

U.PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

*SÍNDROMA AUTOIMUNE / AUTOINFLAMATÓRIO
INDUZIDO POR ADJUVANTE
– SÍNDROMA ASIA OU DE SHÖENFELD*

DIOGO AGOSTINHO MAGALHÃES RIBEIRO

Dissertação de Mestrado em Medicina

Porto, Junho 2013

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

Diogo Agostinho Magalhães Ribeiro

Aluno nº 200601002

Email: ribeirdiogo@gmail.com

*SÍNDROMA AUTOIMUNE / AUTOINFLAMATÓRIO INDUZIDO POR
ADJUVANTE – SÍNDROMA ASIA OU DE SHÖENFELD*

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre
em Medicina submetida ao Instituto de Ciências
Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do
Porto.

Orientador – Dr.^a Lúcia Raquel Moreira Faria

Categoria – Licenciatura em Medicina

Aluna de Doutoramento em Ciências Médicas –
ICBAS-UP

Afiliação – Assistente Hospitalar de Medicina
Interna no CHP-HSA

Resumo

As vacinas são uma das maiores conquistas da medicina moderna, sendo utilizadas em animais e humanos em todo o mundo de forma segura, permitindo a erradicação de doenças infecciosas letais e prevenção de epidemias. Com o avanço da biotecnologia, a utilização de vacinas de antígenos purificados, em vez de vacinas vivas ou atenuadas, aumentou o perfil de segurança, contudo tornou-as menos imunogênicas, sendo necessário adicionar adjuvantes.

Adjuvantes imunológicos são substâncias que funcionam como indutores de imunidade, acelerando, prolongando ou aumentando a resposta imune antígeno-específica, sem causarem efeito antigênico específico por si. Estimulam o sistema imune interferindo tanto com sistema imune inato como o adaptativo. Além disso, permitem diminuir a quantidade de antígenos necessários e assim a produção de vacinas mais seguras e de uma maior quantidade de vacinas. Alguns exemplos são o alumínio, pristano, escaleno e componentes infecciosos. O silicone não é utilizado como adjuvante imunológico contudo, desencadeia uma resposta sobreponível, pelo que se insere aqui a sua discussão.

Apesar da finalidade dos adjuvantes ser estimular a resposta imune aos antígenos, a interação destes com fatores de predisposição individual, como fatores genéticos, pode despoletar manifestações autoinflamatórias ou mesmo doenças autoimunes, como demonstrado por diversos modelos animais e relatos humanos, como o apresentado nesta dissertação.

Shoenfeld e Agmon-Levin propuseram o Síndrome Autoimune/Autoinflamatório induzido por adjuvantes, que engloba condições com sinais e sintomas semelhantes, assim como um denominador comum: a exposição prévia a adjuvantes - entre as quais a Siliconose, o Síndrome da Guerra do Golfo, a Miofasceíte Macrofágica e outros fenómenos adversos pós-vacinais. Este permite agrupar condições até aqui menos esclarecidas, com possíveis implicações futuras a nível de diagnóstico, terapêutica e prevenção. Após a sua descrição outras entidades foram propostas como indo de encontro a este síndrome.

Apesar destes efeitos adversos serem raros, tendo em conta que milhões de pessoas saudáveis são sujeitas a vacinas anualmente por programas vacinais dos diferentes países, é necessário o desenvolvimento de novos adjuvantes vacinais mais seguros.

Palavras-chave: Autoimunidade; Adjuvante; Vacina; Síndrome ASIA; Síndrome da Guerra do Golfo; Siliconose; Miofasceíte Macrofágica

Abstract

Vaccines are one of the greatest achievements of modern medicine and are used safely in animals and humans worldwide allowing the eradication of lethal infectious diseases and epidemic prevention. With the advance of biotechnology, the use of purified antigen vaccines instead of attenuated or lived vaccines increased the safety profile, however these are less immunogenic making necessary to add adjuvants.

Immunological adjuvants are substances that act as immunity inducers, accelerating, prolonging or enhancing the antigen-specific immune response without causing one on its own. These stimulate the immune system by interfering with both the innate and adaptive immune system. Furthermore, they enable the decrement of antigen amount and thereby the production of safer vaccines and the production of a large amounts of vaccines. Some examples are aluminum, pristane, squalene and infectious components. The silicone is not used as an immune adjuvant however triggers a similar response so it inserts in this discussion.

Although the purpose of the adjuvants is stimulate the immune response to the antigens, their interaction with individual predisposing factors, such as genetic factors, may trigger autoinflammatory events or even autoimmune diseases, as demonstrated in several animal models and human reports, like the one reported in this dissertation.

Shoenfeld and Agmon-Levin proposed the Autoimmune/Autoinflammatory syndrome induced by adjuvants, which includes conditions with similar signs and symptoms as well as a common denominator: previous exposure to adjuvants - among which the Siliconosis, the Gulf War Syndrome, the Macrophagic Myofasciitis and other adverse events following vaccination. This allows you to group conditions far less known, with possible future implications in terms of diagnosis, therapy and prevention. After his description, other entities were proposed as meeting his criteria.

Despite these adverse effects are rare, given that millions of healthy people are vaccinated every year, it is necessary the development of safer adjuvants.

Keywords: Autoimmunity; Adjuvant; Vaccine; ASIA Syndrome; Gulf War Syndrome; Siliconosis; Macrophagic Myofasciitis

Lista de Abreviaturas

APC – célula apresentadora de antigénio

AR – artrite reumatóide

ASIA – síndrome autoimune/autoinflamatório induzido por adjuvantes

CFA – adjuvante de Freund completo

CK – creatinina quinase

DAMP – padrão molecular associado ao dano

DC – doença de Crohn

EBV – vírus Epstein Barr

GWS – síndrome da Guerra do Golfo

HAV – vírus hepatite A

HBV – vírus hepatite B

IFA – adjuvante de Freund incompleto

IFN – interferão

LES – lúpus eritematoso sistémico

LPS – lipopolissacarídeos

MHC – complexo principal de histocompatibilidade

MPL – monofosforil lipídeo A

NLR – recetor *NOD-Like*

PAMP – padrão molecular associado a patogénio

PRR – recetor de reconhecimento de padrão

SAF – síndrome antifosfolipídeo

SBS – síndrome do edifício doente

TLR – recetor *Toll-Like*

Índice

Introdução	2
Adjuvantes.....	4
Tipos de adjuvantes	4
Modulação da Imunidade Adaptativa pela Imunidade Inata.....	6
Autoinflamação induzida por Adjuvantes.....	9
Agentes infecciosos como adjuvantes imunológicos.....	11
Doenças autoimunes e fenómenos pós-vacinais	12
Síndrome de ASIA.....	13
Siliconose.....	14
Síndrome da Guerra do Golfo	16
Miofasceíte Macrofágica e o adjuvante alumínio	18
Repensando outros síndromas à “luz” do Síndrome ASIA.....	20
Caso Clínico	22
De que forma este caso nos ilustra a MMF? O que traz de novo?	23
Conclusão.....	24
Agradecimentos	25
Bibliografia	26

Introdução

As vacinas são uma das maiores conquistas da medicina moderna, uma das ferramentas mais eficazes na prevenção de doenças infecciosas. Desde a sua introdução, por Edward Jenner em 1778, são utilizadas em animais e humanos em todo o mundo de forma segura, permitindo a erradicação de doenças infecciosas letais e a prevenção de epidemias^(1, 2).

Com o avanço da biotecnologia, a utilização de vacinas de antígenos purificados, em vez de vacinas vivas ou atenuadas, aumentou o perfil de segurança, contudo tornou-as menos imunogênicas, pelo que houve necessidade de adicionar adjuvantes eficientes, que estimulam o sistema imune a reconhecer os antígenos^(3, 4).

Os adjuvantes imunológicos são substâncias que funcionam como indutores de imunidade, aumentando a resposta imunológica antígeno-específica, idealmente sem desencadear uma resposta imune por si, além de diminuir a quantidade de antígenos necessários e assim permitir a produção de uma maior quantidade de vacinas⁽¹⁾. Alguns fatores ambientais que funcionam como adjuvantes imunes são o alumínio, pristano, escaleno e componentes infecciosos^(1, 3, 5). Apesar do silicone não ser considerado diretamente um adjuvante imunológico, acaba por ter um comportamento fisiopatológico semelhante e desencadear um síndrome clínico sobreponível, pelo que se insere aqui a sua discussão.

A vacinação, e os adjuvantes em particular, são geralmente muito seguros, sendo imunizadas milhões de pessoas todos os anos a nível mundial sem apresentarem efeitos laterais de relevo. Contudo, apesar da finalidade dos adjuvantes ser estimular a resposta imune inata e adaptativa, diversos modelos animais têm demonstrado que os adjuvantes podem induzir autoimunidade, podendo contribuir para o desenvolvimento de uma doença autoimune/autoinflamatória. Para além disso, várias revisões casuísticas e relatos individuais de casos clínicos têm apontado para uma possível associação entre vacinas, silicone e outros fatores ambientais e doenças imuno-mediadas, o que tem originado questões e preocupações na comunidade médica e jurídica^(3, 6). Assim, em determinadas circunstâncias devido à interação destes com fatores de predisposição individual, como fatores genéticos, podem ser despoletadas manifestações autoinflamatórias ou mesmo doenças autoimunes^(1, 7).

Nos últimos anos, algumas condições patológicas têm sido associadas a exposição prévia a adjuvantes, tais como a Siliconose, o síndrome da Guerra do Golfo, a Miofascíte Macrofágica e as reações adversas pós-vacinais. Para além da exposição prévia a adjuvantes, estes quadros também apresentam um conjunto de sinais e sintomas semelhantes, o que reforça a ideia de um denominador em comum, os

adjuvantes. Tal facto levou Yehuda Shoenfeld a propor o seu agrupamento num síndrome: o Síndrome Autoimune/Inflamatório induzido por adjuvantes (ASIA)⁽¹⁾.

Neste âmbito, esta dissertação propõe-se a avaliar sistematicamente a literatura científica existente sobre esta temática ilustrando-a com um caso clínico de uma jovem de 17 anos com miofasceíte macrofágica após a vacina anti-meningocócica.

Adjuvantes

Adjuvantes imunológicos são substâncias que aceleram, prolongam ou aumentam a resposta imune antigénio-específica, sendo definidos pelo *National Cancer Institute* como agentes que podem estimular o sistema imune e aumentar a resposta às vacinas, sem causarem qualquer efeito antigénico específico por si^(1, 3).

Os adjuvantes estimulam o sistema imune interferindo tanto com sistema imune inato como o adaptativo^(1, 2). Estes podem alterar a forma de apresentação dos antigénios ou funcionar como imunopotenciadores, influenciando tanto a magnitude como a qualidade da resposta imune adaptativa⁽⁸⁾.

O efeito imunológico dos adjuvantes advém de diferentes modos de ação^(3, 8):

- Promoção da libertação gradual dos antigénios, devido à proteção física que lhes proporcionam. Como tal, aumentam o tempo de exposição do sistema imune aos antigénios, levando ao aumento da produção e ativação de células B e T e a uma resposta mais vigorosa.
- Promovem a translocação dos antigénios para os gânglios linfáticos, onde estes podem ser reconhecidos pelas células T.
- Aumentam a reação no local de inoculação, com libertação de quimiocinas e induzem a libertação de citocinas inflamatórias, o que leva ao recrutamento de células B e T para o local de inoculação.
- Funcionam como imunopotenciadores, ativando o sistema imune inato, através da interação com recetores de reconhecimento de padrões (PRRs).

Tipos de adjuvantes

Diferentes tipos de adjuvantes foram desenvolvidos até aos dias de hoje, existindo adjuvantes inorgânicos, orgânicos e outros, como adjuvantes biológicos. Apesar do grande número de adjuvantes desenvolvidos, apenas uma pequena proporção está aprovada, por questões de segurança, para uso em humanos: sais de alumínio, MF59, ASO3 (emulsões de óleo em água contendo escaleno) e ASO4 (monofosforil lipídeo A e alumínio) (Tabela 1)⁽⁸⁾. Os restantes são utilizados em medicina veterinária ou em pesquisas científicas, encontram-se vários adjuvantes em ensaios clínicos para aprovação posterior em humanos⁽⁹⁾.

Adjuvante	Componente Imune Ativo	Vacinas
Alumínio	Sais de Alumínio	Diversas (ex: anti-HBV; anti-HAV; anti-meningocócica)
MF59	Emulsão de Escaleno	Vacina Anti-Influenza e H1N1
AS03	Emulsão de Escaleno	H1N1
AS04	MPL + Sais de Alumínio	HBV e HPV

Tabela 1: Adjuvantes licenciados para uso humano^(8, 9)

- **Adjuvantes Inorgânicos**

Sais de alumínio: o mais usado em medicina^(3, 4). Foram os primeiros adjuvantes licenciados para uso humano, e desde a sua introdução em 1920 até meados do ano 2000 foram os únicos utilizados em vacinas⁽⁸⁾. As formas mais utilizadas são o hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio⁽³⁾.

- **Adjuvantes Orgânicos**

Emulsões: misturas de diferentes óleos em água, como óleos minerais, vegetais ou animais, frequentemente encontradas em fórmulas vacinais utilizadas em medicina veterinária. Alguns exemplos são os adjuvantes de Freund, IFA e CFA, o pristano⁽³⁾.

- **Adjuvantes Biológicos**

Podem derivar de produtos bacterianos ou análogos sintéticos, como o monofosforil lipídio A (MPL), oligonucleótidos, lipoproteínas e toxóides bacterianos (derivados da toxina da cólera e toxina da *E. coli*), e são potentes estimulantes do sistema imune inato; algumas citocinas e hormonas endógenas, como IL-12 e GM-CSF, também podem funcionar como adjuvantes biológicos indutores de inflamação^(3, 4).

- **Novos Adjuvantes**

MF59 e AS03: uma emulsão formada pela mistura do escaleno em água. Promove tanto a resposta humoral como celular^(3, 4).

Adjuvantes agonistas dos TLR: AS02 – emulsão de MPL e QS-21; AS04 – combinação de MPL e sais de alumínio. Foi o primeiro adjuvante TLR licenciado^(3, 10).

QS-21, os ISCOMs e Advax: têm na sua constituição saponinas, que são constituintes comuns das plantas e conhecidos por provocarem um aumento substancial da resposta imune. Estes promovem a resposta humoral, das células T *helper* e células T citotóxicas, além de aumentarem a captação, processamento e apresentação dos antígenos por parte das células apresentadoras de antígenos⁽⁴⁾.

Viossomas: um adjuvante desenvolvido nas últimas duas décadas através da otimização do *design* dos lipossomas, partículas muito utilizadas para o transporte de antígenos, através da incorporação na sua membrana de hemaglutininas e neuraminidases do vírus influenza. Estas glicoproteínas vão direcionar e facilitar a fusão do viossoma com as células apresentadoras de antígenos, levando à libertação do antígeno que transportam no interior destas últimas, promovendo assim o seu processamento e apresentação nas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) I, imitando uma resposta imune natural^(3, 4).

Modulação da Imunidade Adaptativa pela Imunidade Inata

O crescente conhecimento da interação entre o sistema imune inato e adaptativo levou a um maior esclarecimento sobre o mecanismo de ação dos adjuvantes. Durante as últimas décadas, ficou claro que a sinalização através da ativação do sistema imune inato é necessária para uma adequada resposta imune adaptativa⁽⁸⁾. A ativação dos PRRs leva ao recrutamento de células do sistema imune, ativação de células apresentadoras de antígenos (APCs) e aumenta a captação, processamento e apresentação de antígenos através do MHC I ou II^(3, 8).

Os adjuvantes estimulam a resposta imune inata por mimetizarem Padrões Moleculares Associadas a Patógenos (PAMPs): como os componentes da parede bacteriana, lipopolissacarídeos de bactérias Gram negativas (LPS), RNA de cadeia simples e DNA contendo a sequência CpG. Alguns adjuvantes também induzem Padrões Moleculares associados a Dano (DAMPs), que acabam por ser antígenos endógenos⁽⁸⁾.

Os PAMPs e os DAMPs são reconhecidos pelos PRRs existentes nas células do sistema imune inato, principalmente os recetores *Toll-like* (TLRs) e os recetores *NOD-like* (NLRs)^(3, 8).

O aumento de atividade das APCs e dos linfócitos leva a um aumento da reação local aos antígenos e ao aumento da libertação de quimiocinas, como a heparina e histamina, e citocinas inflamatórias por parte das células T *helper* e mastócitos, o que leva ao recrutamento de mais células tanto do sistema imune inato como do sistema imune adaptativo para o local afetado^(1, 3).

Nos órgãos linfóides secundários, os diferentes tipos de adjuvantes vão ser reconhecidos por diferentes recetores, induzindo a produção de diferentes citocinas (ex: IL-4, IL-2, INF- γ , IL-12) que criam microambientes distintos e, assim, definem o tipo de linhagem com a qual as células T CD4⁺ se vão comprometer (Th1 ou Th2). A IL-12 é uma citocina importante no contexto da transformação das células T *naïve* para Th1, enquanto a IL-4 é essencial na transformação para Th2^(4, 8, 10).

Recetores *Toll-Like* (TLR)

São uma classe de PRRs existente na membrana dos leucócitos, sendo os melhores caracterizados até à data⁽¹⁰⁾. Existem pelo menos treze TLRs identificados em mamíferos, dez dos quais em humanos, cada um com uma especificidade característica para diferentes componentes bacterianos, como o LPS para o TLR4, flagelina para o TLR5 e RNA de cadeia simples para o TLR7^(3, 8, 10). Para além disso, os TLRs também se ligam a DAMPs. A união do ligando ao TLR, quer na forma de adjuvante usado na vacinação ou durante a infeção natural, marca o evento molecular chave que vai induzir a resposta imune inata e o desenvolvimento de resposta imune adquirida antigénio-específica, e daí atualmente tantos adjuvantes serem desenvolvidos para simular ligandos de TLRs⁽³⁾. Após a sua ativação, os TLRs recrutam proteínas de adaptação citosólicas que vão propagar o estímulo induzido pelo antigénio. Existem cinco proteínas de adaptação descritas atualmente (MyD88, TRIF, TRAM, TIRAP e SARM)⁽¹⁰⁾. Estas proteínas são responsáveis pela posterior ativação de outras proteínas, de entre as quais proteínas quinases, que vão ampliar o sinal e levar à transcrição ou supressão de genes responsáveis pela regulação da resposta inflamatória e outros eventos transcripcionais, levando à produção de citocinas, aumento da proliferação e sobrevivência e a uma maior imunidade adaptativa^(3, 10).

Recetores *NOD-Like* (NLR)

Os NLRs incluem uma grande família de recetores intracelulares que podem detetar tanto patogénios como sinais de stress. Estes são constituídos por um domínio central nucleótido (NOD), um domínio C-terminal rico em leucina e um domínio efetor N-terminal pirina ou recrutador da caspase. Enquanto o NOD1 e NOD2 resultam na expressão de genes pró-inflamatórios, outros, como o NLRP3, ativam a caspase-1 que processa os precursores inativos da IL-1 β , IL-18 e IL-33 resultando na libertação destas citocinas nas formas ativas⁽¹¹⁾.

Durante muitos anos pensou-se que a atividade adjuvante dos sais de alumínio se devia à persistência e à libertação prolongada dos antigénios do local de injeção sob uma

forma favorável a captação pelas APCs, aumentando assim a resposta imune aos antígenos (Teoria Depot). Contudo, estudos recentes demonstraram que a via dos NLRs desempenha um papel importante na ação adjuvante dos sais de alumínio⁽¹¹⁻¹³⁾. Eisenbarth *et al.*⁽¹²⁾ demonstraram que os sais de alumínio promovem a sua ação adjuvante através da ativação do inflamassoma NLRP3, independentemente dos TLRs. A produção de IL-1 β e IL-18 pelos macrófagos *in vitro* em resposta ao alumínio requeria uma via do inflamassoma inata intacta, além de que ratos deficientes em NALP3, ASC ou caspase-1 não atingiam uma resposta humoral suficiente em resposta aos antígenos associados ao adjuvante alumínio, respondendo a outros adjuvantes que atuam através dos TLRs, como o CFA. Demonstraram ainda que a via do inflamassoma inato pode levar a uma resposta humoral adaptativa, privilegiando a diferenciação Th2 em vez de Th1⁽¹²⁾. Kool *et al.*⁽¹⁴⁾ demonstraram uma possível explicação para o mecanismo de ativação do inflamassoma NLRP3, defendendo que o alumínio ativa as APCs por provocar a secreção de ácido úrico, uma molécula gerada pelo trauma de células e tecidos. Em ratos injetados com antígenos associados a alumínio o nível de ácido úrico aumentava substancialmente. Presumivelmente, a citotoxicidade dos sais de alumínio causa a libertação de ácido úrico, uma DAMP endógena, com a formação posterior de cristais de urato monossódico que podem posteriormente ser fagocitados por macrófagos e outros leucócitos locais, levando a disrupção de lisossomas, o que resulta na libertação de cathepsina B que podem ativar diretamente ou indiretamente o inflamassoma NALP3 intracelular e a caspase-1⁽¹⁴⁾.

Contudo, outros autores colocaram em causa a hipótese de Kook *et al.*, advogando a hipótese de uma via de ativação direta por parte do alumínio após a sua fagocitose⁽¹¹⁾.

Os sais de alumínio induzem preferencialmente uma resposta humoral. Outros ensaios demonstraram que tal pode ser devido ao recrutamento de uma população de eosinófilos produtores de IL-4, que contribui para a indução de uma resposta adaptativa Th2^(1, 11).

O alumínio é um adjuvante muito eficiente para doenças para as quais uma resposta neutralizante humoral é necessária, contudo este é um mau indutor de uma resposta imune Th1, um componente importante para o desenvolvimento de vacinas contra patógenos intracelulares. Uma estratégia promissora é o desenvolvimento de novos agonistas TLR, como o MPL por exemplo, um derivado do LPS da *Salmonella minnesota*, que podem promover um ambiente pró-inflamatório durante a indução da imunidade adaptativa que resulta na indução de respostas Th1⁽¹⁵⁾.

Com o objetivo de induzir respostas imunes mais potentes e protetoras, a conjugação de diferentes DAMPs e PAMPs com ação em diferentes PRRs tem vindo a ser desenvolvida, como no caso do ASO4, uma conjugação de hidróxido de alumínio e MPL, atualmente aprovado para uso humano em vacinas contra o HPV e HBV⁽⁸⁾.

Autoinflamação induzida por Adjuvantes

Ao longo dos tempos, os adjuvantes foram considerados como substâncias seguras, representando pouca ou nenhuma ameaça. Contudo, nas últimas décadas foi sendo descrita a capacidade de alguns induzirem inflamação descontrolada ou mesmo doenças autoimunes^(1, 3, 16).

O alumínio, utilizado como adjuvante imunológico, é um elemento omnipresente na vida atual, podendo ser absorvido por variadas interações com o ambiente, pela dieta, exposição ocupacional, de entre outras⁽¹⁷⁾.

É raro existirem efeitos adversos graves da administração das vacinas com alumínio, contudo podem originar abscessos estéreis, eosinofilia e miofasceíte (ver adiante), havendo alguma preocupação em relação ao seu potencial papel em doenças neurodegenerativas^(4, 6). Estudos apontam este adjuvante como um potencial fator na indução de Doença de Crohn (DC) em indivíduos suscetíveis, havendo diversas semelhanças entre a sua atividade imune e a fisiopatologia imune da DC⁽¹⁷⁾.

As emulsões utilizadas como adjuvantes contêm diversos tipos de substâncias oleosas, como os óleos minerais, por exemplo o Bayol F ou o pristano, um constituinte comum destes, óleos vegetais, além de outros tipos, como o escaleno, extraído de óleos de peixe⁽¹⁸⁾. Um estudo realizado por Bassi *et al.*⁽¹⁹⁾ em ratos NZB/NZWF1, um modelo murino de lúpus eritematoso sistémico (LES) humano, revelou o desenvolvimento de glomerulonefrite lúpus-like e o aparecimento de autoanticorpos anti-dsDNA após a injeção do adjuvante CFA. Outro estudo realizado nesse modelo murino de LES demonstrou a capacidade do pristano em desenvolver uma doença lúpus-like: uma resposta inflamatória local, com a formação de tecido linfóide ectópico, foi responsável pela formação de autoanticorpos, a qual depende da via de sinalização dos recetores do interferão (IFN) I, à semelhança da doença em humanos⁽²⁰⁾. No estudo de Hogenesch *et al.*⁽²¹⁾ a imunização de cães resultou na produção de autoanticorpos incluindo autoanticorpos associados a LES. A imunização dos ratos com pristano levou ao aumento da produção de IFN-I por monócitos, mediada pela via de sinalização TLR7-MyD88⁽²⁰⁾. Potter *et al.* demonstrou que a injeção intraperitoneal de óleos minerais induz a formação de plasmocitomas em ratos BALB/c^(3, 20). Kuroda *et al.*⁽¹⁸⁾ demonstrou que uma única injeção intraperitoneal de adjuvantes óleos como o pristano, escaleno e IFA induzia

a produção de autoanticorpos associados ao LES, como anti-Sm e anti-Su, em ratos BALB/c não autoimunes. A produção destes autoanticorpos parece estar associada a capacidade dos óleos minerais induzirem a produção de IL-12, IL-6 e TNF- α , sugerindo uma relação com a capacidade adjuvante dos óleos minerais⁽¹⁸⁾. Kuroda *et al.*⁽²²⁾ também demonstrou a capacidade dos óleos minerais medicinais (MO-F e MO-S) induzirem a produção de anticorpos anti-citoplasmáticos, anti-ssDNA e anti-cromatina, sugerindo implicações patogénicas destes adjuvantes em doenças autoimunes humanas. Além disso, foi demonstrado que o pristano, IFA e escaleno induzem artrite crónica em ratos⁽³⁾. Koppang *et al.*⁽²³⁾, demonstraram que a imunização de salmões com vacinas com adjuvantes óleos induziu a produção de autoanticorpos assim como condições autoimunes, com granulomas do fígado e peritoneu, doença tromboembólica e glomerulonefrite imuno-mediada.

Para além da utilização como adjuvantes vacinais, os óleos minerais, geralmente considerados como não tóxicos, são muito utilizados na indústria alimentar e cosmética⁽³⁾. Parece existir um paralelismo temporal sob uma perspetiva histórica entre a evolução de pelo menos uma doença autoimune agressiva, a Artrite Reumatóide (AR), e a descoberta e utilização de óleos minerais em produtos amplamente utilizados, como alimentos e cosméticos⁽²⁴⁾. Relatos recentes indicam que o uso habitual de cosméticos comuns, habitualmente contendo óleos minerais, aumentam o risco de AR na população geral^(24, 25). Foi demonstrado que injeções subcutâneas de óleos minerais induzem a formação de lipogranulomas esclerosantes, uma resposta inflamatória crónica local, assim como a sua absorção intestinal induz a formação de lipogranulomas nos gânglios linfáticos, fígado e baço de indivíduos saudáveis. Em estudos efetuados em ratos, a aplicação de alguns cosméticos à base de óleos minerais induziu artrite⁽³⁾. Assim como nos humanos, a incidência e magnitude da resposta lesiva nos animais em estudo depende de fatores genéticos, sendo então o quadro clínico determinado pela interação entre os diferentes óleos e a resistência do indivíduo⁽²⁴⁾. Vera-Lastra *et al.*⁽²⁵⁾ relataram o impacto de injeções ilegais de diferentes óleos com objetivos cosméticos em cinquenta mulheres. A maioria recebeu injeções de óleo mineral (82%). Trinta apresentaram manifestações autoimunes não-específicas, enquanto vinte apresentaram critérios de doença autoimune específica, como LES, AR, esclerose sistémica, anemia hemolítica autoimune, tiroidite autoimune, hepatite autoimune e colite ulcerosa. Entre os óleos propriedades adjuvantes, os óleos minerais são particularmente lesivos caso não sejam prontamente metabolizados ou eliminados, através da descamação cutânea no caso dos cosméticos ou nas fezes, quando utilizados como laxantes ou aditivos alimentares. Estes acumulam-se lentamente no sistema reticuloendotelial, onde tendo uma semivida indefinida, tendo um papel não só no desenvolvimento mas também na perpetuação da autoimunidade crónica⁽²⁵⁾.

Além de relatos de efeitos adversos com o uso de um adjuvante, há evidência de que a administração simultânea de dois ou três adjuvantes pode ultrapassar barreiras genéticas de resistência a doenças autoimunes⁽²⁶⁾.

Agentes infecciosos como adjuvantes imunológicos

A ativação de mecanismos autoimunes por micro-organismos é comum, existindo uma forte associação entre agentes infecciosos e o desenvolvimento de patologias autoimunes/autoinflamatórias^(19, 27, 28), como a clássica relação entre a infecção por *Streptococcus pyogenes* e o desenvolvimento de febre reumática⁽²⁸⁾ ou a associação entre a infecção por *C. jejuni* e o síndrome de Guillian-Barré^(2, 28). Contudo, nem sempre se desenvolve uma doença autoimune e aparentemente nem sempre é agente-específica. O efeito “adjuvante” dos componentes microbianos, isto é, a ativação não-antigénica do sistema imune inato e a expressão de várias citocinas reguladoras, podem determinar se uma resposta autoimune se mantém limitada e inofensiva ou se evolui para uma doença autoimune⁽¹⁾.

A associação entre um determinado agente infeccioso e o desenvolvimento de uma patologia autoimune específica, como os exemplos anteriores, é caso raro. Estudos revelam que mais do que um micro-organismo pode induzir a mesma doença autoimune, como é o caso da esclerose múltipla, onde estão descritos mais de cinquenta micro-organismos associados ao seu desenvolvimento⁽²⁷⁾, ou a diabetes tipo 1^(27, 28). Além disso, o mesmo micro-organismo pode estar associado ao desenvolvimento de mais do que uma patologia autoimune, como é o caso do vírus Epstein Barr (EBV), associado à AR, LES e esclerose múltipla^(15, 27). Outra questão pertinente e não resolvida é a do tempo decorrido entre a exposição ao micro-organismo e o diagnóstico de doença autoimune. Alguma evidência epidemiológica sugere que a exposição ao agente infeccioso durante a infância pode preparar o terreno para o desenvolvimento de uma doença autoimune na vida adulta⁽²⁷⁾.

Os micro-organismos podem induzir autoimunidade através de diversos mecanismos antigénio-específicos, como a alteração ou incorporação de antigénios do hospedeiro, disseminação de epítomos, ativação policlonal ou o mimetismo molecular, um dos principais processos, no qual há partilha de alguns determinantes antigénicos entre micro-organismo e hospedeiro, de entre outros^(27, 29, 30).

Diversa bibliografia aponta as vacinas como um possível indutor de autoimunidade, aplicando-se também a estas os mecanismos de indução de autoimunidade referidos anteriormente⁽¹⁵⁾. Noel Rose⁽²⁷⁾ sugeriu o efeito adjuvante como outro possível mecanismo através do qual as infeções se relacionam com a

autoimunidade. Jules Freund foi o responsável pelo desenvolvimento do CFA (Adjuvante Freund Completo), uma emulsão de água e óleo com micobactérias mortas. A importância do CFA no desenvolvimento de autoimunidade está bem documentada. Um exemplo é a imunização de animais com CFA e tireoglobulina (antigénio da tiróide), que resultou na produção de autoanticorpos com produção de lesões inflamatórias na tiróide. Pelo contrário, a imunização de tireoglobulina com IFA (Adjuvante de Freund Incompleto, sem o componente da micobactéria), apenas induziu a produção de anticorpos anti-tireoglobulina, sem produzir as lesões inflamatórias na tiróide⁽³¹⁾. Estudos posteriores de Yi-Chi-Kong demonstraram que a adição de um componente microbiano, células da parede microbiana por exemplo, ao IFA levava à indução das lesões características na tiróide, apoiando a ideia de um papel adjuvante dos componentes microbianos⁽²⁷⁾. Em outro modelo de autoimunidade, a adição de LPS ao vírus Coxsackie B3 ultrapassou uma barreira genética, induzindo uma severa miocardite numa estirpe de ratos resistente à infecção pelo vírus Coxsackie B3. Estes achados demonstram claramente que um potente efeito adjuvante pode ultrapassar resistências genéticas a doenças autoimunes⁽²⁷⁾.

Doenças autoimunes e fenómenos pós-vacinais

A diversidade de condições descritas após a imunização com as diversas vacinas existentes suporta a ideia de que a vacinação pode induzir condições autoimunes em indivíduos geneticamente suscetíveis. Em casos raros, podem induzir quer o desenvolvimento de autoanticorpos, como foi documentado por Vista *et al.*⁽³²⁾ e Perdan-Pirkmajer *et al.*⁽³³⁾, quer condições inflamatórias inespecíficas e doenças autoimunes, dentro das quais são frequentemente descritas manifestações não específicas como artrite, lesões neuronais, fadiga, encefalite e vasculite⁽³⁴⁾. O estabelecimento desta relação causal permanece um desafio, tendo em conta que as manifestações podem ocorrer meses a anos após a imunização⁽³⁵⁾. Contudo, para algumas vacinas esta relação encontra-se melhor estabelecida, como é o caso do surto do Síndrome de Guillain-Barré em 1976 após a imunização contra a gripe suína^(36, 37), sendo também aceite a relação entre a VASPR e trombocitopenia autoimune, artrite após imunização combinada com DTP e VASPR e mielite transversa após a vacina oral para a poliomielite⁽³⁴⁾.

Soldevilla *et al.*⁽³⁸⁾ descreveram três casos com o diagnóstico de Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) após imunização com a vacina HPV, estando também descrita a associação desta vacina com outras condições autoimunes⁽³⁹⁾. Agmon-Levin *et al.*⁽⁴⁰⁾ também descreveram dez casos de LES associado à vacina HBV, além de outros relatos encontrados na literatura médica^(41, 42). Zafrir *et al.*⁽⁴³⁾ descreveram ainda manifestações clínicas comuns entre 93 doentes diagnosticados com diferentes

condições imuno-mediadas após vacina HBV, sugerindo um denominador comum. Uma associação plausível entre a vacina anti-influenza e polimialgia reumática e arterite de células gigantes foi descrita por Soriano *et al.*⁽⁴⁴⁾, sendo também descrito por Agmon-Levin *et al.*⁽³⁵⁾ um caso em que houve um agravamento de um quadro de LES após esta vacina.

Apesar do referido anteriormente, o grau elevado de segurança das vacinas tem sido persistentemente comprovado⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾, e nos estudos de Verstraeten *et al.*⁽⁴⁸⁾ sobre o adjuvante ASO4 em 68000 pessoas, de Chao *et al.*⁽⁴⁹⁾ sobre a vacina HPV quadrivalente, de entre outros^(50, 51), não existiu uma forte evidência para estabelecer uma relação entre a vacinação e o desenvolvimento de doenças autoimunes.

Logo, tendo em consideração a importância da vacinação na medicina atual, o seu uso deve continuar. No entanto, os profissionais de saúde devem estar alerta se sinais e sintomas relevantes aparecerem após a vacinação, pela existência da possibilidade de uma aceleração/desenvolvimento de condições autoimunes em determinadas pessoas.

Síndrome de ASIA

Shoenfeld e Agmon-Levin⁽¹⁾ descreveram um novo síndrome intitulado Síndrome Autoimune/autoinflamatório induzido por adjuvantes (ASIA) ou Síndrome de Shoenfeld (como já foi proposto por alguns autores⁽⁵²⁾), que engloba condições com sinais e sintomas semelhantes, assim como um denominador comum, a exposição prévia a uma substância com propriedades adjuvantes: a Siliconose, o Síndrome da Guerra do Golfo, a Miofascíte Macrofágica e outros fenómenos adversos pós-vacinais.

Este síndrome inclui diversas condições que não são totalmente caracterizadas como doenças autoimunes e aparece após a estimulação crónica do sistema imune por agentes com propriedades adjuvantes^(16, 53). Os autores propuseram diversos critérios major e minor (Tabela 2) que podem auxiliar no diagnóstico⁽¹⁾. A definição deste síndrome permite assim um melhor estudo de condições até aqui menos esclarecidas sob um “teto comum”, com possíveis implicações futuras a nível de diagnóstico, terapêutica e prevenção.

Critérios sugeridos por Shoenfeld para o diagnóstico de ASIA⁽¹⁾

Critérios Major:

- Exposição a um estímulo externo (infecção, vacina, silicone, adjuvante) anterior às manifestações clínicas
- Aparecimento de manifestações clínicas “típicas”:
 - Mialgias, miosite ou fraqueza muscular
 - Artralgias e/ou artrite
 - Fadiga crónica, sono não reparador ou distúrbios do sono
 - Manifestações neurológicas (especialmente associadas a desmielinização)
 - Défice cognitivo, perda memória
 - Febre, boca seca
- Melhoria após remoção de agente causador
- Biópsia típica de órgãos envolvidos

Critérios Minor:

- Aparecimento de autoanticorpos ou anticorpos contra o adjuvante suspeito
 - Outras manifestações clínicas (ex: síndrome intestino irritável)
 - HLA específico (ex: HLA DRB1, HLA DQB1)
 - Envolvimento de uma doença autoimune específica (ex: esclerose múltipla, esclerose sistémica)
-

Tabela 2: Critérios diagnósticos sugeridos por Shoenfeld para o síndrome ASIA⁽¹⁾.

Para o diagnóstico de ASIA tem de existir pelo menos a presença de dois critérios major ou um critério major e dois critérios minor^(5, 52).

Siliconose

O papel do silicone no desenvolvimento de fenómenos e doenças autoimunes tem sido motivo de debate há já muitos anos⁽¹⁾. Previamente considerado como um material biológico inerte, foi amplamente incorporado nos mais variados materiais médicos, como implantes articulares, válvulas cardíacas artificiais, lentes intraoculares e, o seu uso médico mais amplamente reconhecido, como componente principal de implantes mamários, introduzidos nos anos 60. Contudo, pouco tempo após a sua introdução, começaram a surgir na literatura médica diversos casos de esclerodermia e outras doenças do tecido conjuntivo em mulheres com implantes mamários de silicone, sugerindo uma relação causal entre os implantes mamários de silicone e o desenvolvimento de doenças do tecido conjuntivo⁽⁵⁴⁾.

Após a implantação, forma-se uma cápsula em torno do implante mamário de silicone, como parte da resposta inflamatória normal contra um corpo estranho grande demais para ser fagocitado pelos macrófagos^(54, 55). Existe difusão do silicone, conhecido como “sangramento”, através da membrana elastomérica do implante para os tecidos circundantes, que ocorre mesmo na ausência do rutura⁽⁵⁶⁾, aumenta com o tempo e

contribui para um aumento da resposta inflamatória local⁽⁵⁴⁾. Há evidência de migração de partículas de silicone para os gânglios linfáticos⁽⁵⁷⁾, podendo originar uma resposta imune sistêmica, para além da resposta local, que pode originar tumores ou doenças autoimunes⁽⁵⁴⁾. Diversos estudos demonstraram ativação do sistema imune e produção de autoanticorpos, incluindo anticorpos anti-silicone, em mulheres com mamoplastia de aumento com implantes de silicone⁽⁵⁸⁻⁶³⁾. Sendo o silicone, à semelhança dos adjuvantes discutidos anteriormente, aparentemente capaz de induzir fenómenos autoimunes, pode ser inferida uma ação adjuvante-*like* do silicone⁽⁵⁴⁾.

Até 1998 já se encontravam descritos 290 casos de mulheres com doenças do tecido conjuntivo associadas a implantes mamários, muitas das quais com esclerodermia⁽⁶⁴⁾. Diversos relatos continuaram a surgir^(58, 64-72), como os quatro casos de esclerodermia descritos por Levy *et al.*⁽⁶⁴⁾ em mulheres após implantes mamários de silicone ou o caso de morfeia numa mulher de 56 anos descrito por Kivity *et al.*⁽⁶⁷⁾ dois anos e meio após implantes mamários. Jara *et al.*⁽⁶⁶⁾ reportou o caso de uma mulher com doença de Still diagnosticada aos 11 anos que após se submeter aos 22 anos a uma cirurgia estética com introdução de implantes mamários de silicone desenvolveu um síndrome lúpus-*like* transitório, ocorrendo uma ativação severa da doença de Still aos 25 anos. Após remoção das próteses mamárias o quadro clínico melhorou. Outros casos que demonstram uma associação entre a ativação da doença de Still no adulto e implantes mamários de silicone encontram-se descritos⁽⁶⁸⁻⁷²⁾. Na maioria ocorreu uma reativação severa da doença de Still, tendo-se desenvolvido uma coagulopatia disseminada intravascular nos casos em que os implantes mamários não foram removidos. O estudo de Hennekens *et al.*⁽⁷³⁾, um grande estudo coorte com base em sintomas auto-referidos em 11800 mulheres com implantes mamários, sugeriu existir um risco ligeiramente aumentado para todas as doenças do tecido conjuntivo, sendo o risco relativo de 1.25.

Apesar de existirem casos relatados e estudos demonstrando uma associação entre implantes mamários de silicone e o desenvolvimento de doenças do tecido conjuntivo, a maior meta-análise feita até à data por Janowsky *et al.*⁽⁷⁴⁾ em 2000 demonstrou que não havia evidência de uma associação entre implantes mamários de silicone e doenças do tecido conjuntivo ou outras doenças reumatológicas, sendo o risco relativo de apenas 0.8.

Contrariamente à controvérsia existente em relação à associação entre doenças autoimunes definidas e implantes mamários de silicone, uma associação entre um conjunto particular de sinais e sintomas que não preenchem totalmente os critérios para uma doença do tecido conjuntivo específica e implantes mamários de silicone tem sido reconhecida por diversos autores, sendo conhecido por siliconose. Vasey *et al.*⁽⁷⁵⁾

concluiu que existia um aumento estatisticamente significativo em diversos sinais e sintomas associados a implantes mamários de silicone, tais como mialgias, dores articulares, fadiga anormal, anormalidades cutâneas, febre inexplicável, cefaleias, alterações cognitivas, depressão, de entre outros. Noutro estudo, Fryzek *et al.*⁽⁷⁶⁾ demonstrou um aumento estatisticamente significativo em 16 dos 28 sintomas estudados num grupo de 1546 mulheres com implantes mamários comparativamente com um grupo controlo de 2496 mulheres submetidas a mamoplastias de redução. Estas manifestações vão de encontro às já descritas anteriormente para as outras entidades que fazem parte do síndrome ASIA, satisfazendo também diversos dos critérios diagnósticos para a fibromialgia e síndrome de fadiga crónica, como demonstrado por Brown *et al.*⁽⁷⁷⁾.

Um outro ponto a favor desta relação, é o facto de a sua remoção melhorar em grande parte os sintomas, como visto em alguns dos casos descritos anteriormente, como demonstrou Aziz *et al.*⁽⁷⁸⁾ através do seguimento de 95 mulheres com implantes mamários de silicone e sintomas reumatológicos, nas quais ocorreu uma melhoria da sintomatologia em 97% das mulheres que removeram os implantes, havendo um agravamento do quadro em 96% das mulheres que não removeram os implantes, assim como demonstrado pelos achados de outros estudos⁽⁷⁹⁻⁸²⁾. A ausência de melhoria clínica após a remoção dos implantes mamários de silicone pode estar relacionada com a presença da cápsula que se forma em torno do implante, que pode conter fragmentos de silicone e que frequentemente não é removida juntamente com o implante, sendo assim aconselhável realizar também uma capsulectomia em mulheres sintomáticas⁽⁶⁶⁾.

Em geral, a literatura médica sugere não existir uma associação significativa entre implantes mamários de silicone e o desenvolvimento de doenças do tecido conjuntivo, nomeadamente esclerodermia. Contudo, temos de ter em consideração que a maioria dos estudos até à data têm um curto período de seguimento e que se focam apenas em doenças autoimunes definidas e não em sintomas mais inespecíficos sugestivos de doenças autoimunes, pelo que estudos com um maior tempo de seguimento, assim como focados em sintomas mais inespecíficos, como demonstrado por Levy *et al.*⁽⁶⁴⁾, são necessários para inferir com maior grau de segurança a relação entre implantes mamários de silicone e doenças autoimunes definidas.

Síndrome da Guerra do Golfo

Foi descrito pela primeira vez em 1998 em veteranos de guerra que não sofriam de doenças reumáticas clássicas, mas que apresentavam sinais e sintomas característicos deste tipo de patologias⁽⁵²⁾, de entre os quais, fadiga muscular e cansaço, mal-estar, mialgias, artralgias, distúrbios cognitivos, ataxia, cefaleias, diarreia, febre,

exantema, disfunção urinária, distúrbios da sudorese, distúrbios gastrointestinais e do sono. Além destes, também excessiva sensibilidade química e intolerância a odores estão descritos. O seu principal sintoma é a fadiga crónica (também comum na Miofasceíte Macrofágica)⁽⁸³⁾.

A etiologia deste síndrome não é clara, contudo a bibliografia existente aponta para uma diversidade de possíveis fatores, de entre os quais, o Brometo de Piridostigmina usado como profilaxia para o gás asfixiante, exposição a uma variedade de químicos, como inseticidas, fumo de incêndios em poços de petróleo, urânio empobrecido, stress físico e psicológico ou devido a certos esquemas vacinais, nos quais a aplicação de múltiplas vacinas num curto espaço de tempo estaria associada ao aparecimento do Síndrome da Guerra do Golfo (GWS)⁽⁸³⁾. Uma teoria sugeriu que devido à vacinação em massa, o GWS poderia resultar de uma resposta imune crónica Th2 induzida pelos adjuvantes, algo já associado anteriormente ao síndrome de fadiga crónica e à fibromialgia, originando então um quadro semelhante a Síndrome de Fadiga Crónica nos veteranos da Guerra do Golfo^(1, 83). Contudo, Peakman *et al.*⁽⁸⁴⁾ veio contrariar esta polarização da resposta imune em direção a uma resposta imune Th2, reconhecendo que o efeito de múltiplas vacinas permanecia como um possível fator etiológico para GWS, mas sem uma base imunológica definida.

Durante a Guerra do Golfo o esquema vacinal incluía uma vacina contra o Anthrax, a qual era administrada num regime de seis doses e incluía os adjuvantes hidróxido de alumínio e escaleno⁽²⁾. Asa *et al.*⁽⁸⁵⁾ tentou determinar se a presença de anticorpos contra o adjuvante escaleno estava relacionada com a presença de sinais e sintomas de GWS, e chegou à conclusão que quase a totalidade dos veteranos com sinais e sintomas de GWS tinham anticorpos contra o escaleno (95% dos veteranos mobilizados da Guerra do Golfo com GWS e 100 % dos veteranos imunizados para a operação *Desert Shield*, mobilizados e não mobilizados, que apresentavam sinais e sintomas de GWS) contrariamente ao grupo de controlo, que incluía indivíduos com doenças autoimunes, indivíduos saudáveis e veteranos da guerra do Golfo Pérsico sem sinais e sintomas de GWS, os quais não apresentavam anticorpos contra o adjuvante escaleno. Tendo em conta o referido anteriormente, apesar da etiologia do GWS não estar completamente esclarecida, os resultados obtidos por Asa *et al.* apontam para um possível papel dos adjuvantes, principalmente o escaleno, no desenvolvimento deste síndrome⁽²⁾.

Miofasceíte Macrofágica e o adjuvante alumínio

A miofasceíte macrofágica (MMF) é uma miopatia inflamatória rara, descrita inicialmente, em França em 1993, como uma entidade de origem desconhecida detetada em adultos de meia-idade com mioartralgias difusas, fadiga crónica e caracterizada por uma lesão patognomónica na biópsia muscular do deltóide: infiltrado celular predominante de macrófagos (com aglomerados de nanocristais no seu citoplasma), mas também com linfócitos⁽⁸⁶⁾.

Posteriormente foi demonstrado por Gherardi *et al.*⁽⁸⁷⁾ que estes aglomerados eram causados pela deposição de hidróxido de alumínio, frequentemente utilizado como adjuvante em vacinas, sendo encontrados de forma persistente no citoplasma dos macrófagos da lesão MMF através de microscopia eletrónica e estudos microanalíticos. Os indivíduos tinham uma função renal normal, com níveis plasmáticos de alumínio normais. Além disso, a localização exclusiva da lesão no músculo deltóide coincidia com o local habitual de vacinação, não existindo outra fonte particular de exposição ao alumínio que não a imunização contra a hepatite B, hepatite A e toxóide tetânico, sugerindo que as lesões da MMF estariam relacionadas com a imunização de vacinas que contêm o adjuvante hidróxido de alumínio⁽⁸⁷⁾.

É atualmente claro que a rápida emergência de casos de MMF em França resultou da combinação de três fatores⁽⁸⁸⁾:

- No início dos anos 90:
 - Substituição da via subcutânea pela intramuscular para a vacinação;
 - Primovacinação “em massa” com a vacina HBV à população adulta, em França;
- Escolha do músculo deltóide esquerdo (também utilizado para a vacinação) para a biópsia muscular de rotina, enquanto na maioria dos outros países são utilizados o bíceps braquial e o quadríceps femoral.

Após a descrição inicial, diversos outros casos foram relatados, demonstrando uma associação entre o desenvolvimento de MMF e o uso de vacinas que têm na sua constituição alumínio^(87, 89-91) e foi demonstrada esta associação em modelos animais^(88, 90).

A lesão da MMF é atualmente reconhecida como sendo o resultado da persistência anormal do hidróxido de alumínio usado com adjuvante vacinal no local da prévia inoculação, podendo induzir uma doença muscular imuno-mediada em indivíduos suscetíveis⁽⁸⁸⁾. Como foi descrito anteriormente, o hidróxido de alumínio estimula o sistema imunitário conduzindo a resposta imune para um perfil Th2. É possível que uma

ativação persistente do sistema imune, devido à permanência do hidróxido de alumínio no local de inoculação, com libertação sustentada de citocinas inflamatórias e autoanticorpos, represente a base patofisiológica da MMF⁽⁸⁷⁾. Para além disso, Gherardi *et al.*⁽⁸⁷⁾ demonstraram que uma proporção importante das partículas injetadas no músculo é rapidamente fagocitadas por macrófagos e escapam do local de imunização para os gânglios linfáticos e posteriormente para outros tecidos, como o cérebro. Isto acontecerá especialmente se forem produzidos sinais de recrutamento de células inflamatórias, como a quimiocina MCP-1/CLL2, ou se houver uma barreira hematoencefálica permeável, podendo este ser o elo de ligação entre a lesão local e as manifestações sistémicas, especialmente neurológicas, que parecem existir em cerca de 8% dos doentes com MMF. Contudo, a biodistribuição das partículas de alumínio após a inoculação no músculo ainda é pouco clara⁽⁸⁸⁾.

Tendo em conta a bibliografia existente até à data, a MMF é uma doença maioritariamente do adulto, sendo raros os casos descritos em crianças⁽⁸⁸⁾, mas tal pode dever-se à discrepância entre o local de imunização e o local anatómico clássico da biópsia, pelo que diversos casos de MMF podem ainda não estar diagnosticados, mascarando a real frequência de MMF tanto nos adultos como nas crianças. No entanto, lesões semelhantes podem ser encontradas em biópsias do músculo quadríceps femoral de bebés e crianças, coincidindo com o local habitual de imunização^(88, 91).

Outra questão pertinente é se os achados histológicos correspondem a uma reação transitória local ou a uma reação inapropriada persistente ao alumínio⁽⁹¹⁾. O tempo entre a vacinação e a deteção histológica de MMF pode ser muito longo, indo de meses até 8-10 anos após a imunização⁽¹⁾. O tempo normal de permanência do hidróxido de alumínio no músculo e conseqüente lesão MMF após a vacinação não se encontra estabelecido⁽⁸⁷⁾, sendo consensual considerar-se que a MMF é persistente quando o tempo entre a última vacina e a deteção de MMF é superior a 18 meses⁽⁸⁸⁾.

A MMF é caracterizada por sinais e sintomas sistémicos inespecíficos e uma lesão ativa no local de inoculação⁽⁸⁷⁾. As manifestações clínicas são variadas e incluem mialgias, artralgias, fadiga crónica, e menos frequentemente, fraqueza muscular e febre^(88, 92). Como referido anteriormente, os sintomas aparecem meses após a última imunização, sendo o tempo médio de aparecimento dos primeiros sintomas sistémicos de 7 meses após a última vacina, e de 11 meses para o aparecimento da mialgia⁽⁵²⁾. Tipicamente, os doentes referem mialgias difusas mas maioritariamente nos membros inferiores (apesar de não haver descrição de biópsias alteradas dos músculos distais afetados) e raramente no local de imunização^(87, 88). Estão também descritas alterações cognitivas, como perda de memória, alterações de humor e distúrbios de atenção⁽⁸⁸⁾. Os exames complementares são geralmente normais (com exceção da biópsia), mas

também estão descritos casos de valores elevados de creatinina quinase (CK) e de sedimentação eritrocitária, assim como o aparecimento de autoanticorpos, alterações miopáticas na eletromiografia^(52, 88) e a cintilografia com gadolínio pode demonstrar um aumento da captação global de gadolínio, predominantemente nas áreas dolorosas ao longo das fâscias musculares e tecidos para-articulares do membro⁽⁹³⁾. Cerca de 15-20% dos doentes com MMF desenvolvem simultaneamente uma doença autoimune, sendo mais frequentes disfunções desmielinizantes indistinguíveis de esclerose múltipla, tiroidite de Hashimoto e doenças neuromusculares difusas, como dermatomiosite, miopatia autoimune necrotizante ou miastenia gravis⁽⁸⁸⁾.

A biópsia muscular revela, de forma consistente, um padrão patognomónico de MMF: infiltração focal do epimísio, perimísio e endomísio perifascicular por grandes macrófagos PAS-positivos (ácido periódico de Schiff), não epitelióides, com linfócitos T CD8+ intercalados ocasionais, sem lesão aparente das fibras musculares. Os macrófagos expressam CD68 e o complexo principal de histocompatibilidade I (MHC I)⁽⁸⁸⁾. As fibras musculares distantes do infiltrado são geralmente normais⁽⁸⁸⁾, contudo em poucos casos foi feita uma segunda biópsia longe do local de inoculação⁽⁸⁷⁾. Na microscopia eletrónica, pequenas estruturas osmofílicas espiculadas são evidentes no citoplasma dos macrófagos, representando cristais de hidróxido de alumínio^(91, 92).

A associação da MMF com doenças autoimunes e a existência de casos familiares de MMF, aliada à disparidade entre a ampla utilização do hidróxido de alumínio como adjuvante vacinal e a raridade da MMF sugere que fatores de suscetibilidade individual, como uma determinada base genética, representem um papel crucial no tipo de resposta imune e na intolerância ao alumínio^(88, 91). Estudos revelaram que a MMF ocorre principalmente em indivíduos portadores do gene HLA-DRB1*01, também associado a um aumento do risco para artrite reumatóide ou polimialgia reumática. Logo, o alumínio representa um fator ambiental capaz de induzir efeitos adversos em indivíduos geneticamente suscetíveis⁽⁸⁸⁾.

Repensando outros síndromas à “luz” do Síndrome ASIA

Desde que foi inicialmente descrito por Shoenfeld, diversas publicações têm apontado novas entidades como indo de encontro ao síndrome ASIA.

Israeli *et al.*⁽⁹⁴⁾ defende mesmo que o “Síndrome do edifício doente” (SBS), um termo criado para definir um conjunto de sinais e sintomas que ocorrem em ocupantes de um determinado edifício sem causa definida, deveria ser também incorporado no ASIA síndrome juntamente com as entidades descritas por Shoenfeld, pois segundo o autor este partilha nove dos dez sintomas mais reportados nessas entidades e respeita a

maioria dos critérios definidos por Shoenfeld, de entre os quais a exposição a um estímulo externo anterior às manifestações (edifício), as manifestações clínicas típicas, o aparecimento de anticorpos contra alguns materiais com propriedades adjuvantes presentes no edifício, assim como o facto de a remoção do estímulo induzir uma melhoria clínica (abandono do edifício).

De igual forma, outros síndromas crónicos de etiologia desconhecida, como o Síndrome de Fadiga Crónica ou mesmo a Fibromialgia apresentam sintomatologia semelhante à sintomatologia característica do síndrome ASIA, pelo que uma revisão de uma possível exposição prévia a adjuvantes será aconselhável à luz do conhecimento atual, podendo estes doentes ser enquadrados neste novo síndrome proposto por Shoenfeld⁽⁵⁾. O Síndrome de Fadiga Crónica, heterogéneo e de etiologia desconhecida, é caracterizado por fadiga incapacitante, perda de memória, depressão e dor músculo-esquelética com pelo menos seis meses de duração⁽⁶³⁾. A sua relação com vacinação prévia, principalmente esquemas de múltiplas vacinas como sugerido pelo GWS, e implantes de silicone tem sido sugerida⁽⁹⁵⁾, como apontam os casos clínicos relatados por Nancy *et al.*⁽⁵⁸⁾ e Exley *et al.*⁽⁹⁰⁾. Do mesmo modo, a relação da fibromialgia com a vacinação tem sido descrita⁽⁹⁶⁾.

Uma outra entidade, o Síndrome Antifosfolípideo (SAF) ou Síndrome de Hughes, também tem sido apontada como indo de encontro ao síndrome ASIA em certos casos, havendo na literatura médica casos descritos de SAF após a imunização de diferentes vacinas⁽⁹⁷⁾. Diversos modelos animais demonstraram a capacidade de diferentes adjuvantes vacinais de induzir a produção de diferentes anticorpos antifosfolípidos^(32, 98, 99), demonstrando também que a resposta imune depende do adjuvante utilizado assim como da herança genética⁽⁹⁷⁻⁹⁹⁾, à semelhança da MMF.

Além do silicone, outros materiais utilizados na indústria cosmética podem induzir ASIA, como demonstrado por Alijotas-Reig *et al.*⁽¹⁰⁰⁾ num estudo coorte de 250 doentes com ASIA após injeção de diferentes biomateriais.

Caso Clínico

Descrevo aqui o caso de uma mulher, caucasiana, de 15 anos de idade que, em outubro de 2007, iniciou mialgias distais dos antebraços, artrite tibiotársica bilateral e febre intermitente, com picos máximos de 39°C, 6 meses após a vacina anti-Neisseria meningitidis C (excipiente: hidróxido de alumínio). Laboratorialmente apresentava uma velocidade de sedimentação aumentada (VS > 90mm/1^{ah}), bicitopenia (anemia hipoproliferativa normocítica/normocrômica e leucopenia com linfopenia), valores de CK inferiores a 200 U/L, ANAs positivos com um título de 1/320 com padrão mosqueado (ENAs negativos, anticorpos anti-dsDNA negativos), valores de C3 aumentados com valores normais de C4, fator reumatóide 2 vezes o limite superior do normal, anticorpos anti-CCP negativos, gamapatia policlonal (IgG até 2gr/dL) e uma beta2microglobulina aumentada (3mg/dL).

Tendo em conta a clínica e os resultados laboratoriais estaríamos perante uma doença do tecido conjuntivo que não satisfazia os critérios de nenhuma doença definida, assumindo-se o diagnóstico de doença do tecido conjuntivo indiferenciada.

Iniciou então corticoterapia com prednisolona 7.5mg/dia, havendo uma resolução clínica e analítica completa. Em agosto de 2009, ressurgem mialgias, com franco predomínio no antebraço direito com edema do mesmo e impotência funcional. Não apresentava febre ou alterações analíticas. A RMN do antebraço direito (Fig.1) demonstrava um hipersinal difuso dos grupos musculares flexores do antebraço, abrangendo os compartimentos superficial e profundo, prolongando-se ao longo das correspondentes junções miotendinosas, com intensa captação muscular de gadolínio na região do

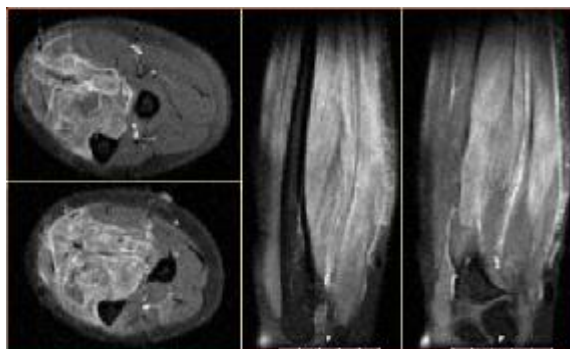


Fig.1: RMN do antebraço direito.

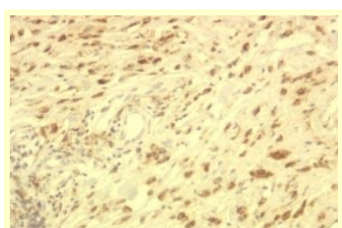


Fig.3: Imuno-histoquímica: marcador CD68 macrófágico com marcada positividade.

compartimento flexor do antebraço. Realizou biópsia muscular do compartimento flexor do antebraço direito (Fig.2), que mostrou fibrose e processo inflamatório muito extenso envolvendo o endomísio e perimísio e a fáscia, com toalhas de células macrófágicas e alguns linfócitos e plasmócitos perivasculares, não se identificando granulomas ou organismos, com teste imuno-histoquímico de elevada positividade para CD68 (Fig.3).

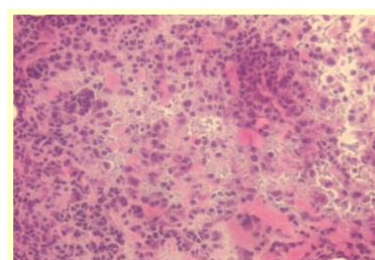


Fig.2: HE - Fáscia onde se observam numerosas células de aspeto macrófágico e alguns linfócitos.

Admitido o diagnóstico de MMF, iniciou tratamento com prednisolona havendo uma melhoria franca da sintomatologia, com desaparecimento dos sinais inflamatórios com o decorrer do tratamento. Apesar de ter sido introduzida azatioprina (durante o desmame de corticóide) e reabilitação física, nunca foi possível atingir doses terapêuticas por leucopenia com neutropenia e cefaleias, nem foi possível fazer desmame do corticóide por reaparecimento da dor. Apesar da melhoria do quadro agudo, o antebraço manteve-se com fascíte clinicamente detetável. Após nove meses de tratamento suspendeu azatioprina, e iniciou metotrexato em doses crescentes em março de 2011, com melhoria franca do endurecimento do antebraço direito. Em setembro de 2012 teve recidiva clínica da miofascíte, com agravamento de edema, mialgias e impotência funcional do membro superior direito, com aumento temporário da dose de prednisolona para controlo da componente inflamatória, estando controlada até à presente data e com melhoria da inflamação da imagem por RMN.

De que forma este caso nos ilustra a MMF? O que traz de novo?

O caso ilustra o possível percurso de uma MMF que se manifesta inicialmente como uma doença indiferenciada do tecido conjuntivo com síndrome inflamatório exuberante, seis meses após a inoculação no músculo deltóide esquerdo.

Existem casos anedóticos que reportam qual a terapêutica utilizada para controlo sintomático e imunossupressão na MMF^(89, 90, 101). Neste caso, a resposta foi favorável unicamente com corticoterapia e com metotrexato.

Este caso parece ser o primeiro de focalização tão específica num único grupo muscular fora do local de inoculação, com expressão na RMN e biópsia patognomónica de MMF num local distante da inoculação. Ao contrário do que é descrito, neste caso a biópsia foi feita no músculo flexor do antebraço, local das queixas, e não no deltóide. São raros os casos em que foi feita uma segunda biópsia numa zona distante do local de inoculação, pelo que se desconhece se a afetação mais reportada dos membros inferiores não poderá também ser representada histologicamente.

A biodistribuição do alumínio após a inoculação é ainda pouco clara nos dias de hoje, pelo que existe a possibilidade da lesão muscular aparecer em outros locais que não o de inoculação na MMF.

Conclusão

Tendo em conta a revisão da bibliografia existente até à data e o caso aqui descrito podemos verificar que o desenvolvimento de condições autoimunes/autoinflamatórias após o contacto com as mais diversas substâncias com propriedades adjuvantes (vacinas, cosmética, meio ambiente) é possível. Apesar disso, esses efeitos laterais são raros, tendo em conta que milhões de pessoas são sujeitas a vacinas ou intervenções cosméticas anualmente, pelo que outros fatores estarão envolvidos no seu desenvolvimento, como a genética, resultando assim da ação dos adjuvantes em indivíduos geneticamente suscetíveis (ex. Gene HLA DRB1 na MMF).

Para além disso, temos que ter em consideração que a maioria dos estudos aponta para doenças autoimunes definidas, além de tempos de follow-up curtos, pelo que novos modelos de avaliação dos adjuvantes são necessários. É também necessário ter em consideração que as vacinas são administradas em indivíduos saudáveis, muitas vezes impostas por programas vacinais de diferentes países e entidades empregadoras, devendo ser dada especial atenção às crianças, pois durante o seu desenvolvimento são expostas a um grande número de vacinas, havendo evidência de que a administração simultânea de dois ou três adjuvantes pode ultrapassar barreiras genéticas de resistência a doenças autoimunes, pelo que estudos rigorosos do impacto de diferentes vacinas em adultos e crianças são necessários.

Apesar do referido anteriormente, os programas vacinais devem continuar e ser encorajados pois os benefícios do controlo de diversas doenças infecciosas e oncológicas que estes permitem ultrapassam claramente o peso dos seus efeitos adversos, devendo os profissionais de saúde estar alerta se sinais e sintomas relevantes aparecerem após a vacinação.

O ASIA permite agrupar condições até aqui menos esclarecidas, perceber melhor a etiologia de condições até aqui consideradas idiopáticas, com possíveis implicações futuras a nível de diagnóstico, terapêutica e prevenção, pois como foi possível verificar esta reação aos adjuvantes tem por base uma suscetibilidade genética, como o caso do gene HLA DRB1 na MMF, pelo que testes genéticos prévios às imunizações podem vir a funcionar como marcadores de risco (quando economicamente viável), permitindo a formulação de vacinas adaptadas ao *status* genético individual e à evicção de determinados adjuvantes. Além disso, é necessário o desenvolvimento de adjuvantes cada vez mais efetivos e seguros, como as mais recentes emulsões AS03 e MF59 e adjuvantes agonistas dos TLRs, como o AS04, licenciados nos últimos tempos.

Agradecimentos

Ter a oportunidade de escrever aqui os meus agradecimentos é algo que me deixa muito feliz e orgulhoso, pois é sinal de que estou no final de um percurso longo, muito trabalhoso e a iniciar uma carreira numa área que adoro, a Medicina.

Em primeiro lugar, queria deixar um agradecimento muito especial à minha orientadora, a Dr.^a Raquel Faria, pelo estímulo intelectual, grande apoio prestado, crítica científica e os muitos conhecimentos transmitidos ao longo da realização desta dissertação. Os agradecimentos também se estendem para além deste trabalho, para a altura das aulas de Medicina II, pois foi graças à si que o meu interesse pela área de imunologia despertou, área até então desconhecida para mim e pela qual nutro agora um amor crescente.

Gostaria também de agradecer a todos os docentes do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, assim como a todos os profissionais do CHP-HSA pelo tempo e conhecimentos investidos em mim, espero estar à altura dos mesmos, assim como a todos os amigos e família, pois sem eles não estaria aqui.

Bibliografia

1. Shoenfeld Y, Agmon-Levin N. 'ASIA' - autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants. *Journal of autoimmunity*. 2011;36(1):4-8.
2. Toubi E. ASIA-autoimmune syndromes induced by adjuvants: rare, but worth considering. *The Israel Medical Association journal : IMAJ*. 2012;14(2):121-4.
3. Israeli E, Agmon-Levin N, Blank M, Shoenfeld Y. Adjuvants and autoimmunity. *Lupus*. 2009;18(13):1217-25.
4. Ebensen T, Guzman CA. Immune modulators with defined molecular targets: cornerstone to optimize rational vaccine design. *Human vaccines*. 2008;4(1):13-22.
5. Carvalho JF, Barros SM, Branco JC, Fonseca JE. Asia or Shoenfeld's syndrome: highlighting different perspectives for diffuse chronic pain. *Ata reumatologica portuguesa*. 2011;36(1):10-2.
6. Meroni PL. Autoimmune or auto-inflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA): old truths and a new syndrome? *Journal of autoimmunity*. 2011;36(1):1-3.
7. Muniz Caldas CA, Freire de Carvalho J. The role of environmental factors in the pathogenesis of non-organ-specific autoimmune diseases. *Best practice & research Clinical rheumatology*. 2012;26(1):5-11.
8. Miyaji EN, Carvalho E, Oliveira ML, Raw I, Ho PL. Trends in adjuvant development for vaccines: DAMPs and PAMPs as potential new adjuvants. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]*. 2011;44(6):500-13.
9. Sayers S, Ulysse G, Xiang Z, He Y. Vaxjo: a web-based vaccine adjuvant database and its application for analysis of vaccine adjuvants and their uses in vaccine development. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2012;2012:831486.
10. Duthie MS, Windish HP, Fox CB, Reed SG. Use of defined TLR ligands as adjuvants within human vaccines. *Immunological reviews*. 2011;239(1):178-96.
11. Marrack P, McKee AS, Munks MW. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nature reviews Immunology*. 2009;9(4):287-93.
12. Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature*. 2008;453(7198):1122-6.
13. Exley C, Siesjo P, Eriksson H. The immunobiology of aluminium adjuvants: how do they really work? *Trends in immunology*. 2010;31(3):103-9.
14. Kool M, Soullie T, van Nimwegen M, Willart MA, Muskens F, Jung S, et al. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*. 2008;205(4):869-82.

15. Molina V, Shoenfeld Y. Infection, vaccines and other environmental triggers of autoimmunity. *Autoimmunity*. 2005;38(3):235-45.
16. Cervera R. 'ASIA': a new systemic autoimmune syndrome? *Lupus*. 2011;20(7):665-6.
17. Lerner A. Aluminum as an adjuvant in Crohn's disease induction. *Lupus*. 2012;21(2):231-8.
18. Kuroda Y, Nacionales DC, Akaogi J, Reeves WH, Satoh M. Autoimmunity induced by adjuvant hydrocarbon oil components of vaccine. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2004;58(5):325-37.
19. Bassi N, Luisetto R, Del Prete D, Ghirardello A, Ceol M, Rizzo S, et al. Induction of the 'ASIA' syndrome in NZB/NZWF1 mice after injection of complete Freund's adjuvant (CFA). *Lupus*. 2012;21(2):203-9.
20. Reeves WH, Lee PY, Weinstein JS, Satoh M, Lu L. Induction of autoimmunity by pristane and other naturally occurring hydrocarbons. *Trends in immunology*. 2009;30(9):455-64.
21. Hogenesch H, Azcona-Olivera J, Scott-Moncrieff C, Snyder PW, Glickman LT. Vaccine-induced autoimmunity in the dog. *Advances in veterinary medicine*. 1999;41:733-47.
22. Kuroda Y, Akaogi J, Nacionales DC, Wasdo SC, Szabo NJ, Reeves WH, et al. Distinctive patterns of autoimmune response induced by different types of mineral oil. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2004;78(2):222-8.
23. Koppang EO, Bjerkas I, Haugarvoll E, Chan EK, Szabo NJ, Ono N, et al. Vaccination-induced systemic autoimmunity in farmed Atlantic salmon. *Journal of immunology*. 2008;181(7):4807-14.
24. Whitehouse M. Oily adjuvants and autoimmunity: now time for reconsideration? *Lupus*. 2012;21(2):217-22.
25. Vera-Lastra O, Medina G, Cruz-Dominguez Mdel P, Ramirez P, Gayosso-Rivera JA, Anduaga-Dominguez H, et al. Human adjuvant disease induced by foreign substances: a new model of ASIA (Shoenfeld's syndrome). *Lupus*. 2012;21(2):128-35.
26. Tomljenovic L, Shaw CA. Mechanisms of aluminum adjuvant toxicity and autoimmunity in pediatric populations. *Lupus*. 2012;21(2):223-30.
27. Rose NR. Autoimmunity, infection and adjuvants. *Lupus*. 2010;19(4):354-8.
28. Bach JF. Infections and autoimmune diseases. *Journal of autoimmunity*. 2005;25 Suppl:74-80.
29. Munz C, Lunemann JD, Getts MT, Miller SD. Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity? *Nature reviews Immunology*. 2009;9(4):246-58.
30. Shoenfeld Y. Infections, vaccines and autoimmunity. *Lupus*. 2009;18(13):1127-8.

31. Rose NR. The adjuvant effect in infection and autoimmunity. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2008;34(3):279-82.
32. Vista ES, Crowe SR, Thompson LF, Air GM, Robertson JM, Guthridge JM, et al. Influenza vaccination can induce new-onset anticardiolipins but not beta2-glycoprotein-I antibodies among patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2012;21(2):168-74.
33. Perdan-Pirkmajer K, Thallinger GG, Snoj N, Cucnik S, Zigon P, Kveder T, et al. Autoimmune response following influenza vaccination in patients with autoimmune inflammatory rheumatic disease. *Lupus*. 2012;21(2):175-83.
34. Agmon-Levin N, Paz Z, Israeli E, Shoenfeld Y. Vaccines and autoimmunity. *Nature reviews Rheumatology*. 2009;5(11):648-52.
35. Agmon-Levin N, Hughes GR, Shoenfeld Y. The spectrum of ASIA: 'Autoimmune (Auto-inflammatory) Syndrome induced by Adjuvants'. *Lupus*. 2012;21(2):118-20.
36. Evans D, Cauchemez S, Hayden FG. "Prepandemic" immunization for novel influenza viruses, "swine flu" vaccine, Guillain-Barre syndrome, and the detection of rare severe adverse events. *The Journal of infectious diseases*. 2009;200(3):321-8.
37. Lasky T, Terracciano GJ, Magder L, Koski CL, Ballesteros M, Nash D, et al. The Guillain-Barre syndrome and the 1992-1993 and 1993-1994 influenza vaccines. *The New England journal of medicine*. 1998;339(25):1797-802.
38. Soldevilla HF, Briones SF, Navarra SV. Systemic lupus erythematosus following HPV immunization or infection? *Lupus*. 2012;21(2):158-61.
39. Slade BA, Leidel L, Vellozzi C, Woo EJ, Hua W, Sutherland A, et al. Postlicensure safety surveillance for quadrivalent human papillomavirus recombinant vaccine. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2009;302(7):750-7.
40. Agmon-Levin N, Zafrir Y, Paz Z, Shilton T, Zandman-Goddard G, Shoenfeld Y. Ten cases of systemic lupus erythematosus related to hepatitis B vaccine. *Lupus*. 2009;18(13):1192-7.
41. Santoro D, Stella M, Montalto G, Castellino S. Lupus nephritis after hepatitis B vaccination: an uncommon complication. *Clinical nephrology*. 2007;67(1):61-3.
42. Geier DA, Geier MR. A meta-analysis epidemiological assessment of neurodevelopmental disorders following vaccines administered from 1994 through 2000 in the United States. *Neuro endocrinology letters*. 2006;27(4):401-13.
43. Zafrir Y, Agmon-Levin N, Paz Z, Shilton T, Shoenfeld Y. Autoimmunity following hepatitis B vaccine as part of the spectrum of 'Autoimmune (Auto-inflammatory) Syndrome induced by Adjuvants' (ASIA): analysis of 93 cases. *Lupus*. 2012;21(2):146-52.
44. Soriano A, Verrecchia E, Marinaro A, Giovinale M, Fonnesu C, Landolfi R, et al. Giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica after influenza vaccination: report of 10 cases and review of the literature. *Lupus*. 2012;21(2):153-7.

45. van Assen S, Elkayam O, Agmon-Levin N, Cervera R, Doran MF, Dougados M, et al. Vaccination in adult patients with auto-immune inflammatory rheumatic diseases: a systematic literature review for the European League Against Rheumatism evidence-based recommendations for vaccination in adult patients with auto-immune inflammatory rheumatic diseases. *Autoimmunity reviews*. 2011;10(6):341-52.
46. van Assen S, Agmon-Levin N, Elkayam O, Cervera R, Doran MF, Dougados M, et al. EULAR recommendations for vaccination in adult patients with autoimmune inflammatory rheumatic diseases. *Annals of the rheumatic diseases*. 2011;70(3):414-22.
47. Mok CC, Ho LY, Fong LS, To CH. Immunogenicity and safety of a quadrivalent human papillomavirus vaccine in patients with systemic lupus erythematosus: a case-control study. *Annals of the rheumatic diseases*. 2013;72(5):659-64.
48. Verstraeten T, Descamps D, David MP, Zahaf T, Hardt K, Izurieta P, et al. Analysis of adverse events of potential autoimmune aetiology in a large integrated safety database of AS04 adjuvanted vaccines. *Vaccine*. 2008;26(51):6630-8.
49. Chao C, Klein NP, Velicer CM, Sy LS, Slezak JM, Takhar H, et al. Surveillance of autoimmune conditions following routine use of quadrivalent human papillomavirus vaccine. *Journal of internal medicine*. 2012;271(2):193-203.
50. Zhou W, Pool V, Iskander JK, English-Bullard R, Ball R, Wise RP, et al. Surveillance for safety after immunization: Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS)--United States, 1991-2001. *Morbidity and mortality weekly report Surveillance summaries*. 2003;52(1):1-24.
51. Bardage C, Persson I, Ortqvist A, Bergman U, Ludvigsson JF, Granath F. Neurological and autoimmune disorders after vaccination against pandemic influenza A (H1N1) with a monovalent adjuvanted vaccine: population based cohort study in Stockholm, Sweden. *Bmj*. 2011;343:d5956.
52. Carvalho JF, Barros SM. ASIA or Shoenfeld's syndrome: a novel autoimmune syndrome? *Revista brasileira de reumatologia*. 2010;50(5):487-8.
53. Shoenfeld Y. Video Q&A: what is ASIA? An interview with Yehuda Shoenfeld. *BMC medicine*. 2013;11(1):118.
54. Lidar M, Agmon-Levin N, Langevitz P, Shoenfeld Y. Silicone and scleroderma revisited. *Lupus*. 2012;21(2):121-7.
55. Speck-Hernandez CA, Montoya-Ortiz G. Silicon, a Possible Link between Environmental Exposure and Autoimmune Diseases: The Case of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis*. 2012;2012:604187.
56. Barker DE, Retsky MI, Schultz S. "Bleeding" of silicone from bag-gel breast implants, and its clinical relation to fibrous capsule reaction. *Plastic and reconstructive surgery*. 1978;61(6):836-41.

57. Varga J, Schumacher HR, Jimenez SA. Systemic sclerosis after augmentation mammoplasty with silicone implants. *Annals of internal medicine*. 1989;111(5):377-83.
58. Nancy AL, Shoenfeld Y. Chronic fatigue syndrome with autoantibodies--the result of an augmented adjuvant effect of hepatitis-B vaccine and silicone implant. *Autoimmunity reviews*. 2008;8(1):52-5.
59. Bar-Meir E, Ehrenfeld M, Shoenfeld Y. Silicone gel breast implants and connective tissue disease--a comprehensive review. *Autoimmunity*. 2003;36(4):193-7.
60. Shen GQ, Ojo-Amaize EA, Agopian MS, Peter JB. Silicate antibodies in women with silicone breast implants: development of an assay for detection of humoral immunity. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 1996;3(2):162-6.
61. Kossovsky N, Gornbein JA, Zeidler M, Stassi J, Chun G, Papasian N, et al. Self-reported signs and symptoms in breast implant patients with novel antibodies to silicone surface associated antigens [anti-SSAA(x)]. *Journal of applied biomaterials : an official journal of the Society for Biomaterials*. 1995;6(3):153-60.
62. Zandman-Goddard G, Blank M, Ehrenfeld M, Gilburd B, Peter J, Shoenfeld Y. A comparison of autoantibody production in asymptomatic and symptomatic women with silicone breast implants. *The Journal of rheumatology*. 1999;26(1):73-7.
63. Ortega-Hernandez OD, Shoenfeld Y. Infection, vaccination, and autoantibodies in chronic fatigue syndrome, cause or coincidence? *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2009;1173:600-9.
64. Levy Y, Rotman-Pikielny P, Ehrenfeld M, Shoenfeld Y. Silicone breast implantation-induced scleroderma: description of four patients and a critical review of the literature. *Lupus*. 2009;18(13):1226-32.
65. Caldeira M, Ferreira AC. Siliconosis: autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA). *The Israel Medical Association journal : IMAJ*. 2012;14(2):137-8.
66. Jara LJ, Medina G, Gomez-Banuelos E, Saavedra MA, Vera-Lastra O. Still's disease, lupus-like syndrome, and silicone breast implants. A case of 'ASIA' (Shoenfeld's syndrome). *Lupus*. 2012;21(2):140-5.
67. Kivity S, Katz M, Langevitz P, Eshed I, Olchovski D, Barzilai A. Autoimmune syndrome induced by adjuvants (ASIA) in the Middle East: morphea following silicone implantation. *Lupus*. 2012;21(2):136-9.
68. Magadur-Joly G, Billaud E, Barrier JH, Pennec YL, Masson C, Renou P, et al. Epidemiology of adult Still's disease: estimate of the incidence by a retrospective study in west France. *Annals of the rheumatic diseases*. 1995;54(7):587-90.
69. Katayama I, Umeda T, Nishioka K. Adult Still's-disease-like illness in a patient with silicone breast implants. *Clinical rheumatology*. 1998;17(1):81-2.

70. Cretel E, Richard MA, Jean R, Durand JM. Still's-like disease, breast prosthesis, and collagen implants. *Rheumatology international*. 2001;20(3):129-31.
71. Montalto M, Vastola M, Santoro L, La Regina M, Curigliano V, Manna R, et al. Systemic inflammatory diseases and silicone breast prostheses: report of a case of adult still disease and review of the literature. *The American journal of the medical sciences*. 2004;327(2):102-4.
72. Blasiak A, Blachowicz A, Gietka A, Rell-Bakalarska M, Franek E. Still's disease in patient with silicone breast implants: case report. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*. 2008;118(1-2):65-7.
73. Hennekens CH, Lee IM, Cook NR, Hebert PR, Karlson EW, LaMotte F, et al. Self-reported breast implants and connective-tissue diseases in female health professionals. A retrospective cohort study. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1996;275(8):616-21.
74. Janowsky EC, Kupper LL, Hulka BS. Meta-analyses of the relation between silicone breast implants and the risk of connective-tissue diseases. *The New England journal of medicine*. 2000;342(11):781-90.
75. Vasey FB, Zarabadi SA, Seleznick M, Ricca L. Where there's smoke there's fire: the silicone breast implant controversy continues to flicker: a new disease that needs to be defined. *The Journal of rheumatology*. 2003;30(10):2092-4.
76. Fryzek JP, Signorello LB, Hakelius L, Feltelius N, Ringberg A, Blot WJ, et al. Self-reported symptoms among women after cosmetic breast implant and breast reduction surgery. *Plastic and reconstructive surgery*. 2001;107(1):206-13.
77. Brown SL, Pennello G, Berg WA, Soo MS, Middleton MS. Silicone gel breast implant rupture, extracapsular silicone, and health status in a population of women. *The Journal of rheumatology*. 2001;28(5):996-1003.
78. Vasey FB, Aziz N, Seleznick MJ, Wells AF, Valeriano J. Silicone gel implant explantation. *Plastic and reconstructive surgery*. 1995;96(7):1748-9.
79. Gutierrez FJ, Espinoza LR. Progressive systemic sclerosis complicated by severe hypertension: reversal after silicone implant removal. *The American journal of medicine*. 1990;89(3):390-2.
80. Thomas WO, 3rd, Harper LL, Wong SW, Michalski JP, Harris CN, Moore JT, et al. Explantation of silicone breast implants. *The American surgeon*. 1997;63(5):421-9.
81. Spiera H, Kerr LD. Scleroderma following silicone implantation: a cumulative experience of 11 cases. *The Journal of rheumatology*. 1993;20(6):958-61.
82. Meier LG, Barthel HR, Seidl C. Development of polyarthritis after insertion of silicone breast implants followed by remission after implant removal in 2 HLA-identical

- sisters bearing rheumatoid arthritis susceptibility genes. *The Journal of rheumatology*. 1997;24(9):1838-41.
83. Israeli E. Gulf War syndrome as a part of the autoimmune (autoinflammatory) syndrome induced by adjuvant (ASIA). *Lupus*. 2012;21(2):190-4.
84. Peakman M, Skowera A, Hotopf M. Immunological dysfunction, vaccination and Gulf War illness. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2006;361(1468):681-7.
85. Asa PB, Cao Y, Garry RF. Antibodies to squalene in Gulf War syndrome. *Experimental and molecular pathology*. 2000;68(1):55-64.
86. Gherardi RK, Coquet M, Cherin P, Authier FJ, Laforet P, Belec L, et al. Macrophagic myofasciitis: an emerging entity. *Groupe d'Etudes et Recherche sur les Maladies Musculaires Acquisées et Dysimmunitaires (GERMMAD) de l'Association Française contre les Myopathies (AFM)*. *Lancet*. 1998;352(9125):347-52.
87. Gherardi RK, Coquet M, Cherin P, Belec L, Moretto P, Dreyfus PA, et al. Macrophagic myofasciitis lesions assess long-term persistence of vaccine-derived aluminium hydroxide in muscle. *Brain : a journal of neurology*. 2001;124(Pt 9):1821-31.
88. Gherardi RK, Authier FJ. Macrophagic myofasciitis: characterization and pathophysiology. *Lupus*. 2012;21(2):184-9.
89. Polido Pereira J, Barroso C, Evangelista T, Fonseca JE, Pereira da Silva JA. Macrophagic myofasciitis: a case report of autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA). *Ata reumatologica portuguesa*. 2011;36(1):75-6.
90. Exley C, Swarbrick L, Gherardi RK, Authier FJ. A role for the body burden of aluminium in vaccine-associated macrophagic myofasciitis and chronic fatigue syndrome. *Medical hypotheses*. 2009;72(2):135-9.
91. Rivas E, Gomez-Arnaiz M, Ricoy JR, Mateos F, Simon R, Garcia-Penas JJ, et al. Macrophagic myofasciitis in childhood: a controversial entity. *Pediatric neurology*. 2005;33(5):350-6.
92. Orbach H, Tanay A. Vaccines as a trigger for myopathies. *Lupus*. 2009;18(13):1213-6.
93. Cherin P, Authier FJ, Gherardi RK, Romero N, Laforet P, Eymard B, et al. Gallium-67 scintigraphy in macrophagic myofasciitis. *Arthritis and rheumatism*. 2000;43(7):1520-6.
94. Israeli E, Pardo A. The sick building syndrome as a part of the autoimmune (auto-inflammatory) syndrome induced by adjuvants. *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association*. 2011;21(3):235-9.
95. Rosenblum H, Shoenfeld Y, Amital H. The common immunogenic etiology of chronic fatigue syndrome: from infections to vaccines via adjuvants to the ASIA syndrome. *Infectious disease clinics of North America*. 2011;25(4):851-63.

96. Ablin JN, Shoenfeld Y, Buskila D. Fibromyalgia, infection and vaccination: two more parts in the etiological puzzle. *Journal of autoimmunity*. 2006;27(3):145-52.
97. Blank M, Israeli E, Shoenfeld Y. When APS (Hughes syndrome) met the autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA). *Lupus*. 2012;21(7):711-4.
98. Dimitrijevic L, Zivkovic I, Stojanovic M, Petrusic V, Zivancevic-Simonovic S. Vaccine model of antiphospholipid syndrome induced by tetanus vaccine. *Lupus*. 2012;21(2):195-202.
99. Katzav A, Kivity S, Blank M, Shoenfeld Y, Chapman J. Adjuvant immunization induces high levels of pathogenic antiphospholipid antibodies in genetically prone mice: another facet of the ASIA syndrome. *Lupus*. 2012;21(2):210-6.
100. Alijotas-Reig J, Garcia-Gimenez V, Llurba E, Vilardell-Tarres M. Autoimmune/inflammatory syndrome (ASIA) induced by biomaterials injection other than silicone medical grade. *Lupus*. 2012;21(12):1326-34.
101. Fischer D, Reimann J, Schroder R. [Macrophagic myofasciitis: inflammatory, vaccination-associated muscular disease]. *Deutsche medizinische Wochenschrift*. 2003;128(44):2305-8.