FACULDADE DE CIENCIAS
MEDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)**



Continuação do Parecer: 729.220

se retirar da pesquisa sem detrimento da assistência à sua saúde.

- Projeto detalhado e formulário gerado pela plataforma brasil.
- 2 Anexos, referentes à ficha e acompanhamento dos pacientes.
- carta de anuência e compromisso com o estudo, emitida pelo responsável pelo ambulatório de hemostasias.
- bula do medicamento, com registro MS MS. 1.1300.1000. A consulta no site da ANVISA informa deferimento do produto até 01-2016.

Recomendações:

—

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto considerado aprovado, após resolução satisfatória de todas as pendências.

Em reunião do colegiado de 22-07-2014.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

- Se o TCLE tiver mais de uma página, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, e o pesquisador responsável deverão rubricar todas as folhas desse documento, apondo suas assinaturas na última página do referido termo (Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS).
- Cabe ao pesquisador desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado, elaborar e apresentar os relatórios parciais e final, bem como encaminhar os resultados para publicação com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto (Resolução 466/2012 CNS/MS). Os relatórios deverão ser enviados através da Plataforma Brasil- ícone Notificação.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo deverão ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada (com destaque) e suas justificativas. As modificações deverão ter parecer de aprovação deste CEP antes de serem implementadas.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIENCIAS
MEDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



Continuação do Parecer: 729.220

CAMPINAS, 27 de Julho de 2014

Assinado por:

Fátima Aparecida Bottcher Luiz
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

ANEXO II - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pacientes

Título do Projeto: Estudo do papel da hidroxiclороquina na imunomodulação e no controle da hipercoagulabilidade em pacientes com diagnóstico de síndrome antifosfolípide

Responsáveis pelo projeto: Dra Sabrina da Silva Saraiva

Dra. Fernanda Loureiro de Andrade Orsi

Profa. Dra. Simone Appenzeller

Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi

Eu, _____,
 Idade: _____, RG: _____, HC/AIH/RH: _____;
 ou em caso de menores e incapazes, o responsável legal,
 _____,
 RG: _____, responsável pelo(a) menor ou incapaz
 _____, Idade: _____,
 RG: _____, Grau de Parentesco: _____,
 Residente _____ à _____ Rua/Av.

 CEP: _____, Telefones: _____,
 concordo em participar, ou que o paciente participe, do presente estudo, após estar absolutamente esclarecido (a) dos propósitos do mesmo.

Este estudo pretende avaliar o efeito terapêutico da hidroxiclороquina nas alterações imunológicas e hemostáticas que podem estar envolvidas na ocorrência de trombose em uma doença grave, chamada síndrome antifosfolípide (SAF). Nestas doenças, o risco de tromboses e suas complicações hemorrágicas são grandes e o emprego de uma medicação imunossupressora, como a hidroxiclороquina, pode acrescentar benefícios ao tratamento anticoagulante. Fatores ligados a imunidade e a coagulação serão dosados antes e após 6 meses e 12 meses do uso da hidroxiclороquina. Os resultados da dosagem desses fatores serão comparados com a evolução clínica dos

doentes durante o tempo de vigência deste estudo. O tratamento anticoagulante continuará durante o estudo, o tratamento com hidroxicloroquina será acrescentado. Caso o Sr(a) não queira participar do estudo, o tratamento convencional contra sua doença está garantido e não sofrerá nenhum prejuízo nesta Instituição.

Caso o Sr (a) concorde em participar do estudo, deverá iniciar o tratamento com hidroxicloroquina 400 mg por via oral, diariamente, adquirido por meios próprios. O controle clínico do seu tratamento será realizado mensalmente no ambulatório de Hemostasia do Hemocentro da UNICAMP, mantendo a rotina já estabelecida para controle de sua anticoagulação, sem proposta de visitas adicionais ao serviço. Antes do tratamento, e a cada 6 meses até completar 1 ano, o Sr(a) deverá coletar 20mL de sangue para que as análises laboratoriais, que vão detectar os efeitos da hidroxicloroquina no seu organismo, seja realizadas.

Os riscos a que o Sr(a) estará sujeito ao participar da coleta são hematoma (mancha roxa) e/ou pequena dor no local da punção venosa. Este estudo não oferecerá a(o) senhor(a) nenhum outro risco importante. A hidroxicloroquina é uma medicação segura, amplamente utilizada em outras doenças, que pode acarretar os seguintes efeitos colaterais: toxicidade ocular, neuromiopia, ototoxicidade, convulsão, depressão da medula óssea, cardiomiopatia, sintomas gastrointestinais, dor de cabeça, prurido.

Sua participação no estudo contribuirá para a avaliação de um tratamento que pode ser mais eficaz para os casos de SAF.

Outras informações:

1. O (a) senhor (a) estará livre para negar-se a participar do estudo ou desistir do estudo a qualquer tempo, mesmo que inicialmente tenha concordado em fazê-lo.
2. Caso o (a) senhor (a) não concorde ou desista, a qualquer momento, de participar do estudo, não haverá nenhum prejuízo ao tratamento da sua doença em curso ou da doença que afeta o(a) menor ou incapaz por quem o(a) senhor(a) é responsável.
3. O (a) senhor (a) poderá tirar todas as dúvidas que tiver, ou que apareçam durante o estudo, sobre o mesmo, havendo o compromisso do pesquisador em respondê-las.
4. O material sanguíneo plasma colhido neste estudo será utilizado somente para os objetivos propostos e gostaríamos de saber se o senhor (a) concorda que seu plasma possa ser armazenado.

☐ Sim ☐ Não

5. O seu sangue armazenado ficará disponível no biorrepositório de amostras biológicas do Laboratório de Hemostasia e Biologia Molecular do Hemocentro de Campinas/ UNICAMP.
6. Todas as informações obtidas pelo estudo terão um caráter sigiloso e confidencial e serão usadas apenas com a finalidade de divulgação e publicação científica, e a identidade dos participantes será sempre preservada.
7. A sua discordância em participar do estudo não acarretará a(o) senhor(a) prejuízo em qualquer outro tratamento ou procedimento que possa necessitar futuramente em qualquer serviço de nosso hospital.

Qualquer tipo de queixa ou reclamação relacionada a esta pesquisa o senhor (a) poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCM-UNICAMP (Fone: 19-3521-8936)

ANEXO III – Avaliação dos pacientes com SAF e trombose



Avaliação do Paciente com Histórico e Trombose			
Nome do Paciente:			Nº de cadastro:
HC:	Sexo: ☐ Feminino 0 ☐ Masculino 1		
Idade na época da trombose:		Data de Nascimento:	
Data do diagnóstico da trombose: ____/____/____			
Data da coleta dos dados: ____/____/____			
Forma de coleta de dados: ☐ Paciente+revisão do prontuário-0 ☐ Somente através da revisão do prontuário-1			
Endereço:		nº compl.	
Cidade/ estado:		Telefone ()	Celular:()
E-mail:		Profissão:	
Escolaridade: ☐ ausente 0 ☐ 1o Grau 1 ☐ 2o Grau 2 ☐ 3o Grau 3			
Origem étnica: ☐ Branco 0 ☐ Afr descendente 1 ☐ Oriental 2 ☐ Outros 3:			
Tipo de trombose: ☐ TEV 0 ☐ OAA 1 ☐ IAM 2			Número de episódios:
Locais de ocorrência:		TV Cerebral ☐ 13	Sem Informação ☐ 20
MIE distal ☐ 1	TEP ☐ 7	TV Mesent ☐ 14	TVP outras localizações ☐ 21
MIE prox ☐ 2	TV Cava ☐ 8	TV Esplênica ☐ 15	AVC indeterminado ☐ 22
MID distal ☐ 3	TV porta ☐ 9	TVS MIE ☐ 16	TIA ☐ 23
MID prox ☐ 4	TV retina ☐ 10	TVS MID ☐ 17	AVC arterial ☐ 24
MSE ☐ 5	TV Renal ☐ 11	TVS MSE ☐ 18	TA retina ☐ 25
MSD ☐ 6	TV SNC ☐ 12	TVS MSD ☐ 19	TA Renal ☐ 26
Característica: ☐ Espontânea- 0 ☐ Provocada -1 Confirmação por imagem: ☐ Sim-0 ☐ Não-1			
Fatores desencadeantes ou doenças associadas à época da trombose:			
Imobilização nos 3 meses prévios : 1 ☐ Sim ☐ Não			
Pequenos traumas de membros inferiores (nas 2 semanas prévias) 2 ☐ Sim ☐ Não			
Internação por motivos clínicos por mais de 3 dias (nos 3 meses prévios) 3 ☐ Sim ☐ Não			
Infecção (abscesso) localizada próximo à trombose 4 ☐ Sim ☐ Não			
Viagens nas últimas duas semanas ☐ Avião-5 ☐ Carro-6 ☐ Ônibus-7 ☐ Trem-8			
Duração da viagem: _____ horas			
Cirurgia (c/ mais de 30 minutos de duração anestesia geral, peridural ou raqui nos últimos 3 meses) 9 ☐ Sim ☐ Não			
Quimioterapia (nos 3 meses prévios): 10 ☐ Sim ☐ Não			
Neoplasia em atividade ou no último ano: 11 ☐ Sim ☐ Não			
Doença autoimune: 12 ☐ Sim ☐ Não			
Uso de anticoncepcional (uso no momento da TEV) 13 ☐ Sim ☐ Não - Tempo: Qual:			
Terapia de reposição hormonal (atual): 14 ☐ Sim ☐ Não			
Estímulo hormonal para coleta de óvulos 15 ☐ Sim ☐ Não			



Período gestacional: 16 ☐ Sim ☐ Não			
☐ 1º trimestre 17 ☐ 2º trimestre 18 ☐ 3º trimestre 19			
Pós-parto (até 3 meses): 20 ☐ Sim ☐ Não Tipo: ☐ Vaginal 21 ☐ Cesariana 22			
Neoplasia mieloproliferativa: 23 ☐ Sim ☐ Não			
Hemoglobinúria Paroxística Noturna: 24 ☐ Sim ☐ Não			
Presença de cateter venoso central no sítio da trombose: 25 ☐ Sim ☐ Não			
Púrpura trombocitopênica trombótica: 26 ☐ Sim ☐ Não			
Insuficiência cardíaca congestiva grave (Classe III ou IV) 27 ☐ Sim ☐ Não			
Síndrome nefrótica: 28 ☐ Sim ☐ Não			
Má formação vascular: (hemangioma gigante) 29 ☐ Sim ☐ Não			
Doenças infecciosas nos 3 meses que antecederam a TEV sem internação 30 ☐ Sim ☐ Não			
☐ Pneumonia 31 ☐ Cistite 32 ☐ Pielonefrite 33 ☐ Sinusite 34 ☐ Otite 35 ☐ de Garganta 36 ☐ Gripe 37			
☐ Artrite 38 ☐ Bursite 39 ☐ Erisipela 40 ☐ Celulite 41 ☐ HIV Positivo 42 ☐ Dengue 43			
☐ Outros 44 :			
Tromboflebite nos últimos 3 meses:(comprovada por método imagem) 45 ☐ Sim ☐ Não			
☐ Não tratou 46 ☐ anti-inflamatório 47 ☐ anticoagulante oral 48 ☐ heparina 49			
Comorbidades			
Diabetes mellitus: 1 ☐ Sim ☐ Não			
Disfunção hepática: 2 ☐ Sim ☐ Não			
Dislipidemia: 3 ☐ Sim ☐ Não			
Ins. Renal: 4 ☐ Sim ☐ Não			
HAS: 5 ☐ Sim ☐ Não			
Cirurgia prévia 6 : ☐ Sim ☐ Não			
História Gestacional:			
Gestações__ Partos__ Abortos__ Nascidos Vivos__ Nascidos Mortos__			
Complicações gestacionais: ☐ Sim ☐ Não 0			
☐ HAS 1 ☐ DM 2 ☐ pré eclâmpsia 3 ☐ eclâmpsia 4 ☐ síndrome HELLP 5 ☐ RCIU 6 ☐ parto prematuro 7			
História Familiar: ☐ Não 0 ☐ TEV 1 ☐ OAA 2 ☐ AVCi 3 ☐ IAM 4			
Tipo de parentesco: 1º grau (avós, pais, irmãos, filhos) ☐ 1 2º grau (tios, primos) ☐ 2			
número de parentes:			
Hábitos: ☐ Não 0 ☐ Fumo 1 ☐ Alcool 2 ☐ Drogas ilícitas 3			
Mantinha o hábito na época da trombose: ☐ Sim 1 ☐ Não 0			
Medicamentos: ☐ antiHAS 0 ☐ AINES 1 ☐ AAS 2 ☐ estatinas 3 ☐ protetor gástrico 4 ☐ psicotrópicos 5			
Uso de anticoagulantes: ☐ Não 0 ☐ heparina 1 ☐ warfarin 2 ☐ marcoumar 3 ☐ dabigatran 4 ☐ rivaroxaban 5			
Medidas Antropométricas:			
Peso:			Circunferência abdominal:
Altura:			Obesidade: ☐ Sim 1 ☐ Não 0
IMC:			

ANEXO IV – Avaliação mensal dos pacientes do estudo



Formulário de Reavaliação Mensal dos Pacientes

Nome: _____

RH: _____ Início HCQ: ____/____/____

Data: ____/____/____

	Não	Leve	Moderado	Grave
Uso regular da medicação				
Eventos trombóticos atuais				
Presença de sinais de sangramento (Hematomas, Equimoses, Sangramento gengival, Sangramento Nasal)				
Fatigabilidade / cansaço				
Alteração na acuidade visual / visão borrada				
Alterações emocionais (nervosismo, inquietação)				
Alucinações (visuais, auditivas, sensitivas)				
Dor e/ou fraqueza muscular				
Irritação gastrointestinal (diarreia, perda de apetite, náuseas, dor)				
Cefaleia				
Prurido				
Manchas na pele, urticária				
Descoloração do cabelo/queda de cabelo				
Alteração da coloração da pele, unhas ou cavidade oral				
Tontura				

ANEXO V – Artigo publicado referente à tese de doutorado

Thrombosis Research 136 (2015) 1174–1178



Contents lists available at ScienceDirect

Thrombosis Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/thromres

Full Length Article

Recurrent thrombosis in antiphospholipid syndrome may be associated with cardiovascular risk factors and inflammatory response

Sabrina da Silva Saraiva^a, Isadora Fernandes Custódio^a, Bruna de Moraes Mazetto^a, Marina Pereira Collela^a, Erich Vinícius de Paula^b, Simone Appenzeller^c, Joyce Annichino-Bizzachi^b, Fernanda Andrade Orsi^{a,d,*}^a Hematology and Hemotherapy Center, University of Campinas, Rua Carlos Chagas, 480, Cidade Universitária "Zeferino Vaz", Campinas, SP CEP: 13083-970, Brazil^b Discipline of Hematology and Hemotherapy, Department of Clinical Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária "Zeferino Vaz", Campinas, SP CEP: 13083-887, Brazil^c Discipline of Rheumatology, Department of Clinical Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária "Zeferino Vaz", Campinas, SP CEP: 13083-887, Brazil^d Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária "Zeferino Vaz", Campinas, SP CEP: 13083-887, Brazil

article info

Article history:

Received 12 June 2015

Received in revised form 14 October 2015

Accepted 15 October 2015

Available online 22 October 2015

Keywords:

Antiphospholipid antibody

Antithrombotic agents

Thrombosis

Prognosis

Recurrence

abstract

Introduction: Antiphospholipid syndrome (APS) is a pro-thrombotic autoimmune disease that affects different vascular beds, with potential risk for recurrence. Systemic lupus erythematosus (SLE), specific autoantibodies profile and atherogenic disorders have been described as risk factors for the occurrence of first thrombosis in patients with antiphospholipid antibodies (aPL). However, factors associated with recurrent thrombosis have not yet been completely elucidated in APS. The aim of this study was to evaluate the association of recurrent thrombosis with markers of inflammation, autoimmunity and the presence of atherogenic disorders in APS patients.

Materials and methods: We performed a retrospective evaluation of a cohort of APS patients in order to determine if markers of inflammation, autoimmunity and cardiovascular risk were associated with recurrence of thrombosis.

Results: One hundred fifteen patients with APS were included, 60% had primary APS. History of recurrent thrombosis was positive in 38.3% of patients, and 40% of them were on oral anticoagulants at the time of recurrence. Independent risk factors associated with recurrent thrombosis were arterial hypertension (OR = 3.7; 95% CI = 1.6–8.5; P = 0.002) and monocytes above 500 u/mm³ (OR = 2.4; 95% CI = 1.2–5.3; P = 0.02). These factors were particularly relevant in cases of venous index event.

Conclusion: The results suggest that arterial hypertension and monocyte counts may be independent factors for thrombosis recurrence in APS. Given the morbidity of recurrent cases, the results may support the evaluation of therapeutic measures to a rigid control of blood pressures and modulation of inflammatory response in APS, as additional prophylaxis against the recurrence of vascular events.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Antiphospholipid syndrome (APS) is a pro-thrombotic autoimmune condition that affects different vascular beds with potential risk for thrombosis recurrence [1]. The described incidence of recurrent thrombosis ranges from 5 to 16% [2–4]. The discontinuation of antithrombotic treatment is the leading cause of recurrences [5–8]. However, in more than 5% of cases, antithrombotic treatment may not be enough to prevent recurrent thrombosis [5,9]; and significant morbidity and mortality have been detected [2,10]. In addition to antithrombotic treatment, further factors may therefore play a role on thrombosis recurrence in APS.

Antiphospholipid antibodies (aPL) may activate endothelial cells, monocytes and platelets inducing both procoagulant and inflammatory states that enhance the individual risk for thrombosis [11]. Indeed, the profile of aPL antibodies and the diagnosis of systemic lupus erythematosus (SLE) are markers of APS severity [4,6,12,13]. However, the presence of autoantibodies and inflammation may not be enough to trigger thrombosis, and additional mechanisms may be necessary [11]. Clinical studies have demonstrated that the risk for thrombosis in patients with positive aPL is increased in the presence of additional cardiovascular risk factors [14], such as hypertension [12,15], dyslipidemia [12,15] and smoking [16]. Whether these atherogenic disorders could also play a role on thrombosis recurrence in patients with APS has not, however, been well established yet.

Therefore, we hypothesized that the described risk factors for first thrombosis could possibly contribute for thrombosis recurrence in

* Corresponding author at: Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Rua Carlos Chagas, 480, Campinas, SP 13083-970, Brazil.
E-mail address: ferorsi@unicamp.br (F.A. Orsi).

APS. In this context, the aim of this study was to evaluate the association of recurrent thrombosis with biological markers of inflammation, autoimmunity and the presence of atherogenic disorders in APS patients.

1. Material and Methods

1.1. Study design and patients selection

This is a retrospective cohort study on the risk of thrombosis recurrence in APS patients. The study cohort included patients who had a clinical diagnosis of APS and were treated at the Hematology and Hemostasis Center at the University of Campinas, Brazil. The cohort had been followed-up since APS was diagnosed. Patients were evaluated every month for oral anticoagulation control; clinical features were recorded every 6 months and routine laboratory tests of peripheral blood smear, blood glucose, lipids disorders, renal function and autoimmune disease were performed at least once a year. In order to prevent thrombosis recurrence, after the diagnosis of thrombotic APS was confirmed, patients received prolonged anticoagulant treatment; patients with arterial thrombosis also received antiplatelets.

Sydney classification criteria were used for APS diagnosis [17]. APS was diagnosed in patients with persistent positive aPL antibody plus a history of thrombosis or APS-associated pregnancy complications. Persistent positive aPL were defined as persistent positive lupus anticoagulant (LA); persistent positive IgG or IgM anticardiolipin (aCL) at moderate to high titres (N40 GPL or MPL) or persistent positive (Nthe 99th percentile) IgG/IgM anti-beta2 glycoprotein 1 (aβ2GP1), at two distinct times, at least 12 weeks apart. Two tests were performed for LA identification: partial thromboplastin activated time and dilute Russell's viper venom time; LA was considered positive if at least one of the two tests was positive. In-house ELISA assays were performed for the detection of aCL and aβ2GP1, as previously described [18]. All aPL assays were performed in the Laboratory of Hemostasis at the Hematology and Hemotherapy Center at the University of Campinas, Brazil. The laboratory participates in UK National External Quality Assessment Scheme for Blood Coagulation (UKNEQAS), an international external quality assessment (EQA) program.

Thrombotic events were characterized as venous or arterial, according to the vascular bed where thrombosis occurred. Venous thrombosis events were further divided into venous thromboembolism and thrombosis of unusual sites. Arterial thrombosis events were divided into stroke and non-stroke ischemic events, such as myocardial infarction, peripheral arterial thrombosis or ischemia of small extremities. Thrombotic events were confirmed by image exams, such as ultrasound (US), computerized tomography (CT), magnetic resonance (MR), ventilation/perfusion lung scan, or biopsies, according to the site of thrombosis.

In cases of clinical suspicions of recurrent venous thrombosis, a new US was performed and the results were compared with those of the last available examination. Recurrent venous thrombosis was diagnosed in the case that a previously fully compressible segment (contralateral or ipsilateral) was no longer compressible or in the case that an increase of the residual thrombus during compression was detected. In cases of suspicion of a new arterial thrombosis, symptoms of ischemia and new image exams (CT or MR) were performed to confirm the diagnosis. Diagnosis of myocardial infarction depended on the alterations of electrocardiogram and cardiac enzymes.

Patients were enrolled for the study between November 2013 and December 2014. The inclusion criteria comprised diagnosis of APS and history of at least one thrombotic episode. Patients who did not fulfil the diagnostic criteria for APS and patients without previous thrombosis were excluded. The diagnosis of SLE was performed according to established criteria [19,20].

One hundred and twenty one patients diagnosed with APS were attended at the outpatient unit of the Hematology and Hemostasis Center at the University of Campinas during the enrollment period. Excluded patients had APS with only obstetric complications (2), positive aPL

without APS (2) and lack of laboratory criteria for the APS diagnosis (2). One hundred fifteen patients were included in the study.

The study was conducted in compliance with the Helsinki Declaration. The local Ethical Committee on Human Research approved this study and written informed consent was obtained from patients or their attending relatives.

1.2. Patients' clinical evaluation

Following the enrollment for the study, patients' clinical features were retrospectively collected from medical charts and interviews. The comorbidities related to the risk of cardiovascular disease evaluated were: obesity, hypertension, dyslipidemia, diabetes and chronic renal disease. Obesity was defined as body mass index above 30 kg/m²; arterial hypertension was defined as persistent systolic blood pressure above 130 mm Hg, persistent diastolic blood pressure above 90 mm Hg, or use of antihypertensive drugs. Dyslipidemia was defined as high levels of low density cholesterol (LDL = 160 mg/dL or 4.1 mmol/L), high levels of triglycerides (TG = 150 mg/dL or 1.7 mmol/L), or low levels of high density cholesterol (HDL < 40 mg/dL or 1.0 mmol/L for men or HDL < 50 mg/dL or 1.3 mmol/L for women), or use of statins. Diabetes and chronic renal disease were diagnosed according to established criteria [21,22]. To evaluate whether the anticoagulation control was adequate, time within therapeutic range (TTR) of all patients was calculated according to previous studies [23].

Data regarding laboratory testing, such as cholesterol and triglycerides, erythrocyte sedimentation rate (ESR), C-reactive protein (CRP), antinuclear antibody by fluorescence (ANA), anti-DNA antibody (aDNA), complement components C3 and C4, creatinine, urea and proteinuria, were collected retrospectively and recorded in structured study form. Laboratory exams were performed in the Laboratory of Clinical Pathology of the Clinical Hospital at the University of Campinas. Blood counts were performed using ADVIA® Hematology System (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., USA) and confirmed manually; biochemistry exams were performed using COBAS® Modular Analyzer (Roche Diagnostics, Switzerland), serum high sensitive CRP, C3 and C4 levels were measured with a nephelometric method, with a BNProSpec Analyzer (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., USA). ANA was evaluated using indirect immunofluorescence on HEp-2 cells (Kallestad™, Bioprad, USA), aDNA was evaluated using indirect immunofluorescence (Virgo®, Hemagen, USA). ESR was performed by pipetting anticoagulated whole blood in a narrow vertical tube and then waiting for 1 h for the erythrocytes to settle down, the height of supernatant clear plasma was measured in millimeters (mm).

Current clinical data were collected from structured questionnaires by the study personnel during outpatient visits and historical clinical data were obtained from electronic or paper medical charts. Image exams confirming the thrombotic episode and laboratory exams were also obtained from medical charts. All patients' clinical and laboratory data were reviewed by two hematologists.

As the purpose of the study was to evaluate factors associated with thrombosis recurrence, for patients with multiple thrombosis we considered the clinical data and laboratory tests recorded during the year of the last recurrence. Also, TTR was calculated using INR values from at least 3 months before the recurrence. For patients with single thrombosis, we considered clinical and laboratory data at inclusion and TTR from the total follow-up period.

1.3. Statistical analysis

Categorical data are expressed as absolute number and percentage (%), continuous data are expressed as median and interquartile (IQ). Categorical variables were compared using Chi-square or Fisher exact test. To compare continuous variables between two groups Mann-Whitney rank test was performed. Logistic regression and ROC curve were performed to identify risk factors for thrombosis recurrence and

Table 1
Demographic distribution, clinical presentation and comorbidities of APS patients.

	APS patients N = 115
Female: male	84:31
Age (median, IQ)	28 (21–41)
Follow-up in years (median, IQ)	7 (3–13)
Primary SAF:secondary SAF	69:46
Gestational morbidity ^a (y:n)	33:19
Index event venous:arterial	76:39
Spontaneous:provoked	82:33
Recurrent thrombosis, n (%)	44 (38.3%)
On treatment recurrent thrombosis, n (%)	17 (14.8%)
Hypertension, n (%)	35 (30.4%)
Diabetes, n (%)	10 (8.7%)
Dyslipidemia, n (%)	41 (35.7%)

^a Data related to 52 women with history of pregnancy.

to estimate optimal cut-off values, respectively. A binary logistic regression was performed using thrombosis recurrence as the dependent variable and each possible parameter associated with thrombosis recurrence as covariate. For the univariate analysis we included as covariates: age, gender, comorbidities (hypertension, diabetes, obesity, dyslipidemia, chronic kidney disease, dyslipidemia), characteristics of the first thrombotic event (arterial vs. venous, spontaneous vs. provoked), patients personal habits (smoking, alcohol or drug abuse), family history of thrombosis, inflammatory profile (ESR, CRP, peripheral counts of neutrophils, monocytes and lymphocytes, plasma levels of C3 and C4) and autoantibodies profile (aPL profile, ANA and aDNA). A multivariate logistic regression analysis was then performed with the parameters that were statistically associated with recurrence by univariate analysis, with a P value of 0.1 or less, and adjusted for age and gender. Data were analyzed using SPSS version 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Graphs were drawn using GraphPad Prism version 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). P < 0.05 was considered statistically significant.

1. Results

One hundred fifteen patients with APS were included. The median time since first thrombosis was 7.0 years (IQ = 3.0–13.0 years), median age at diagnosis was 28.0 years old (IQ = 21.0–41.0 years-old) and the ratio female to male was 2.7:1. The vascular bed of the thrombotic index event was venous in 76 patients (66.1%) and arterial in 39 (33.9%).

Secondary APS was diagnosed in 46 patients (40%), 42 had SLE, 1 had Sjogrens syndrome, 1 had psoriasis/psoriatic arthritis and 1 had autoimmune lymphoproliferative syndrome. Patients comorbidities were obesity in 21.7% of cases, hypertension in 30.4%, diabetes in 8.7%, dyslipidemia in 35.7%, and chronic renal disease in 14.8%. Table 1

shows the demographic distribution and clinical presentation of the cohort.

Forty four patients (38.3%) had multiple thrombotic events, the number of recurrent thrombotic events ranged from 2 to 4 and the recurrence rate was similar according to the index event, 53% for arterial and 40% for venous index event (P = 0.2). In the majority of cases, the new thrombotic event occurred in the same vascular bed of the previous episode (81.5% for venous and 82.4% for arterial index event).

Patients with recurrent thrombosis presented higher prevalence of hypertension (48% vs. 20%, P = 0.002), higher monocyte count (median monocytes = 490 vs. 400 u/mm³; P = 0.04), higher levels of CRP (median CRP levels = 0.36 vs. 0.22 mg/dL; P = 0.04) and non-significant increased ESR values (median ESR = 18 vs. 27 mm/h; P = 0.08), these results are illustrated in Fig. 1.

Factors related to the risk of recurrence in general venous thromboembolism (not APS), such as gender, age and spontaneous first thrombosis, were not associated with multiple thrombosis in APS. Markers of high risk APS, such as triple positivity for aPL (LA, aβ2GP1 or IgG-ACL), association of obstetric morbidity and thrombosis and SLE were not associated with recurrent thrombosis neither. Risk factors associated with recurrent thrombosis were hypertension (P = 0.002) and monocytes above 500 u/mm³ (P = 0.02), on both univariate and multivariate analysis. Table 2 summarizes the risk factors associated with recurrent thrombosis in this APS cohort.

Factors associated with recurrent thrombosis were distinct according to the site of the index event. After a venous index event, risk factors associated with thrombosis recurrence, on univariate analysis, were: hypertension (OR = 9.4, 95% CI = 2.8–31.2, P = 0.001), monocytes N 500 u/mm³ (OR = 3.1, 95% CI = 1.2–8.3, P = 0.02), and complement C4 N 0.36 g/L (OR = 8.2, 95% CI = 1.5–43.7, P = 0.01). On multivariate analysis, the independent risk factors associated with recurrence after venous index event were hypertension (P = 0.001), and monocytes N 500 u/mm³ (P = 0.02); results are shown in Table 3.

After arterial index event, risk factors associated with thrombosis recurrence, on univariate analysis, were ESR = 22 mm/h (OR = 5.8, 95% CI = 1.1–32.0, P = 0.02), and CRP = 0.36 g/L (OR = 8.2, 95% CI = 1.5–43.7, P = 0.01). On multivariate analysis, ESR = 22 mm/h was the independent risk factor associated with recurrence after arterial thrombosis (OR = 8.2, 95% CI = 1.02–62.2, P = 0.02).

On-treatment recurrence is a particularly aggressive manifestation of APS representing patients for whom the antithrombotic treatment is not enough to prevent a new event of thrombosis. Seventeen patients (14.8% of the total cohort and 40% of patients with recurrence) had recurrent thrombosis despite of the prolonged antithrombotic therapy. From those, 6 patients were also using anti-platelets when they presented the new event of thrombosis.

Among patients on prolonged anticoagulation, the INR control was good and median time in therapeutic range was 67.8% (IQ = 55.9–80.9%). Furthermore, TTR of patients who presented on-treatment

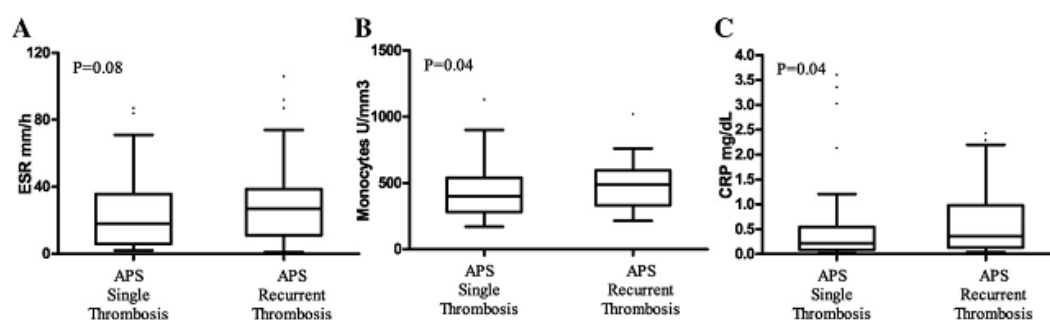


Fig. 1. This figure illustrates A. the distribution of ESR values, B. the distribution of monocyte count and C. the levels of C-reactive protein (CRP) in APS patients with single or recurrent thrombosis. P values were calculated using Mann-Whitney rank test.

Table 2

Potential risk factors associated with recurrent thrombosis in APS. Association of clinical parameters and recurrent thrombosis by univariate analysis.

Parameter	Beta	R square ^a	OR	95% CI	P ^b
Age	-0.013	0.01	0.98	0.96–1.08	0.36
Gender (female)	-0.363	0.002	0.87	0.36–2.01	0.71
Smoking	-0.096	0.001	0.91	0.36–2.26	0.83
Spontaneous thrombosis	-0.488	0.005	0.61	0.25–1.45	0.26
Triple positive aPL ^c	-0.269	0.004	0.76	0.29–1.97	0.58
Concomitant obstetric morbidity	-0.536	0.022	0.58	0.18–1.87	0.35
Secondary APS	0.214	0.004	1.23	0.57–2.66	0.58
Hypertension ^d	1.312	0.112	3.7	1.6–8.5	0.002
Monocytes N 500 u/mm ³ ^d	0.892	0.059	2.4	1.2–5.3	0.02

^a Nagelkerke R square.

^b OR, 95% CI and P values were calculated using logistic regression.

^c Triple positive aPL = positivity of the 3 antiphospholipid antibodies: lupus anticoagulant plus anticardiolipin plus anti-beta2glycoprotein.

^d On multivariate analysis, hypertension (Beta = 1.326, OR = 3.8, 95% CI = 1.6–8.8, P = 0.002) and monocytes N 500 u/mm³ (Beta = 0.909, OR = 2.5, 95% CI = 1.1–5.6, P = 0.02) were independent factors related to thrombosis recurrence. Nagelkerke R square for the whole model = 0.170.

recurrence was similar to the TTR of patients who did not present on-treatment recurrence (median TTR = 63.6%, IQ = 51–79% vs. median TTR = 70%, IQ = 57–80%, respectively, P = 0.24). Risk factors associated with on-treatment thrombosis recurrence were: ESR (OR = 1.03, 95% CI = 1.002–1.04, P = 0.04) and non-stroke ischemic events (OR = 4.36, 95% CI = 1.05–18.1, P = 0.04).

1. Discussion

In the present study, we retrospectively evaluated a cohort of APS patients in order to determine possible markers associated with thrombosis recurrence. The rate of thrombosis recurrence was 38%, and 40% of the patients who suffered recurrent thrombosis were on prolonged antithrombotic treatment. The rate of treatment failure was in accordance with that reported by previous studies [2–4,9,10,24]. Of note, values of TTR, an important marker of the quality of the anticoagulation control [25], were not associated with on-treatment thrombosis recurrence.

In the studied cohort, risk factors associated with recurrence were arterial hypertension and increased monocyte count, particularly in cases of recurrence after venous index event. Recurrence after arterial index event and on-treatment recurrence were associated higher ESR values, however this finding should be regarded with caution due to the weak statistical association between ESR values and recurrence in these cases.

Atherogenic conditions, mainly arterial hypertension, have been described as important risk factors for first thrombosis in APS [4,10,12,15,16]. Arterial hypertension may act as a complementary mechanism, along with aPL antibodies, to the pathogenesis of thrombosis in APS [11,14]. Arterial hypertension is a prevalent condition in patients with autoimmune disorders and may possibly be triggered by the action of inflammatory cytokines in endothelial cells and vascular wall [26]. In addition to the association of arterial hypertension with the occurrence of the first thrombotic event, demonstrated by other studies [12,15], our results consistently demonstrated that arterial hypertension may further worsen the clinical course of the vascular events associated with APS. So, our results reinforce the importance of arterial hypertension on the clinical course of APS.

In our cohort, at least three markers of inflammation were increased in patients with recurrent thrombosis: CRP levels, ESR values and monocyte count. Particularly, increased monocyte count was associated with the risk of thrombosis recurrence. Monocytes have been recognized as key cells for the pathogenesis of APS [11] and previous “in vitro” and clinical studies have demonstrated an increased activation of monocytes in patients with APS [27,28]. A recent case-control study has also demonstrated that monocyte count may be a risk factor for venous thromboembolism [29]. For the pathogenesis of thrombotic APS, the immune complex formed by aCL or aβ2GP1 and their antigens, in

Table 3

Independent risk factors associated with recurrent thrombosis according to the vascular site of the index event.

Parameter	Venous index event ^a			
	Beta	Odds ratio	95% CI	P
Hypertension	2.399	11.0	3.0–36.5	P b 0.001
Monocytes N 500 u/mm ³	1.350	3.8	1.2–12.0	P = 0.02

^a OR, 95% CI and P values were calculated using multiple logistic regression. Nagelkerke R square for the whole model = 0.339.

particular LDL oxidized, would activate monocytes to express tissue factor, to secrete inflammatory cytokines [11,27] and possibly contribute to the formation of atherosclerotic plaques on the vascular wall [30]. In accordance with previous studies, our results further suggest that monocytes may play a role on APS prognosis.

In addition to the importance of inflammatory response, our results failed to demonstrate any association between thrombosis recurrence and the autoimmune profile. The diagnosis of SLE, the presence of positive ANA and the aPL antibodies profile were not associated with thrombosis recurrence in the present cohort. These findings were unexpected since aβ2GP1, anti-prothrombin, high IgG anticardiolipin levels and, more recently, triple positive aPL antibodies have been reported as risk factors for first and multiple thrombotic events [13,32]. However the association of aPL antibodies profile with APS prognosis is controversial and has not been confirmed by some studies [4,5]. Furthermore, a relationship between aPL profile and APS clinical presentation is difficult to establish as there is great intervariability of antibodies results among different laboratories [33].

This study has the limitation of being retrospective; therefore some information has possibly been missed during the follow-up, because the registration of the clinical data was not prospectively controlled. The strengths of this study are the inclusion of a well-selected APS cohort whose diagnosis and treatment were uniformly performed. All APS cases were diagnosed by the same medical team and according to the Sydney criteria [17]. The aPL assays were done by the same laboratory, which takes part of a periodic external quality assessment program. Furthermore, patients' oral anticoagulation was controlled in the same institution; the mean TTR of the center is 65%. Finally, the median follow-up was 7 years, which is an adequate time of follow-up for the evaluation of SLE progression, thrombosis recurrence and prognosis in APS [34].

2. Conclusion

Our results suggest that increased inflammatory response, possibly mediated by monocytes, and the diagnosis of arterial hypertension might be related to a worse prognosis in cases of thrombotic APS. These findings may possibly support the future evaluation of therapeutic measures to rigid control of blood pressures and modulation of inflammatory response in APS as additional prophylaxis against the recurrence of vascular events.

Funding

This work received financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (443744/2014-9).

Conflict of interest

None.

Addendum

FA Oisi participated in the planning, data collection, data interpretation and statistical analysis and writing of the manuscript. SS Saraiva participated in the planning, data collection, data interpretation and

writing of the manuscript. IF Custódio and BM Mazetto participated in data collection. S Appenzeller interpreted and analyzed data, and participated in writing of the manuscript. MP Collela, EV de Paula and J Annichino-Bizzachi participated in data interpretation and writing of the manuscript.

References

- [1] R. Cervera, J.C. Piette, J. Font, et al., Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1000 patients, *Arthritis Rheum.* 46 (2002) 1019–1027.
- [2] R. Cervera, M.A. Khamashta, Y. Shoenfeld, et al., Morbidity and mortality in the antiphospholipid syndrome during a 5-year period: a multicentre prospective study of 1000 patients, *Ann. Rheum. Dis.* 68 (2009) 1428–1432.
- [3] M. Turiel, P. Sarzi-Puttini, R. Peretti, et al., Thrombotic risk factors in primary antiphospholipid syndrome: a 5-year prospective study, *Stroke* 36 (2005) 1490–1494.
- [4] M. Bertero, M. Bazzan, R. Carignola, et al., Antiphospholipid syndrome in northwest Italy (APS Piedmont Cohort): demographic features, risk factors, clinical and laboratory profile, *Lupus* 21 (2012) 806–809.
- [5] M.A. Crowther, J.S. Ginsberg, J. Julian, et al., A comparison of two intensities of warfarin for the prevention of recurrent thrombosis in patients with the antiphospholipid antibody syndrome, *N. Engl. J. Med.* 349 (2003) 1133–1138.
- [6] T. Tarr, G. Lakos, H.P. Bhatta, V. Shoenfeld, G. Szegedi, E. Kiss, Analysis of risk factors for the development of thrombotic complications in antiphospholipid antibody positive lupus patients, *Lupus* 16 (2007) 39–45.
- [7] V. Pengo, A. Ruffatti, C. Legnani, et al., Clinical course of high-risk patients diagnosed with antiphospholipid syndrome, *J. Thromb. Haemost.* 8 (2010) 237–242.
- [8] G. Ruiz-Irastorza, M.J. Cuadrado, I. Ruiz-Arzuza, et al., Evidence-based recommendations for the prevention and long-term management of thrombosis in antiphospholipid antibody-positive patients: report of a task force at the 13th International Congress on antiphospholipid antibodies, *Lupus* 20 (2011) 206–218.
- [9] G. Finazzi, R. Marchioli, V. Brancaccio, et al., A randomized clinical trial of high-intensity warfarin vs. conventional antithrombotic therapy for the prevention of recurrent thrombosis in patients with the antiphospholipid syndrome (WAPS), *J. Thromb. Haemost.* 3 (2005) 848–853.
- [10] J.A. Gómez-Puerta, H. Martín, M.C. Amigo, et al., Long-term follow-up in 128 patients with primary antiphospholipid syndrome: do they develop lupus? *Medicine (Baltimore)* 84 (2005) 225–230.
- [11] G. Ruiz-Irastorza, M. Crowther, W. Branch, M. Khamashta, Antiphospholipid syndrome, *Lancet* 376 (2010) 1498–1509.
- [12] A. Danowski, M.N.L. de Azevedo, J.A.S. Papi, M. Petri, Determinants of risk for venous and arterial thrombosis in primary antiphospholipid syndrome and in antiphospholipid syndrome with systemic lupus erythematosus, *J. Rheumatol.* 36 (2009) 1195–1199.
- [13] M.G. Tektonidou, K. Laskari, D.B. Panagiotakos, H.M. Moutsopoulos, Risk factors for thrombosis and primary or secondary prevention in patients with systemic lupus erythematosus with or without antiphospholipid antibodies, *Arthritis Rheum.* 61 (2009) 29–36.
- [14] I. Rodríguez-Piñó, G. Espinosa, R. Cervera, Catastrophic APS in the context of other thrombotic microangiopathies, *Curr. Rheumatol. Rep.* 17 (2015) 3.
- [15] A. Małyja-Bednarczyk, J. Swadźba, T. Iwaniec, M. Sanak, S. Dądzina, A. Ćmiel, J. Musiał, Risk factors for arterial thrombosis in antiphospholipid syndrome, *Thromb. Res.* 133 (2014) 173–176.
- [16] R.T. Urbanus, B. Siegerink, M. Roest, F.R. Rosendaal, P.G. de Groot, A. Algra, Antiphospholipid antibodies and risk of myocardial infarction and ischaemic stroke in young women in the RATIO study: a case-control study, *Lancet Neurol.* 11 (2009) 998–1005.
- [17] S. Miyakis, M.D. Lockshin, T. Atsumi, et al., International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS), *J. Thromb. Haemost.* 4 (2006) 295–306.
- [18] B. De Laat, V. Pengo, I. Pabinger, et al., The association between circulating antibodies against domain I of beta2-glycoprotein I and thrombosis: an international multicenter study, *J. Thromb. Haemost.* 7 (2009) 1767–1773.
- [19] E.M. Tan, A.S. Cohen, J.F. Fries, et al., The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum.* 25 (1982) 1271–1277.
- [20] M. Petri, A.M. Orbai, G.S. Alarcón, et al., Derivation and validation of the systemic lupus international collaborating clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum.* 64 (2012) 2677–2686.
- [21] Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group, KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease, *Kidney Int. Suppl.* 3 (2013) 1–150.
- [22] American Diabetes Association, Diagnosis and classification of diabetes mellitus, *Diabetes Care* 36 (Suppl. 1) (2013) S81–S90.
- [23] F.R. Rosendaal, S.C. Cannegieter, F.J. van der Meer, E. Briët, A method to determine the optimal intensity of oral anticoagulant therapy, *Thromb. Haemost.* 69 (1993) 236–239.
- [24] A. Schmidt-Tanguy, J. Voswinkel, D. Henrion, et al., Anti-thrombotic effects of hydroxychloroquine in primary antiphospholipid syndrome patients, *J. Thromb. Haemost.* 11 (2013) 1927–1929.
- [25] Y. Wan, C. Heneghan, R. Perera, et al., Anticoagulation control and prediction of adverse events in patients with atrial fibrillation: a systematic review, *Circ. Cardiovasc. Qual. Outcomes* 1 (2008) 84–91.
- [26] V.F. Panoulas, G.S. Metsios, A.V. Pace, H. John, G.J. Trehaire, M.J. Banks, G.D. Kitas, Hypertension in rheumatoid arthritis, *Rheumatology* 47 (2008) 1286–1298.
- [27] A. Martirosyan, M. Petrek, Z. Navratilova, A. Bibulyan, A. Boyajyan, G. Manukyan, Differential regulation of proinflammatory mediators following LPS- and ATP-induced activation of monocytes from patients with antiphospholipid syndrome, *BioMed Res. Int.* 2015 (2015) 292851.
- [28] P.R.J. Ames, I. Antiof, A. Ciampa, J. Batuca, G. Seenna, L.R. Lopez, J. Delgado Alves, L. Iannace, E. Matsuura, Primary antiphospholipid syndrome: a low-grade autoimmune disease? *Rheumatology* 47 (2008) 1832–1837.
- [29] S.M. Rezende, W.M. Lijfering, F.R. Rosendaal, S.C. Cannegieter, Hematologic variables and venous thrombosis: red cell distribution width and blood monocyte count are associated with an increased risk, *Hematologica* 99 (2014) 1.
- [30] A.Y. Gasparian, A. Stavropoulos-Kalinoglou, D.P. Mikhailidis, T.E. Toms, K.M.J. Douglas, G.D. Kitas, The rationale for comparative studies of accelerated atherosclerosis in rheumatic diseases, *Curr. Vasc. Pharmacol.* 8 (2010) 437–449.
- [31] R. Forastiero, M. Martinuzzo, G. Pombo, et al., A prospective study of antibodies to β_2 -glycoprotein I and prothrombin, and risk of thrombosis, *J. Thromb. Haemost.* 3 (2005) 1231–1238.
- [32] V. Pengo, A. Biasiolo, C. Pegoraro, U. Cucchini, F. Noventa, S. Illiceto, Antibody profiles for the diagnosis of antiphospholipid syndrome, *Thromb. Haemost.* 93 (2005) 1147–1152.
- [33] V. Pengo, A. Tripodi, G. Reber, et al., Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, *J. Thromb. Haemost.* 7 (2009) 1737–1740.
- [34] V. Pengo, A. Ruffatti, C. Legnani, et al., Incidence of a first thromboembolic event in asymptomatic carriers of high-risk antiphospholipid antibody profile: a multicenter prospective study, *Blood* 118 (2011) 4714–4718.

ANEXO VI – Artigo publicado referente à tese de doutorado

Received: 5 June 2017 | Revised: 22 July 2017 | Accepted: 26 July 2017
 DOI: 10.1002/ajh.24875

RESEARCH ARTICLE



The impact of antibody profile in thrombosis associated with primary antiphospholipid syndrome

Sabrina da Silva Saraiva¹ | Bruna de Moraes Mazetto¹ |
 Lais Quinteiro Tobaldine¹ | Marina Pereira Colella¹ | Erich Vinícius De Paula^{1,2} |
 Joyce Annichinno-Bizzachi^{1,2} | Fernanda Andrade Orsi^{1,3}

¹Thrombosis and Haemostasis Unit, Hematology and Hemotherapy Center, University of Campinas, Rua Carlos Chagas, 480, Cidade Universitária "Zeferino Vaz" CEP: 13083-970, Campinas, SP, Brazil;

²Discipline of Hematology and Hemotherapy, Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, Brazil Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Cidade

Universitária "Zeferino Vaz" CEP: 13083-887, Campinas, SP, Brazil; ³Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, Brazil Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária "Zeferino Vaz" CEP: 13083-887, Campinas, SP, Brazil

Correspondence

Sabrina da Silva Saraiva, MD, Thrombosis and Haemostasis Unit, Hematology and Hemotherapy Center, University of Campinas, Rua Carlos Chagas, 480, Cidade Universitária "Zeferino Vaz" CEP: 13083-970, Campinas, SP, Brazil. Email: sabrina_saraiva@yahoo.com.br

Funding information

National Institute of Science and Technology in Blood (INCT do Sangue); National Counsel of Technological and Scientific Development, Brazil

Abstract

Triple positivity (TP) for antiphospholipid antibodies (aPL) may identify aPL carriers with poorer prognosis. The clinical impact of TP in primary antiphospholipid syndrome (PAPS) remains unclear and further clinical evidences are needed to validate TP as a marker of severity. The aim of this study was to evaluate the impact of TP on the clinical course of PAPS with thrombosis (t-PAPS). We performed a retrospective analysis of a cohort of t-PAPS patients, comparing groups of patients with TP and non-TP profiles according to their demographic, clinical and laboratory features. We included 105 patients with t-PAPS, the median follow-up time of 3.7 years. Twenty-two patients (21%) had TP; the demographic distribution, the presence of cardiovascular risk factors and the site of thrombosis were similar between TP and non-TP patients. The frequency of thrombotic events did not differ between TP and non-TP patients during the study period. Pregnancy morbidities were more frequent in women with t-PAPS and TP than in those with non-TP profile (80% vs. 52.8%, $P = 0.05$). Patients with t-PAPS and TP presented, at diagnosis, higher dRVVT ratio (median 5.244 vs. 1.57, $P < 0.0001$), higher aCL titer (median 5.50 UI vs. 3.5 UI, $P < 0.0001$), lower C3 levels (median 5.108 vs. 1.30 mg dL⁻¹, $P = 0.001$), lower C4 levels (median 5.022 vs. 0.25 mg dL⁻¹, $P = 0.05$) and higher frequency of positive ANA test (50% vs. 20%, $P = 0.008$) than patients with t-PAPS and non-TP. Lower-than-normal levels of C3 was independently associated with TP (OR 5.51, $P = 0.02$). The presence of TP in patients with t-PAPS was associated with immune derangement, with no effect on the clinical course of the disease.

1 INTRODUCTION

Primary antiphospholipid syndrome (PAPS) is a prothrombotic condition that affects different vascular beds, with no detectable underlying diseases, and is associated with the persistent presence of at least one antiphospholipid antibody (aPL): lupus anticoagulant (LAC), anticardiolipin (aCL) or anti-b2glycoprotein I (ab2GP1).¹

Antiphospholipid antibodies are widely used as diagnostic markers of antiphospholipid syndrome (APS), however the profile of these antibodies may also play a role in the clinical presentation of the disease. Miyakis et al. suggested that APS should be categorized according to

aPL positivity, as type I (more than one positive aPL), type IIa (LAC present alone), type IIb (aCL present alone) and type IIc (ab2GP1 present alone).¹ Recently, Pengo et al. suggested that the positivity for the three aPL antibodies, known as triple positivity (TP), was an independent risk factor for thrombosis in aPL asymptomatic carriers.² Further studies confirmed that TP was a promising prognostic marker able to identify aPL carriers, and possibly APS patients, with poorer prognosis and worse clinical course.^{3,4}

However, APS is a heterogeneous disease and the clinical relevance of the aPL profile, in particular TP, in the clinical course of PAPS has not yet been confirmed.^{5,6} A recent meta-analysis demonstrated

that each aPL (LAC, aCL, and ab2GPI) were independently associated with increased risk of thrombosis in PAPS, particularly LAC was associated with the highest risk.⁷ Furthermore, aPL test results are highly variable across different laboratories,^{8–10} and the inter-laboratory variability may impact the use of these tests as prognostic markers.

Thus, we hypothesized that aPL profile may not be an overall prognostic marker of PAPS and should be validated according to local particularities. In this context, the aim of this study was to evaluate the impact of aPL profiles, in particular TP, on the clinical presentation of thrombotic PAPS.

2 | METHODS

2.1 | Patients selection and follow-up

We evaluated the presence of TP in a cohort of thrombotic PAPS patients treated at the Hematology and Hemotherapy Center at the University of Campinas, Brazil. Patients were enrolled between November 2013 and November 2016. Those who did not fulfill the diagnostic criteria for APS, patients with systemic autoimmune diseases and patients without previous thrombosis were excluded.

One hundred and nine patients diagnosed with PAPS were attended at the outpatient unit of the Hematology and Hemostasis Center at the University of Campinas during the enrollment period. The patients who were excluded had: APS with obstetric complications alone (2) or incomplete laboratory results for APS diagnosis (2). One hundred and five patients were included in the study.

APS was diagnosed in patients with persistent positive aPL antibody plus a history of thrombosis or obstetric complications. Persistent positive aPL were defined as persistent positive LAC; persistent positive IgG or IgM aCL at moderate to high titers (>40 GPL or MPL) or persistent positive ($>$ the 99th percentile) IgG/IgM anti-beta2 glyco-protein 1 (ab2GPI), at two distinct times, with an interval of at least 12 weeks.¹ The laboratory participates annually in the United Kingdom National External Quality Assessment Service for Blood Coagulation (UK NEQAS) for LAC assays.

The cohort had been followed since PAPS diagnosis. Thrombotic events were confirmed by imaging examinations, in cases of clinical suspicion of recurrent venous thrombosis, a new imaging examination was performed and the results were compared with those of the last available examination. All patients received prolonged anticoagulant treatment with warfarin; patients with arterial thrombosis also received antiplatelet agents.

Patients were evaluated every month for oral anticoagulation control, and clinical features were recorded every 6 months and routine laboratory tests including peripheral blood smear, blood glucose, lipids and renal function were performed at least once a year. Patients were screened at diagnosis and then annually during the follow-up for systemic autoimmune diseases, the following screening tests were performed: antinuclear antibodies (ANA) complement C3 and C4, anti-double-stranded DNA (dsDNA). In addition, in the presence of clinical signs and symptoms of systemic autoimmunity, such as proteinuria or hematological disorders, further investigations were performed as necessary. The

diagnosis of systemic lupus erythematosus (SLE) was confirmed according to established criteria.¹¹ Patients in this cohort presented no associated autoimmune disease at the time of diagnosis of PAPS.

We retrospectively reviewed the demographic, clinical, and laboratory features recorded at diagnosis and during follow-up. The profile of aPL antibodies was considered TP when LAC, ab2GPI and aCL were positive. Other profiles were considered non-triple positive (non-TP).

The study was conducted in compliance with the Helsinki Declaration. The local Ethical Committee on Human Research approved this study and written informed consent was obtained from patients or their attending relatives.

2.2 | Laboratory procedures

LAC assays performed in nonhospitalized patients were considered for APS diagnosis. Blood was collected prior to the initiation of any anticoagulant drug regimen or after a sufficient period of drug discontinuation. Low molecular weight heparin (LMWH) and warfarin were withdrawn 24 h and at least 5 days prior to the blood collection, respectively. Patients used no other anticoagulant apart from warfarin or LMWH in the study period. We also performed thrombin time (TT) and prothrombin time (PT) assays in the same sample collected for LAC assay. When either TT or PT was prolonged, LAC assay was not performed.

The solid phase assays were performed following the international guideline from the International Society of Thrombosis and Haemostasis (ISTH)⁸ and the LAC assays were performed following the guidelines from both ISTH¹² and Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI).¹³ Plasma samples were used for LAC and two assays based on different principles were applied: dRVVT (HemosIL® dRVVT, Instrumentation Laboratory, USA) and Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) with silica as activator. For that assay we used HemosIL™ APTT-SP (Instrumentation Laboratory, USA) until 2013 and Silica Clotting Time (SCT) (HemosIL® SCT, Instrumentation Laboratory, USA) after 2014. Assays were performed using ACL-TOP® Hemostasis System (Instrumentation Laboratory, USA). Results of screening tests were suggestive of LAC when the clotting times were longer than the local cut-off value, calculated as 99th percentile. Mix assay and confirmatory test were always performed when screening tests were suggestive of LAC. Confirmatory tests were performed for dRVVT and APTT-SP or SCT by increasing the concentration of phospholipids in the test. Presence of LAC was confirmed by a correction percentage of above the local cut-off value (99th percentile) in the confirmatory assay. In addition, we described the dRVVT results as dRVVT ratio, which is the ratio between screening and confirmatory results.

The antiphospholipid antibodies with solid phase were tested in patient serum by "in house" ELISA immunological assays, with cardiolipin or b2GPI as antigen (Sigma-Aldrich, USA), as previously described.^{14,15}

2.3 | Statistical analysis

Descriptive statistics were used for categorical data and expressed as frequencies (percentage). Fisher exact test was used to compare

TABLE 1 Demographic distribution, clinical presentation, and comorbidities of t-PAPS patients, according to the antiphospholipid profile

WILEY

	Triple positivity; N 522	Nontriple positivity; N 583	P*
Female: Male	16: 6	54: 29	0.49
Age of diagnosis, median (IQR)* years	29.0 (24.5–34.8)	32.7 (22.2–46.0)	0.32
Time since first thrombosis, median (IQR) years	8.0 (3.5–13.0)	4.5 (2.0–9.0)	0.29
Time of followup, median (IQR) years	3.7 (1.6–8.2)	3.7 (1.0–8.5)	0.85
Hypertension, n (%)	6 (27.7%)	28 (33.7%)	0.61
Dyslipidemia, n (%)	7 (31.8%)	38 (45.7%)	0.25
Obesity, n (%)	7 (31.8%)	25 (37.7%)	0.53
Smoking, n (%)	4 (25%)	22 (34.9%)	0.55

IQR 5 interquartile range.

*P value was calculated using Fisher exact test or Mann–Whitney test.

categorical data. Continuous data were reported as median and interquartile range (IQR) and the differences were tested using Mann–Whitney. Correlation analyses were performed using Spearman test. Univariate logistic regression was used to evaluate the association of serological and clinical parameters with TP. A multivariate logistic regression analysis was performed with the parameters that were statistically associated with TP by univariate analysis, with a P value of 0.1 or less, and adjusted for age and gender. The multivariate logistic regression models were run using block entry. Data were analyzed

using SPSS for Windows version 15.0 (SPSS, Chicago, IL). Graphics were generated using GraphPad Prism, version 5 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3 | RESULTS

We included a total of 105 patients with thrombotic PAPS with a median follow-up time of 3.7 years (IQR 1.1–8.5 years). Twenty-two

TABLE 2 Laboratory data of t-PAPS, according to the antiphospholipid profile

	Triple positivity; N 522	Nontriple positivity; N 583	P*	Normal reference values
dRVVT ratio, median (IQR)	2.44 (2.09–2.80)	1.57 (1.46–2.0)	< 0.0001	^a
APTT-SP or SCT, % of positive results	68.2	35.5	0.01	Negative
IgG aCL UI, median (IQR)	50 (40–60)	35 (20–40)	< 0.0001	<40
IgM aCL UI, median (IQR)	25 (20–32.5)	20 (14.2–50)	0.41	<40
ab2GP1, % of positive results	100	38.6	< 0.0001	Negative ^b
ANA positivity, n (%)	10 (50%)	15 (20.3%)	0.008	Negative
C3 levels, median (IQR) g L ⁻¹	1.08 (0.97–1.32)	1.30 (1.15–1.48)	0.001	0.9–1.8
C4 levels, median (IQR) g L ⁻¹	0.22 (0.14–0.27)	0.25 (0.20–0.32)	0.05	0.1–0.4
Hemoglobin levels, median (IQR) g dL ⁻¹	14.3 (12.7–15.7)	14.4 (13.1–15.4)	0.81	Female: 12–16; Male: 13–17
Leucocytes counts, median (IQR) ymm ³	5 910 (4 390–7 345)	7 320 (5 702–9 205)	0.02	3 800–10 000
Neutrophils counts, median (IQR) ymm ³	3 390 (2 887–4 127)	4 615 (3 512–5 843)	0.02	1 500–7 500
Lymphocytes counts, median (IQR) ymm ³	1 725 (1 157–2 187)	1 979 (1 480–2 542)	0.13	1 000–3 500
Platelets counts, median (IQR) ymm ³	207 000 (165 000–243 000)	236 000 (184 000–281 000)	0.06	130 000–400 000

IQR 5 Interquartile range.

DRVVT 5 Dilute Russell Viper venom time, APTT 5 activated partial thromboplastin time, SCT 5 silica clotting time, aCL IgG UI 5 anticardiolipin IgG units, aCL IgM UI 5 anticardiolipin IgM units, ab2GP1 5 anti-beta-2 glycoprotein-1, ANA 5 antinuclear antibody, C3 5 complement C3, C4 5 complement C4.

*P value was calculated using Mann–Whitney test.

^aThe local cut-off values for dRVVT ratio were calculated for each reagent lot (percentile 99th) and varied from 1.1 to 1.2.^bThe local cut-off values for ab2GP1 were calculated for each reagent lot (percentile 99th) and varied from 15 to 20 UI.

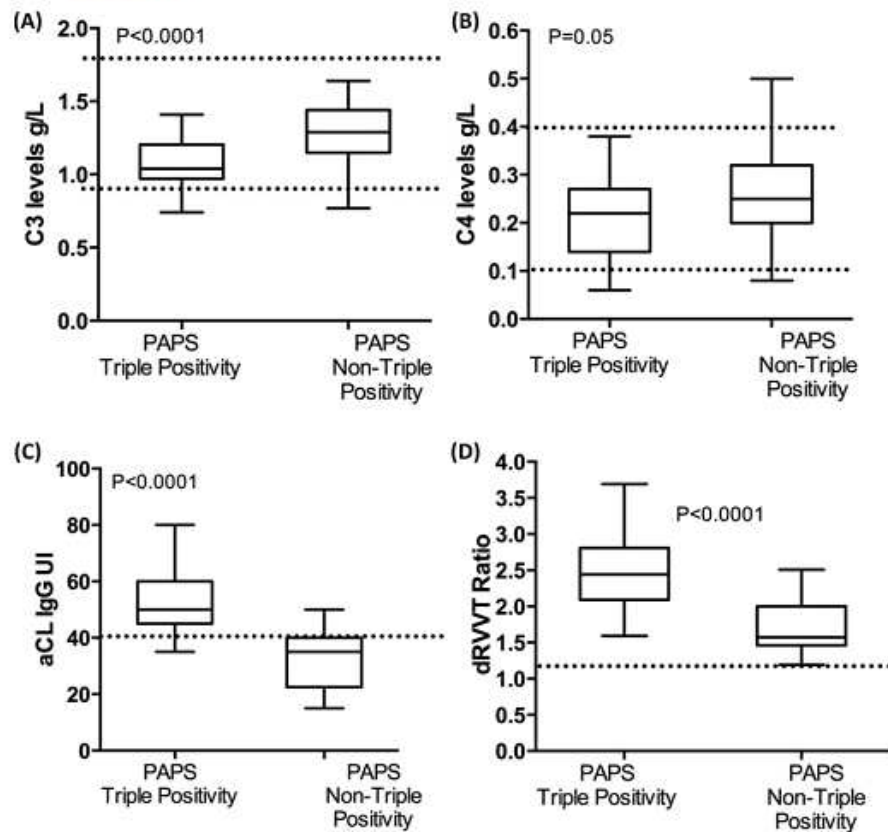


FIGURE 1 Immunologic parameters that were significantly different between TP and non-TP patients. The dash lines indicate the cut offs or reference ranges (RR). a. levels of complement C3 (RR 5 0.9–1.8 g dL⁻¹). b. levels of complement C4 (RR 5 0.1–0.4 g dL⁻¹). c. titers of IgG anticardiolipin (IgG aCL equal or above 40UI was considered positive). d. values of dRVVT ratio (the local cut-off values for dRVVT ratio were calculated as percentile 99th for each reagent lot and varied from 1.1 to 1.2). P value was calculated using Mann-Whitney test.

PAPS 5 antiphospholipid syndrome. aCL- anticardiolipin dRVVT 5 diluted Russell viper venom time

patients (21%) had TP for aPL, while the distribution of the other pro-files were: 48.6% single positivity for LAC, 12.4% single positivity for ab2GP1 or aCL, 11.4% double positivity for LAC plus ab2GP1 (or aCL) and 6.6% double positivity for aCL and ab2GP1.

The demographic distribution was similar between patients with TP and non-TP profile (Table 1), and the presence of TP was not associated with age or gender. As the presence of cardiovascular risk factors may also worsen the prognosis of APS, we evaluated whether patients had comorbidities associated with higher risk of cardiovascular events, such as hypertension, diabetes, dyslipidemia and smoking. The prevalence of cardiovascular risk factors was similar between patients with TP and non-TP profile (Table 1).

Patients with TP presented, at diagnosis, higher dRVVT ratio (median R 5 2.44 vs. 1.57; $P < 0.0001$), higher frequency of positive APTT-SP or SCT assays (68.2% vs. 35.5%; $P 5 0.01$), higher IgG aCL titer (median 5 50UI vs. 35 UI, $P < 0.0001$), and higher frequency of positive ANA test (50% vs. 18%, $P 5 0.007$) than patients without TP. Titers of IgM aCL were similar between TP and non-TP patients (median 5 25UI vs. 20UI, $P 5 0.41$). Lower levels of the complement proteins C3 and C4 were observed in patients with TP compared to

patients without TP profile. The median C3 levels were 1.04 mg dL⁻¹ (IQR 5 0.96–1.19) in patients with TP and 1.30 mg dL⁻¹ (IQR 5 1.15–1.45) in patients with other aPL profiles, $P < 0.0001$. The median C4 levels were 0.22 mg dL⁻¹ (IQR 5 0.14–0.27) in patients with TP and 0.25 mg dL⁻¹ (IQR 5 0.20–0.32) in patients with other aPL profiles, $P 5 0.05$. The levels of the complement protein C3 were correlated with higher titers of IgG-aCL ($r 5 0.359$, $P 5 0.02$) and higher values of dRVVT-ratio ($r 5 0.570$, $P < 0.001$). Laboratory results are shown in Table 2 and Figure 1 illustrates the significantly different results between TP and non-TP patients.

Clinical features related to t-PAPS, such as the site of thrombosis (arterial or venous) and the incidence of thrombosis recurrence, were similar between groups. The median number of thrombotic episodes during the follow-up period was 1.4 in patients with TP profile and 1.5 in patients with non-TP profile. However, pregnancy morbidities were more frequent in women with TP than in those without TP profile during the follow-up period. Fifty-one women got pregnant during the follow-up period, pregnancy morbidities related to APS occurred in 80% of TP patients versus 52.8% of non-TP patients ($P 5 0.05$). Family history of thrombotic events was more frequent in patients with t-

TABLE 3 Clinical presentation and course of t-PAPS, according to the antiphospholipid profile

WILEY

	Triple positivity, N 522	Nontriple positivity, N 583	P*
Site of thrombosis Arterial:Venous, n (%)	17 (77%): 5 (23%)	55 (66%): 28(34%)	0.59
Multiple thrombosis, n (%)	8 (36.4%)	29 (34.9%)	1
Relapse during anticoagulation treatment, n (%)	2 (9.1%)	9 (10.8%)	0.87
Pregnancy morbidities, n (%) ^a	12 (80%)	19 (52.8%)	0.05
Family history of ischemic or thrombotic events, n (%)	3 (18.8%)	30 (47.6%)	0.03

*P value was calculated using Fisher exact test

^aThese data are related to 51 women with history of pregnancy (15 TP and 36 Non-TP).

PAPS and TP than in patients with the non-TP profile. The clinical presentation of patients is shown in Table 3. The only patient who developed clinical features of SLE during the followup had the TP profile.

In multivariate analysis adjusted for gender and age, TP was independently associated with lower than normal levels of C3 levels (OR 5.1; 95%CI 5.1–21.0, P 5 0.02).

3.1¹ Differences within groups of aPL profile

We also evaluated the occurrence of multiple thrombosis, pregnancy morbidities, positive ANA test and complement C3 consumption in each of the following aPL profiles: single positivity for LAC (n 5 51), single positivity for ab2GP1 or aCL (n 5 13), double positivity for LAC plus ab2GP1 or aCL (n 5 12), double positivity for aCL plus ab2GP1 (n 5 7), and TP (n 5 22).

ANA test was positive in 29.2% of patients with single positivity for LAC, 16.7% of patients with single positivity for ab2GP1 or aCL, 12.5% of patients with double positivity for LAC plus ab2GP1 (or aCL), 57% of patients with double positivity for aCL plus ab2GP and 41.7% of patients with TP. The median and interquartile range of complement C3 levels were 1.31 g L⁻¹ (1.17–1.47) in patients with single positivity for LAC, 1.28 g L⁻¹ (0.87–1.42) in patients with single positivity for ab2GP1 or aCL, 1.29 g L⁻¹ (0.99–1.51) in patients with double positivity for LAC plus ab2GP1 or aCL, 1.20 g L⁻¹ (1.04–1.24) in patients with double positivity for aCL plus ab2GP, and 1.04 g L⁻¹ (0.96–1.19) in TP patients.

Multiple thrombosis occurred in 35.3% of patients with single positivity for LAC, 38.4% of patients with single positivity for ab2GP1 or aCL, 25% of patients with double positivity for LAC plus ab2GP1 (or aCL), 42.8% of patients with double positivity for aCL plus ab2GP1 and 36.4% of patients with TP. APS-related morbidities during pregnancy occurred in 40% of patients with single positivity for LAC, 71.4% of patients with single positivity for ab2GP1 or aCL, 80% in double positivity for LAC plus ab2GP1 or aCL, 50% in double positivity for aCL plus ab2GP, and 80% of TP patients.

4¹ DISCUSSION

Patients with t-PAPS present potential risk for thrombosis recurrence, even under anticoagulation treatment,¹⁶ and for the development of systemic autoimmune disease.¹⁷ Up to 10% of PAPS patients develop

SLE in the course of the disease¹⁸ and thrombosis recurrence rate is about 5 to 16%.^{19,20} However, there are no validated parameters for risk classification in PAPS, and markers of prognosis are needed to improve the treatment approach toward patients with higher risk for developing of PAPS-related complications.

In the present study, we could observe that TP antibody profile in patients with PAPS and thrombosis was associated with a higher frequency of pregnancy morbidities. The site of thrombosis and the occurrence of new thrombotic events were not related to TP profile. Patients with TP also had evidences of immune derangement, such as higher IgG aCL titers and DRVVT ratio, positive ANA test and complement consumption, the development of systemic autoimmunity however, was rare. When we evaluated each aPL profile separately, we observed that the prognosis of thrombosis was not affected by the presence of LAC. The number of patients in the subgroups, however, was small and no conclusion could be drawn regarding the specific role of LAC in t-PAPS prognosis.

The association of TP with multiple clinical manifestations of PAPS has been documented in a cohort of patients with obstetric PAPS. In that cohort, TP was associated with history of previous thrombosis and higher risk of thrombosis and pregnancy morbidity during new pregnancies.²¹ Although our results suggested that TP is associated with the occurrence of both obstetric and vascular complications in PAPS, the risk for obstetric events in women with t-PAPS however, was high in all aPL profiles. That finding raises the necessity of conducting appropriate prophylaxis against these complications in women with PAPS.

We observed no association between TP and the site of thrombosis or thrombosis recurrence. This finding was not expected because previous clinical studies have shown that TP confers higher risk for the development of thrombosis and recurrent thrombotic events.^{4,22,23} We believe that the risk of thrombosis in APS may not be attributed solely to the aPL profile. It is important to highlight that inter-laboratory variability of aPL assays is high and the results rely on the assays, reagents, equipment and interpretation strategies employed in the laboratories. The lack of standard assays or reference plasmas contributes to this variability.^{8–10} Therefore, the reproducibility of TP detection between laboratories is expected to be low.

Moreover, clinical parameters may also play a role in the prognosis of PAPS. Recent data from a cohort of patients with APS observed that the aPL profile was not different between patients with or without thrombotic recurrences, while diabetes, familial thrombophilia and

anticoagulation withdrawal were independent risk factors for recurrences.⁵ Indeed, major risk factors for thrombosis, such as hyperlipidemia, arterial hypertension and obesity, seem to play an important role in thrombosis development and recurrence.^{24–27} A recent APS score of risk, the Global Anti-Phospholipid Syndrome score (GAPSS), demonstrated that hyperlipidemia and hypertension are independent risk factors for poorer outcomes in APS.²⁴ In the present study, we could observe that cardiovascular risk factors are highly prevalent in our population. Hypertension was present in 32% of patients, 42% had hyperlipidemia and 30% were obese. The prevalence of these comorbidities was similar between patients with or without TP.

In the present study, triple positivity for aPL was also associated with laboratory features that suggest immune derangement, such as higher dRVVT ratio, higher aCL titers, positive ANA and complement C3 consumption. The significance of these findings are yet to be determined, because, although the diagnosis of systemic autoimmunity may be questioned, no patient fulfilled the criteria for SLE or other systemic autoimmunity, and only one patient developed SLE during the followup time. In the present study, we observed that C3 levels decrease particularly in patients with TP and remain within the normal range in patients with other aPL profiles. The complement activation in APS was reported in murine models and clinical studies and may contribute to procoagulant activity.²⁸ In clinical studies, the activation of the complement pathway was detected in all types of aPL profiles, but particularly in patients with LAC, and double or triple positivity of aPL.²⁹ Hypocomplementemia was also correlated with procoagulant activity in a clinical study that included 36 patients with PAPS.³⁰ Therefore, complement activation may play a role in the cross-talk between inflammation and hypercoagulability APS.³¹

Nevertheless, there are some limitations in this study that must be highlighted. First, this is an observational and retrospective study, and therefore some clinical information may have been missed during the followup. Furthermore, t-PAPS is a relatively rare disease, which contributes to the small sample size of the study and may influence the precision of the results. The data associating the presence of TP with concomitant vascular and obstetric complications in PAPS confirms previous data; however the number of pregnant women in the study was low. Prospective studies in women with PAPS would be necessary to evaluate the risk factors associated with the occurrence of both thrombotic and obstetric complications.

In conclusion, our results suggest that classification of aPL profile, in particular triple positivity, was not enough to identify patients at higher risk of severe thrombosis, thrombosis recurrence or other complications of t-PAPS. TP was associated with higher levels of aPL antibodies and complement consumption and the clinical significance of these findings in PAPS is yet to be determined.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflicts of interest to declare

ORCID

Sabrina da Silva Saraiva  <http://orcid.org/0000-0002-7835-7486>

Marina Pereira Colella  <http://orcid.org/0000-0002-5942-1083>

REFERENCE S

- [1] Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, 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.
- [2] Pengo V, Biasiolo A, Pegoraro C, Cucchini U, Noventa F, Iliceto S. Antibody profiles for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost*. 2005;93(6):1147–1152.
- [3] Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T. Lupus anticoagulants are stronger risk factors for thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature. *Blood*. 2003;101(5):1827–1832.
- [4] Pengo V, Ruffatti A, Legnani C, et al. Clinical course of high-risk patients diagnosed with antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost*. 2010;8(2):237–242.
- [5] Bazzan M, Vaccarino A, Stella S, et al. Patients with antiphospholipid syndrome and thrombotic recurrences: a real world observation (the Piedmont cohort study). *Lupus*. 2016;25(5):479–485.
- [6] Amory CF, Levine SR, Brey RL, et al. Antiphospholipid antibodies and recurrent thrombotic events: persistence and portfolio. *Cerebrovasc Dis*. 2015;40(5–6):293–300.
- [7] Reynaud Q, Lega J-C, Mismetti P, et al. Risk of venous and arterial thrombosis according to type of antiphospholipid antibodies in adults without systemic lupus erythematosus: a systematic review and meta-analysis. *Autoimmun Rev*. 2014;13(6):595–608.
- [8] Devreese KMJ, Pierangeli SS, de Laat B, et al. Testing for antiphospholipid antibodies with solid phase assays: guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost*. 2014;12(5):792–795.
- [9] Favaloro EJ. Variability and diagnostic utility of antiphospholipid antibodies including lupus anticoagulants. *Int J Lab Hematol*. 2013;35(3):269–274.
- [10] Tripodi A, Chantarangkul V, Cini M, et al. Variability of cut-off values for the detection of lupus anticoagulants: results of an international multicenter multiplatform study. *J Thromb Haemost*. 2017;15(6):1180–1190.
- [11] Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1982;25(11):1271–1277.
- [12] Pengo V, Tripodi A, Reber G, et al. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on. *J Thromb Haemost*. 2009;7(10):1737–1740.
- [13] CLSI. Laboratory Testing for the Lupus Anticoagulant: Approved Guideline. CLSI document H60-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
- [14] Gharavi AE, Harris EN, Asherson RA, Hughes GR. Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity. *Ann Rheum Dis*. 1987;46(1):1–6.
- [15] de Laat B, Derksen RHW, Urbanus RT, de Groot PG. IgG antibodies that recognize epitope Gly40-Arg43 in domain I of beta 2-glycoprotein I cause LAC, and their presence correlates strongly with thrombosis. *Blood*. 2005;105(4):1540–1545.
- [16] Cervera R, Piette JC, Font J, et al. Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis Rheum*. 2002;46(4):1019–1027.
- [17] Veres K, Szodoray P, Szekanecz Z, et al. Clinical and immunoserological characteristics of the transition from primary to overlap antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2010;19(13):1520–1526.

- [18] Cervera R, Serrano R, Pons-Estel GJ, et al. Morbidity and mortality in the antiphospholipid syndrome during a 10-year period: a multicentre prospective study of 1000 patients. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(6):1011–1018.
- [19] Bertero M, Bazzan M, Carignola R, et al. Antiphospholipid syndrome in northwest Italy (APS Piedmont Cohort): demographic features, risk factors, clinical and laboratory profile. *Lupus*. 2012;21(7):808–809.
- [20] Cervera R, Khamashta MA, Shoenfeld Y, et al. Morbidity and mortality in the antiphospholipid syndrome during a 5-year period: a multicentre prospective study of 1000 patients. *Ann Rheum Dis*. 2009;68(9):1428–1432.
- [21] Ruffatti A, Tonello M, Del Ross T, et al. Antibody profile and clinical course in primary antiphospholipid syndrome with pregnancy morbidity. *Thromb Haemost*. 2006;96(3):337–341.
- [22] Pengo V, Ruffatti A, Legnani C, et al. Incidence of a first thromboembolic event in asymptomatic carriers of high-risk antiphospholipid antibody profile: a multicenter prospective study. *Blood*. 2011;118(17):4714–4718.
- [23] Yelnik CM, Urbanski G, Drumez E, et al. Persistent triple antiphospholipid antibody positivity as a strong risk factor of first thrombosis, in a long-term follow-up study of patients without history of thrombosis or obstetrical morbidity. *Lupus*. 2016;26(2):163–169.
- [24] Sciascia S, Sanna G, Murru V, Roccatello D, Khamashta MA, Bertolaccini ML. GAPSS: the global anti-phospholipid syndrome score. *Rheumatology (Oxford)*. 2013;52(8):1397–1403.
- [25] Saraiva SDS, Custodio IF, Mazetto BDM, et al. Recurrent thrombosis in antiphospholipid syndrome may be associated with cardiovascular risk factors and inflammatory response. *Thromb Res*. 2015;136(6):1174–1178.
- [26] Pengo V, Testa S, Martinelli I, et al. Incidence of a first thromboembolic event in carriers of isolated lupus anticoagulant. *Thromb Res*. 2015;135(1):46–49.
- [27] Ruffatti A, Del Ross T, Ciprian M, et al. Risk factors for a first thrombotic event in antiphospholipid antibody carriers: a prospective multicentre follow-up study. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(6):1083–1086.
- [28] Oku K, Nakamura H, Kono M, et al. Complement and thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Autoimmun Rev*. 2016;15(10):1001–1004.
- [29] Breen KA, Seed P, Pamar K, Moore GW, Stuart-Smith SE, Hunt BJ. Complement activation in patients with isolated antiphospholipid antibodies or primary antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost*. 2012;107(3):423–429.
- [30] Oku K, Atsumi T, Bohgaki M, et al. Complement activation in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2009;68(6):1030–1035.
- [31] Cavazzana I, Manuela N, Irene C, et al. Complement activation in anti-phospholipid syndrome: a clue for an inflammatory process? *J Autoimmun*. 2007;28(2–3):160–164.

How to cite this article: da Silva Saraiva S, de Moraes Mazetto B, Quinteiro Tobaldine L, et al. The impact of antibody profile in thrombosis associated with primary antiphospholipid syndrome. *Am J Hematol*. 2017;92:1163–1169. <https://doi.org/10.1002/ajh.24875>