



SILMARA APARECIDA DE LIMA MONTALVÃO

“AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM
PACIENTES PORTADORES DE HEMOFILIA A”

“Humoral immune response in hemophilia A”

Campinas
2014



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

SILMARA APARECIDA DE LIMA MONTALVÃO

**“AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM
PACIENTES PORTADORES DE HEMOFILIA A”**

“Humoral immune response in hemophilia A”

Orientador: Prof. Dra. Margareth Castro Ozelo

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção de título de Mestre em Ciências na área Clínica Médica

Master Dissertation submitted to the Clinical Medicine Graduate Program of the Faculty of Medical Sciences of the State University of Campinas to obtain the title of Master of Science grade in Clinical Medical

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA SILMARA APARECIDA DE LIMA MONTALVAO ORIENTADA PELA PROF. Dra. MARGARETH DE CASTRO OZELO

Assinatura do Orientador

Campinas
2014

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

M761 Montalvão, Silmara, 1982-
Avaliação da resposta imune humoral em pacientes portadores de hemofilia A
/ Silmara Aparecida de Lima Montalvão. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Margareth Castro Ozelo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Ciências Médicas.

1. Hemofilia. 2. Imunoglobulina. 3. Inibidor. I. Ozelo, Margareth Castro. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Humoral immune response in hemophilia A

Palavras-chave em inglês:

Hemophilia

Imunoglobulin

Inhibitor

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Ciências na área Clínica Médica

Banca examinadora:

Margareth Castro Ozelo [Orientador]

Elbio Antônio D'Amico

Patrícia Maria Bergamo Favaro

Data de defesa: 29-01-2014

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

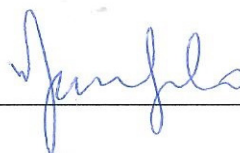
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

SILMARA APARECIDA DE LIMA MONTALVÃO

ORIENTADORA: PROF. DR. MARGARETH CASTRO OZELO

MEMBROS:

1. PROF. DR. MARGARETH CASTRO OZELO



2. PROF. DR. ELBIO ANTONIO D'AMICO



3. PROF. DR. PATRÍCIA MARIA BERGAMO FAVARO



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

Data: 29 de janeiro de 2014

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu esposo Cleyton Montalvão pelo apoio
incondicional nesta fase importante da nossa história

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela sabedoria e inspiração.

Ao meu marido, Cleyton Montalvão, pelo incentivo e compreensão.

À minha mãe Márcia Lima e ao meu pai Luiz Lima que me deu todo o suporte para alcançar meus objetivos.

Ao meu irmão Luiz Lima Junior e a minha cunhada Katiane Lima, pela amizade.

Aos funcionários, professores e alunos do laboratório de Hemostasia do Hemocentro da Unicamp, meus agradecimentos.

Aos funcionários e amigos do ambulatório de hemofilia por todos estes anos compartilhados. Em especial à enfermeira Andrea Sambo que em todos os momentos apoiou o desenvolvimento do trabalho, mesmo quando não havia tempo ou espaço suficiente. Ao Dr. Samuel Medina que não mediu esforços para auxiliar na revisão deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

E principalmente à minha orientadora, Prof^a Dra. Margareth Castro Ozelo, toda a minha gratidão. Muito obrigada pela confiança e pelas oportunidades oferecidas. Obrigada pela paciência e pelos sábios ensinamentos durante todos estes anos.

RESUMO

Os principais problemas relacionados ao tratamento de pacientes portadores de hemofilia A estão relacionados ao uso terapêutico de fator VIII (FVIII), sendo estes o desenvolvimento de anticorpos neutralizantes anti-FVIII (inibidores), e o desenvolvimento de reações anafiláticas, que são eventos raros, no entanto potencialmente graves. As informações quanto aos isotipos de imunoglobulinas associados a estas duas situações clínicas ainda é limitado.

O objetivo deste trabalho foi avaliar as características da resposta imune humoral em pacientes com hemofilia A que apresentam inibidor e/ou em condição de reação alérgica ao FVIII.

Para estas análises três metodologias foram aplicadas, (1) determinação de anticorpos inibitórios por método de Bethesda-Nijmegen, (2) determinação do isotipo de imunoglobulinas envolvidas subclasses da IgG, IgM e IgE anti-FVIII, por método de ELISA e (3) determinação de citocinas por método multiplex BD™ CBA® (*cytometric bead array*).

Esse trabalho foi dividido em três estudos. No primeiro estudo, foram analisadas amostras de 25 pacientes brasileiros com hemofilia A, sendo 44% destes afrodescendentes. Todos os pacientes receberam exclusivamente terapia de reposição com concentrado de FVIII derivado de plasma (pdFVIII) e produtos bypass após o desenvolvimento de inibidor. Cinco pacientes deste grupo foram acompanhados por uma análise longitudinal no período de até quatro anos. No segundo estudo, 4 pacientes com hemofilia A com inibidor foram avaliados no período em que foram tratados através do protocolo de indução de imunotolerância (ITI) para erradicação do inibidor, também em análise longitudinal. O terceiro consistiu da avaliação de incidência de reação alérgica em pacientes com hemofilia A. Três de 322 pacientes (0,9%) apresentaram reação alérgica após a exposição exclusivamente para pdFVIII durante os últimos quinze anos em nosso centro.

Os resultados evidenciaram que a subclasse IgG4 é a principal na modulação em presença de anticorpos inibitórios, enquanto a IgG1 na maior parte das análises estava presente junto a baixos títulos de inibidor. Durante o tratamento de ITI os níveis das interleucinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-6 acompanharam o decaimento

dos títulos de inibidor e IgG4 nos pacientes que obtiveram sucesso ao tratamento. Além disso, no decorrer do protocolo observou-se uma resposta polarizada para o tipo Th1 como padrão de resposta na conquista da tolerância completa ao FVIII. No contexto da reação alérgica, apenas um dos três pacientes apresentou reatividade da IgE que foi exclusiva ao pdFVIII, sendo negativa no ensaio do IgE anti-rFVIII (anti-fator VIII recombinante), demonstrando que a reatividade não foi específica ao FVIII.

O entendimento da resposta imune humoral em pacientes com hemofilia A, incluindo a participação da IgG4 e IgG1 no mecanismos envolvendo a presença e erradicação dos inibidores e da IgE na reação alérgica, possibilita ampliar conceitos estabelecidos dos mecanismos envolvidos nessas duas situações. Isso poderá auxiliar no desenvolvimento de novos produtos menos imunogênicos e de novas estratégias para a indução de tolerância ao FVIII, que tenham maior eficácia e melhor custo benefício.

ABSTRACT

The main problems related to the treatment of hemophilia A patients are linked to the use of therapeutic factor VIII (FVIII). First, the development of neutralizing antibodies against FVIII (inhibitors), and second development of anaphylactic reactions, which are rare, however potentially severe. The knowledge about the immunoglobulin isotypes associated with these two clinical situations is still limited. The aim of this project was to evaluate the characteristics of the humoral immune response in patients with hemophilia A who have inhibitors and/or allergic reaction to FVIII.

For these analyses three methods were used (1) inhibitory anti-FVIII antibodies assay by Bethesda-Nijmegen (2) immunoglobulins isotype ELISA assay for anti-FVIII IgG subclasses, IgM and IgE and (3) cytokines assay by BDTM Cytometric bead array (BD CBA[®]) multiplex method.

This project was divided in three studies. In the first study, we analyzed samples from 25 Brazilian hemophilia A patients with 44% African-descents. All patients received exclusively replacement therapy with plasma-derived (pdFVIII) concentrates, and bypassing agents after the development of inhibitors. Five patients from this group were followed for a longitudinal analysis in a period up to three years. In the second study, 4 hemophilia A patients with inhibitor were evaluated also in longitudinal analyses, during the induction of immunotolerance (ITI) treatment for the eradication of the inhibitor. The third study included the evaluation of the incidence of allergic reaction among hemophilia A patients. Three out of 322 patients (0.9%) had allergic reaction after exclusively exposure to pdFVIII during the last fifteen years in our center.

The results of these studies demonstrated that IgG4 subclass is the main immunoglobulin involved in the modulation of the inhibitory antibodies, while IgG1 is associated with low-titer inhibitors. During the ITI protocol, the anti-inflammatory interleukins, IL-4 and IL-6 decreased following the IgG4 reduction among the patients that achieved success in the ITI treatment. In addition, during the ITI protocol it was observed a polarized Th1 immune response after the complete success achievement. In the context of allergic reaction, only one out of three patients presented IgE reactivity that was exclusively to pdFVIII, and the assay IgE

anti-rFVIII (anti-recombinant FVIII) was negative, confirming that the reativity was not specific to FVIII.

The understanding of the humoral immune response in hemophilia A patients, including the role of IgG4 and IgG1 in the mechanisms involving the presence and eradication of inhibitors, and the participation of IgE in allergic reaction, allows to better understand the established concepts of the mechanisms involved in these two situations. This may help the development of less immunogenic new products and new strategies for induction of tolerance to FVIII, with higher efficiency and best value.

LISTA DE ABREVIATURA

AID	deaminase citidina induzida por ativação
célula Th1	célula T helper 1 (auxiliar 1)
célula Th2	célula T helper 2 (auxiliar 2)
célula T _{FH}	célula T auxiliares folicular
CRM	<i>Cross reaction Material</i> (material de reação cruzada)
CXR5	receptor de quimiocina 5
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FAP	fator de ativação plaquetária
Fab	porção da imunoglobulina que se liga ao antígeno (porção variável)
Fc	porção cristalizável da imunoglobulina (porção constante)
FcγRIIB	receptor II nas células B para a porção Fc das imunoglobulinas
FDC	célula dendrítica folicular (<i>Follicular Dendritic Cell</i>)
FIX	fator IX
FIX:C	atividade coagulante do fator IX
FVIII	fator VIII
FVIII:C	atividade coagulante do fator VIII
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (enzima de conjugação para anticorpo secundário utilizado no método de ELISA)
ICOS	co-estimulador das células T induzível (<i>Inducible T-cell COStimulator</i> - CD278)
Ig	imunoglobulina
IL-	Interleucina
INF-γ	interferon gama

ITI	indução de imunotolerância
KO	knockout
MHC-II	Molécula de Histocompatibilidade Classe II
PE	fluorocromo ficoeritrina
pdFVIII	fator VIII derivado de plasma
rFVIII	fator VIII recombinante
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	receptores de células T
Th1	resposta imune de célula T <i>helper</i> 1
Th2	resposta imune de célula T <i>helper</i> 2
TNF- α	fator de necrose tumoral beta e alfa
TNF- β	fator de necrose tumoral beta
Treg	células T reguladoras
UB	unidade Bethesda

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Funções dos isotipos de anticorpos	62
Tabela 2. Métodos utilizados de acordo com o grupo de pacientes estudados	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de desenvolvimento de inibidor a protefana FVIII	54
Figura 2. Diferenciação de Células B	56
Figura 3. Mudança de isotipo de Ig em células B no centro germinativo	57
Figura 4. Estrutura da IgG secretada	60
Figura 5. Esquema de divisão entre os grupos de pacientes com Hemofilia A participantes do estudo.	75
Figura 6. Cálculo da atividade residual do fator VIII x Unidades Betesda	79

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO	47
1.1 Hemofilia.....	49
1.2 Anticorpos inibitórios ao FVIII	50
1.3 Mecanismo de desenvolvimento de anticorpos inibitórios ao FVIII.....	52
1.3.1 Resposta imune primária a proteína FVIII.....	53
1.3.2 Resposta imune secundária à proteína FVIII	55
1.3.3 Ativação de célula B e produção de anticorpos	55
1.3.4 Estrutura e características dos anticorpos	59
1.3.5 Isotipos de anticorpos associados à hemofilia A.....	62
1.4 Protocolos de indução de imunotolerância ao FVIII.....	63
1.5 Reações de Hipersensibilidade na hemofilia A.....	64
1.6 Perspectivas dos inibidores e reação alérgica na Hemofilia	66
2-OBJETIVOS	69
3-MATERIAIS E MÉTODO.....	73
3.1 Cauística.....	75
3.2 Metodologia	76
3.2.1 Tratamento com calor das amostras de plasma	77
3.2.2 Determinação de anticorpos inibitórios: Método Bethesda/Nijmegen ...	78
3.2.3 Determinação das imunoglobulinas	80
3.2.4 Determinação das citocinas pró e anti-inflamatório-regulatórias.....	81
4-RESULTADOS.....	83
4.1 Capítulo I: <i>A longitudinal evaluation of anti-FVIII antibodies demonstrated IgG4 subclass is mainly correlated with high-titer inhibitor in hemophilia A patients</i>	89
4.2 Capítulo II: <i>IL4 and IL6 decrease whereas IgG4 shift to IgG1 during immune tolerance induction in patients with hemophilia A</i>	109

4.3 Capítulo III: <i>Allergic reaction in a cohort of hemophilia A patients using plasma-derived factor VIII concentrate is rare and not necessarily triggered by factor VIII</i>	127
5-DISCUSSÃO GERAL	141
6-CONCLUSÃO GERAL	151
7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	155
8-ANEXOS	165
8.1 Documentos do parecer positivo do comitê de ética local para o desenvolvimento dos trabalhos	167
8.2 Trabalhos premiados e apresentados em congresso nacional e internacional relacionados a tese.....	171

1. Introdução

1.1 Hemofilia

A hemofilia é uma doença hemorrágica hereditária ligada ao cromossomo X caracterizada pela deficiência ou anormalidade da atividade coagulante dos fatores VIII (hemofilia A) ou IX (hemofilia B). A hemofilia A é mais frequente e representa cerca de 80% dos casos. A doença afeta quase que exclusivamente indivíduos do sexo masculino, enquanto que as mulheres portadoras são habitualmente assintomáticas. A apresentação clínica é semelhante para as duas deficiências e depende diretamente da atividade coagulante residual do fator, sendo caracterizadas por sangramentos intra-articulares (hematroses), hemorragias musculares ou em outros tecidos ou cavidades [1].

Pacientes com atividade coagulante do fator VIII (FVIII) inferior a 1% do normal são classificados como grave apresentando sangramentos espontâneos, pacientes com 1% a 5% são classificados como moderados, que também podem apresentar sangramentos espontâneos, porém com menor frequência que os graves. Pacientes com atividade coagulante entre 5% a 40% são classificados como leve e normalmente apresentam sangramento somente após traumas e/ou procedimentos invasivos/cirúrgicos.

O tratamento das hemofilias é baseado na reposição do fator deficiente em resposta aos episódios hemorrágicos ou para preveni-los. Atualmente esta reposição pode ser feita de maneira segura, sem o risco de contaminação por infecções transmitidas por transfusões sanguíneas, com o uso de produtos recombinantes (rFVIII) ou derivados de plasma, hemoderivados (pdFVIII). No entanto, existem complicações da hemofilia que estão relacionadas à reposição destes fatores deficientes.

Duas destas complicações com maior relevância clínica são: (1) o desenvolvimento de anticorpos inibitórios da função coagulante destes fatores (chamados inibidores) e (2) o desenvolvimento de reação alérgica durante a infusão destes produtos [2]. Estas duas complicações estão associadas à resposta imune humoral destes pacientes ao tipo de produto utilizado para reposição destes

fatores, e está caracterizado com o desenvolvimento de anticorpos nestas duas situações clínicas.

Na hemofilia há recentes estudos que demonstram que os anticorpos do tipo inibitórios podem estar associados a classes específicas de anticorpos produzidos contra a proteína do FVIII [3]. Além disso, em quadros de reação alérgica, embora seja uma condição clínica conhecida na hemofilia, pouca informação há sobre os anticorpos que estão envolvidos neste tipo de resposta. Neste trabalho, serão discutidos os aspectos da resposta imune humoral na hemofilia A, que apresenta maior prevalência de desenvolvimento de inibidores, e também diferentes aspectos de reação de hipersensibilidade ao fator plasmático deficiente quando comparado à Hemofilia B.

Estudos da resposta imune humoral na hemofilia A aos produtos terapêuticos são importantes para auxiliar o entendimento do mecanismo de resposta imune que o indivíduo pode apresentar ao FVIII e desta forma, fornecer informações que possam permitir estes indivíduos a conquistar a tolerância destes produtos com eficiência para o desenvolvimento de novos protocolos de tolerância e/ou novos produtos.

1.2 Anticorpos inibitórios ao FVIII

Os inibidores são aloanticorpos neutralizadores da atividade coagulante do FVIII desenvolvidos por pacientes com hemofilia A. O desenvolvimento de inibidores tem sido um assunto de destaque no meio acadêmico, devido sua gravidade e frequência. O risco acumulativo de inibidores varia de 20% a 30% entre os pacientes com hemofilia A e de 1% a 5% entre pacientes com hemofilia B. Quando consideramos a prevalência de inibidor entre todos os pacientes com hemofilia A é de 5% a 7%, e entre os hemofílicos A grave é de 12% a 13% [4]. Clinicamente, a presença desses anticorpos dificulta a indução da hemostasia terapêutica a partir da reposição dos concentrados de fator deficiente, levando a hemorragias mais graves, mais frequentes e de difícil controle. Esta é uma complicação grave, pois as alternativas de tratamento nessa situação, além de não serem capazes de garantir hemostasia eficiente, são de altíssimo custo.

A presença do inibidor é classicamente titulada através do método Bethesda e, por definição, uma unidade Bethesda (UB) corresponde à quantidade de anticorpos circulantes capazes de neutralizar 50% do FVIII existente em 1 ml de plasma normal [5]. Os inibidores podem ser classificados segundo o título de anticorpos circulantes e a resposta anamnestic. De acordo com recomendação do *International Society of Thromboses and Haemostasis_ISTH* deve-se considerar de baixa resposta (paciente baixo respondedor) os inibidores que mantêm níveis persistentemente <5 UB, apesar de constante estímulo com o fator deficiente. O termo inibidor de alta resposta (paciente alto respondedor) deve ser utilizado para aqueles casos em que a atividade inibitória seja > 5 UB, em qualquer momento da existência do inibidor.

Esta classificação é importante, pois determina a adoção de condutas diferentes no tratamento de hemorragias nos pacientes com inibidores. Em alguns casos, o uso de altas doses do concentrado de fator deficiente pode ser suficiente, mas, na maioria das vezes, é necessário o uso de produtos que possuem a capacidade de gerar trombina independente da via do FVIII (produtos bypass), como o concentrado de complexo protrombínico ativado (CPPa) e, o fator VII ativado (rFVIIa) [6]. O tratamento de indução de imunotolerância (ITI) é a única terapia atualmente disponível capaz de erradicar a presença do inibidor. Esse tratamento é baseado na administração frequente de altas doses de concentrado do fator deficiente associado ou não a medicamentos imunossupressores [7].

Diversos fatores de risco genéticos e ambientais podem contribuir para o desenvolvimento dos inibidores em pacientes com hemofilia. Um destes fatores já bem documentado é o tipo de mutação nos genes do FVIII. De fato, pacientes com mutações consideradas de alto risco para o desenvolvimento de inibidores apresentam 7 a 10 vezes maior risco de desenvolverem inibidor, quando comparados aos pacientes com mutações consideradas de baixo risco. As mutações consideradas de alto risco para o desenvolvimento de inibidores são as inversões do íntron 22 e do íntron 1, grandes deleções, mutações nonsense, pequenas inserções ou deleções fora de regiões com repetição de nucleotídeos A e mutações de ponto nos domínios A2, C1 e C2. As mutações com baixo risco de

desenvolvimento de inibidor são as do tipo *splice* alternativo, pequenas inserções ou deleções em regiões de repetições A e mutações de ponto nos demais domínios do FVIII [8].

Recentemente foi descrito que não apenas as mutações, mas a presença de determinados polimorfismos e os haplótipos relacionados no gene do fator VIII, podem estar relacionados ao maior risco de inibidor em negros norte-americanos [9]. No entanto, em nossa avaliação de 148 pacientes brasileiros com hemofilia A grave, embora a presença de inibidor fosse maior entre negros, isto não estava relacionada aos mesmos haplótipos descritos entre norte-americanos [10]. Outros fatores de risco para o desenvolvimento de inibidor descrito envolvem alguns polimorfismos como no gene da interleucina 10 (IL-10) [11], do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) [12], o número de exposições aos concentrados de fator, entre outras causas, algumas ainda em discussão [2, 11].

1.3. Mecanismo de desenvolvimento de anticorpos inibitórios ao FVIII

Entre os diversos fatores de risco genéticos e ambientais que podem influenciar a formação de inibidor, o genótipo do FVIII é o melhor preditor indicador deste tipo de complicação ao tratamento. A correlação entre a probabilidade de formação de inibidores do FVIII e genótipo do paciente com hemofilia A é provavelmente explicada pelo processo de tolerância central.

Ou seja, os pacientes portadores de hemofilia A que desenvolvem inibidores ao FVIII provavelmente são indivíduos que não possuem tolerância central ao FVIII, e possuem, assim, após a exposição ao FVIII, ativação mediada através de células apresentadoras de antígeno, como as células dendríticas e células T e a partir destas, a ligação com células B, que são ativadas ou programadas a uma resposta específica.

Não há nenhuma evidência clara que a tolerância central ao FVIII em seres humanos esteja afetada. Entretanto, os pacientes com hemofilia A que apresentam materiais de reação cruzada (*Cross reaction material_CRM*) negativo, têm um risco significativamente maior de desenvolvimento de inibidores do que pacientes com mutações missense, ou que apresentam CRM + [13].

Adicionalmente, injeção intratímica de FVIII em camundongos *knockout* (KO) para FVIII gera tolerância à imunização subsequente ao FVIII [14].

Apesar das evidências de que a tolerância central desempenha um papel predominante na tolerância ao FVIII, não se pode excluir a possibilidade de que a tolerância periférica também possa contribuir nesse mecanismo. De fato, pacientes com hemofilia que não apresentam inibidores, e os indivíduos normais, podem apresentar anticorpos não inibitórios anti-FVIII [15] e, portanto, é provável que possuam células T e B reativas ao FVIII.

1.3.1 Resposta imune primária a proteína FVIII

A resposta imune primária ao FVIII em seres humanos ocorre no baço e no fígado [16]. As células dendríticas reconhecem o antígeno (FVIII) que sofre endocitose e então é processada em peptídeos de 9-14 aminoácidos [17]. Estes péptidos de FVIII são então carregados no receptor da molécula de MHC - II das células dendríticas.

Quando as células dendríticas interagem com o FVIII in vivo, há a maturação destas células que expressam moléculas co-estimuladoras (CD80/86 e CD40) necessárias para a ativação de células T CD4 + [18, 19]. Após o contato das células dendríticas com o FVIII, elas provavelmente migram para o baço, uma região rica em célula T. Então as células T CD4 + que expressam receptores de células T (TCR) específicos para peptídeos de FVIII ligados a moléculas de MHC de classe II, estabelece o primeiro sinal com a coestimulação entre estas células através de da interação do CD40 com CD40L, e então um segundo sinal através dos receptores CD80/CD86 com CD28 é emitido.

A partir desta coestimulação, citocinas secretadas por células T CD4+ estabelece o terceiro sinal que induz a ativação de células T e a sua proliferação. Então após a ativação de células T estas se direcionam as regiões foliculares das células B no baço e concomitantemente as células provenientes da medula óssea internalizam o FVIII por endocitose e apresenta imunoglobulinas de membrana específicas ao FVIII. Neste momento há interação das células B via MHC-II junto aos receptores (TCR) das células T CD 4+ que irão para a região folicular, onde as

células B ativadas proliferam e diferenciam-se em células B de memória e plasmócitos (células B secretoras de anticorpos).

Os plasmócitos podem ser de vida curta ou, eles podem permanecer no baço ou na medula óssea como células de longa vida [20]. Células B de memória não secretam anticorpos ao FVIII. Estas células residem no baço ou na medula óssea, e rapidamente se diferenciam em células plasmáticas após a exposição subsequente ao FVIII.

A figura 1 esquematiza o processo de resposta imune primária e desenvolvimento de anticorpo anti-FVIII.

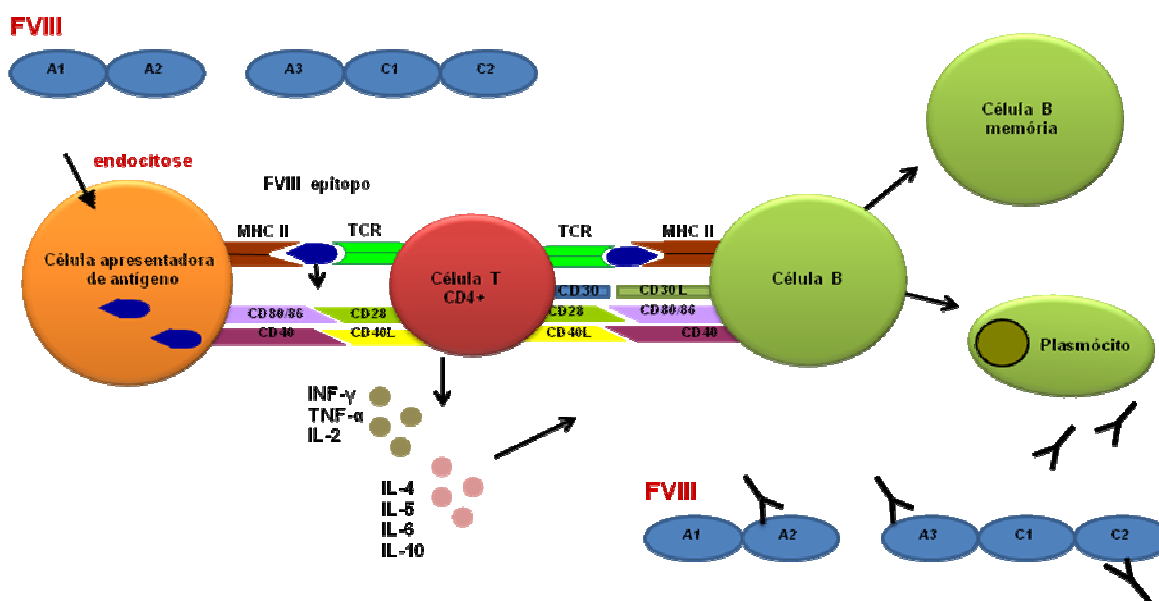


Figura 1. Mecanismo de desenvolvimento de inibidor a proteína FVIII. Mecanismo de ativação de células B mediadas por células T auxiliares para a produção de anticorpos. A proteína do Fator VIII é endocitada pelas células apresentadoras de antígenos (CAA_cor laranja), que processa em peptídeos e apresenta aos linfócitos TCD4⁺ via MHC de classe II. O reconhecimento do peptídeo pelas células T requer a interação dos receptores específicos das células T (TCR), e de sinais co-estimulatórios (CD40 e CD40 ligante), (CD80/86 e CD28). Em resposta ao antígeno, os linfócitos T ativados liberam citocinas, e expressam moléculas de superfície (CD30, CD28, CD40L) que interagem com as proteínas de superfície correspondentes (CD30 ligante, CD80/86, CD40) dos linfócitos B. Isso faz com que haja ativação e diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos produtores de anticorpos anti-FVIII e em células B de memória. Fonte: *Adaptado de: J. OLDENBURG and A. PAVLOVA, 2006.*

1.3.2 Resposta imune secundária à proteína FVIII

Como um resultado da expansão clonal inicial da resposta específica ao FVIII, os órgãos linfóides irão conter um número significativo de células T CD4+ e de células B de memória específicas. Estudos na hemofilia demonstraram que os plasmócitos específicos ao FVIII, na ausência de reexposição ao FVIII, podem sobreviver por muito tempo [21].

Do mesmo modo, as células B de memória, podem residir no baço ou na medula óssea, permanecendo em repouso durante muitos anos, e são rapidamente ativadas após reexposições ao FVIII. Uma vez que uma resposta imune adaptativa ao FVIII foi estabelecida, as células B de memória e plasmócitos específicos ao FVIII representam alvos terapêuticos muito importantes para a imunomodulação.

1.3.3 Ativação de célula B e produção de anticorpos

Conforme mencionado anteriormente, na resposta imune humoral, os linfócitos B são ativados pelo FVIII e secretam anticorpos específicos que agem para eliminá-lo, pois é reconhecido como um antígeno. De um modo geral, os antígenos proteicos e antígenos não proteicos podem estimular resposta de anticorpos. A resposta da célula B a antígenos proteicos necessitam da contribuição de célula T CD4 + auxiliares (células T helper _Th) específicas para o antígeno.

A resposta da célula B dependentes de célula T CD4+ auxiliar aos antígenos proteicos necessitam da ativação inicial de células T CD4+ virgens nas zonas linfóides dos órgãos linfóides. Os linfócitos ativados migram na direção dos outros e interagem nas bordas dos folículos, onde as células B apresentam antígenos às células T CD4+ auxiliares [22].

As células T auxiliares quando ativadas expressam CD40L, que se acoplam ao CD40 nas células B e então as células T secretam citocinas que se ligam aos receptores da célula B. A combinação de sinais deflagrados via CD40 e via citocina estimula a proliferação e diferenciação de células B. Então quando esta célula B é ativada em locais extrafoliculares por células T CD4+ auxiliares, leva a

formação de focos extrafoliares onde algumas mudanças de isótipo ocorrem e plasmócitos de vida curta são gerados [23].

Algumas células T auxiliares ativadas se diferenciam em células T_{FH} especializadas, que expressam altos níveis de ICOS (*Inducible T-cell COStimulator* - CD278) e CXCR5 (receptor de quimiocina 5) e secretam IL-21. Células T_{FH} ativam essas células B específicas para iniciarem a formação de centros germinativos (figura 2).

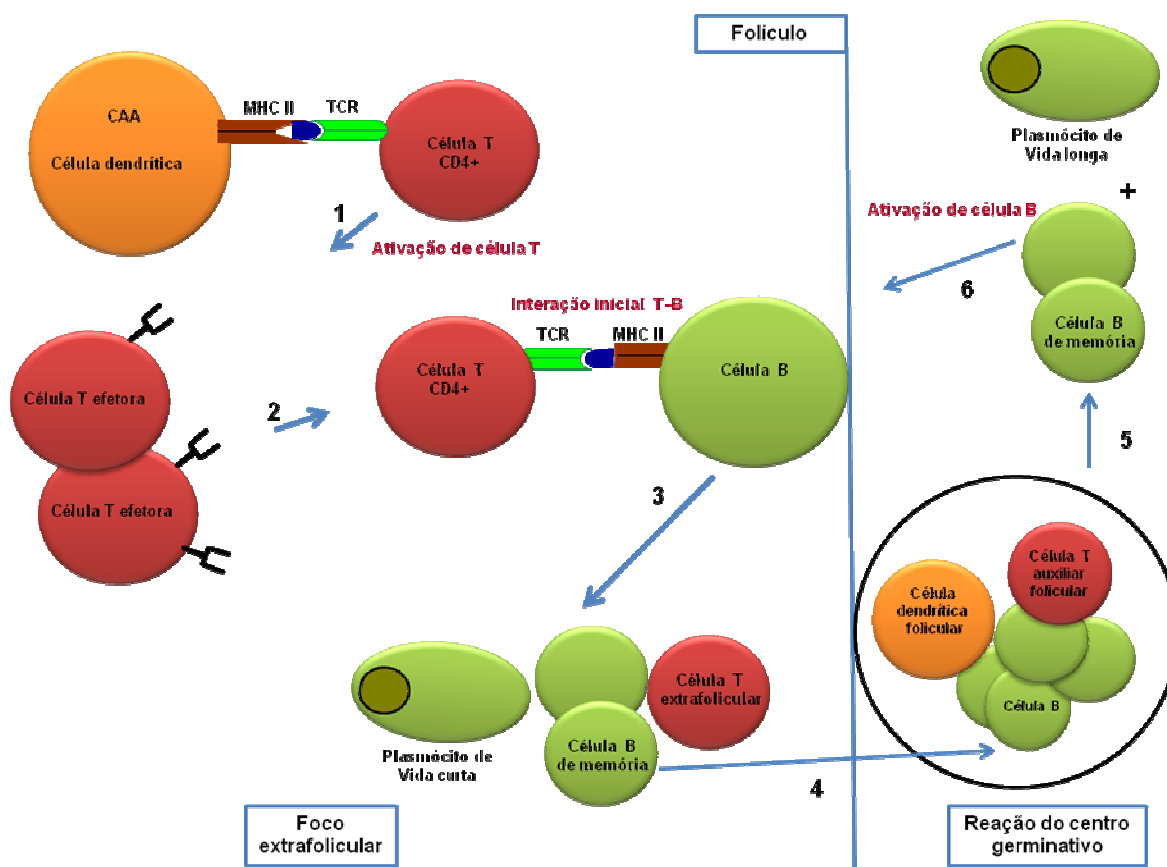


Figura 2. Diferenciação de células B. Sequencia de eventos na resposta imune humoral aos antígenos proteicos depende de célula T. As respostas imunes são iniciadas pelo reconhecimento de antígeno por células B e t auxiliares (1). Os linfócitos ativados migram em direção uns aos outros e interagem, resultando na proliferação e diferenciação de célula B (2). A reestimulação de célula B por célula T auxiliar em sítio extrafolicular leva a mudança de isótipo precoce e geração de plasmócitos de curta duração (3). Os últimos acontecimentos ocorrem nos centros germinativos (4) e incluem mutação somática e a seleção de células de alta afinidade (maturação de afinidade), mudança de isótipo, geração de célula B de memória e geração de plasmócito de longa vida (5). Quando reexporto ao mesmo antígeno ocorre então ativação de células com resposta especializada (6).

Os eventos tardios nas respostas de anticorpos dependentes da célula T CD4+, incluindo extensa mudança de isótipos, mutação somática, maturação da afinidade e geração de célula B de memória, além da indução de plasmócito de vida longa, ocorrem dentro dos centros germinativos (figura 3).

Sinais derivados de células T CD4+ auxiliar, incluindo CD40L e citocinas, induzem a mudança de isotipo nas células B por processo de recombinação de troca, levando a escolha de vários isotipos de imunoglobulinas [23].

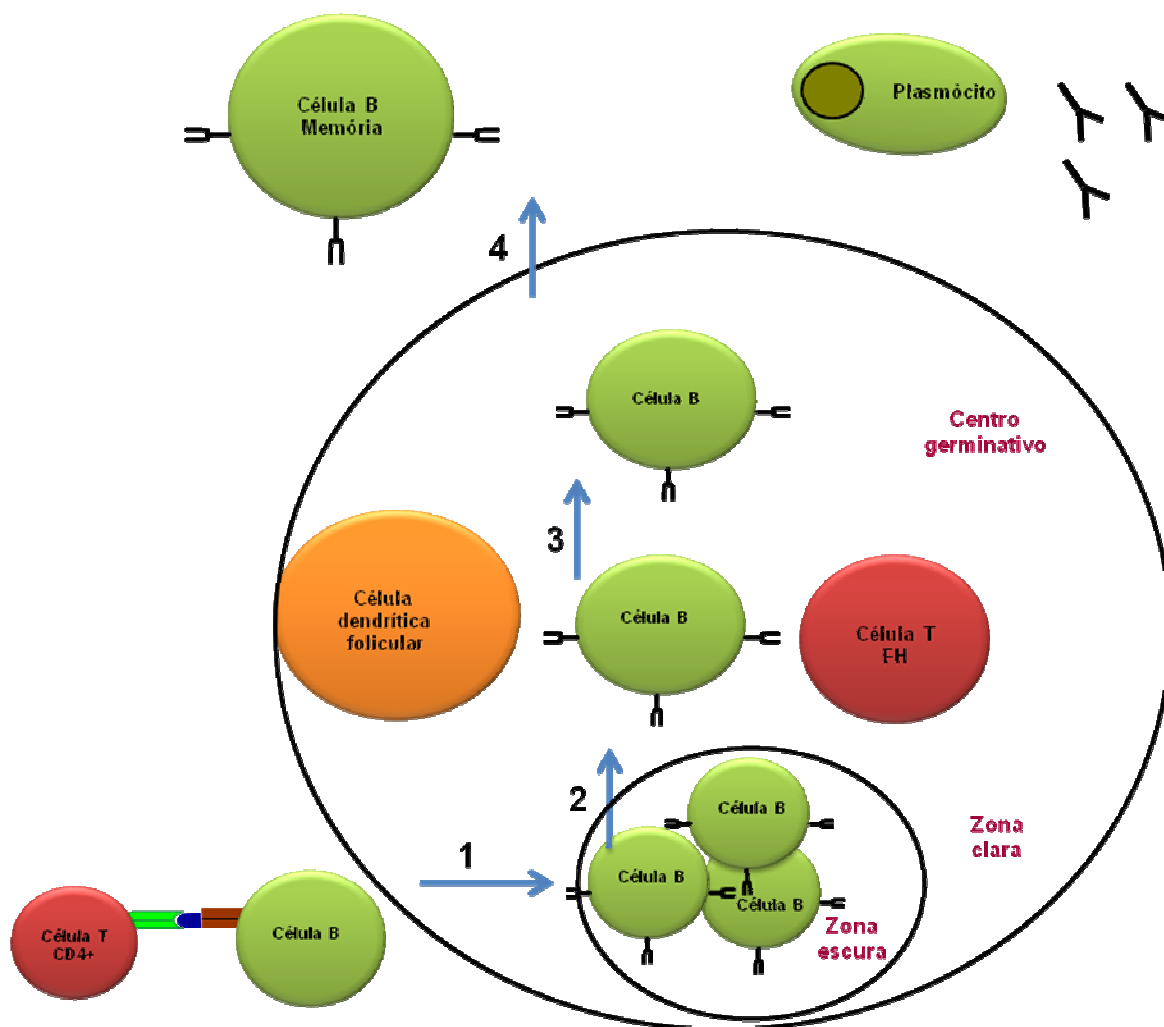


Figura 3. Mudança de isotipo de Ig em células B no centro germinativo. Ativação das células B e migração para o centro germinativo (1). Proliferação de célula B (2). Mutação somática, maturação de afinidade e mudança de isotipo (3). Saída de células B de memória e de células B secretoras de anticorpos de alta afinidade.

A mudança de isotipo das imunoglobulinas requer a indução de AID (deaminase citidina induzida por ativação), uma citidina desaminase que converte a citosina, em uracil no DNA unifilamentar, e diferentes citocinas permitem que a AID tenha acesso a diferentes *loci* de cadeia pesada. A maturação de afinidade ocorre em centros germinativos e leva ao aumento de afinidade de anticorpos durante o curso de uma resposta humoral de células B.

A maturação de afinidade é o resultado de mutação somática dos genes de cadeia leve e pesadas da imunoglobulina, induzida por AID, seguida da sobrevivência seletiva das células B, que produzem anticorpos de alta afinidade e se ligam a antígenos exibidos por células dendríticas foliculares (FDC) no centro germinativo.

As células T_{FH} também participam da seleção de célula B de alta afinidade. Uma parte progênie da célula B do centro germinativo se diferencia em plasmócitos secretores de anticorpos que migram para a medula óssea [24]. A outra parte da descendência se transforma em célula B de memória, que vivem por longos períodos, recirculam entre os gânglios linfáticos e o baço, e respondem rapidamente a exposição subsequente ao antígeno com a diferenciação em células secretoras de anticorpo de alta afinidade.

A diferenciação de células B ativadas em plasmócitos ou célula de memória é controlada pela expressão de vários fatores de transcrição. Já a autoregulação de anticorpos é um mecanismo pela qual a resposta imune humoral é regulada negativamente quando uma quantidade suficiente de anticorpos foi produzida e complexos antígeno-anticorpo solúveis estão presentes.

As imunoglobulinas são constituídas de uma porção variável que se liga ao antígeno (Fab) e uma porção cristalizável constante (Fc), cuja importância está na sua ligação aos receptores celulares e na ativação do sistema complemento. A imunoglobulina de membrana e o receptor para porções Fc de IgG nas células B, chamado FcγRIIB, são reunidos por complexo antígeno-anticorpo e ativa a cascata de sinalização inibidora ao longo da cauda citoplasmática de FcγRIIB, que termina a ativação de célula B [24, 25].

As células T auxiliares (linfócitos T *helper* CD4+) podem ser subdivididas em duas populações efetoras distintas, Th1 e Th2. Th0 pode ser uma população distinta e efetora ou um estágio intermediário da diferenciação das células T CD4+ em Th1 e Th2. Células Th1 são tipicamente, produtoras de INF- γ (interferon gama), IL-2, TNF- β e TNF- α (fator de necrose tumoral beta e alfa) sendo essenciais para o estabelecimento de respostas imunes celulares. As células Th2 produzem, caracteristicamente, IL-4, IL-5, IL-13 e são importantes indutoras da síntese de IgE por células B, participando, principalmente, das alergias e infecções por helmintos.

1.3.4 Estrutura e características dos anticorpos

Anticorpos ou imunoglobulinas compõe uma família de glicoproteínas estruturalmente similares produzidas em formas ligadas à membrana celular ou secretadas por linfócitos B.

Os anticorpos ligados à membrana celular atuam como receptores que intercedem à ativação de linfócitos B desencadeada por antígeno, e quando secretados atuam como mediadores de resposta imune humoral específica, participando de diversos mecanismos efetores que eliminam os antígenos ligados.

Todos os anticorpos apresentam uma estrutura simétrica comum, composta de duas cadeias pesadas idênticas covalentemente unidas e duas cadeias leves idênticas, cada ligada a uma cadeia pesada (figura 4).

Cada cadeia é formada por dois ou mais domínios Igs enovelados independentemente com cerca de 110 aminoácidos, contendo sequências conservadas e pontes de dissulfeto intracadeia. Os domínios N-terminais das cadeias pesadas e leves formam as regiões V das moléculas de anticorpos, que diferem em imunoglobulinas de diferentes especificidades. A região V da cadeia pesada e leve contem três regiões hipervariáveis separadas, de cerca de 10 aminoácidos, que são especialmente montadas para formar o sítio de ligação ao antígeno da molécula de anticorpo. Os anticorpos são classificados em diferentes isotipos com base em diferenças nas regiões C da cadeia pesada, que são

compostas por cinco domínios Ig. Essas classes e subclasses apresentam diferentes propriedades funcionais [26].

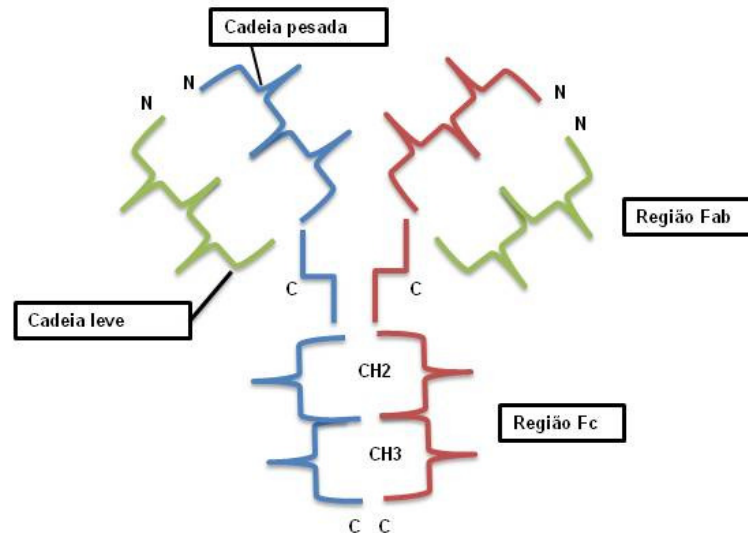


Figura 4. Estrutura da IgG secretada. Cadeia leve (verde), cadeia pesada (azul), pontes de dissulfeto cadeia Ig (vermelho). Região Fab, sítio de ligação ao antígeno. Os anticorpos são classificados em diferentes isotipos com base em diferenças nas regiões C da cadeia pesada, que são compostas por cinco domínios Ig divididos em classes e subclasses que apresentam diferentes propriedades funcionais.

As classes de anticorpos são denominadas IgM, IgD, IgG, IgE e IgA. As cadeias leves de uma única imunoglobulina são do mesmo isotipo que apresentam diferentes domínios C. A maioria das funções efetoras dos anticorpos é mediada pela região C das cadeias pesadas. No entanto, tais funções são desencadeadas pela ligação do antígeno aos sítios na região V. Epítomos lineares de antígenos proteicos são compostos por uma sequência de aminoácidos adjacentes, enquanto os determinantes conformacionais são formados pelo enovelamento de cadeias peptídicas. A afinidade de interação entre os sítios de combinação de uma única molécula de anticorpo e um único epítomo é geralmente representada pela constante de dissociação (K_d), calculada com bases em dados sobre esta ligação.

Antígenos polivalentes contêm múltiplos epítomos idênticos aos quais moléculas idênticas de anticorpos podem se ligar. O anticorpo pode se ligar a dois ou, no caso da IgM, a 10 epítomos diferentes, aumentando a avidéz entre antígeno-anticorpo. A concentração relativa antígeno polivalentes e anticorpos podem favorecer a formação de complexo imune, que podem se depositar em tecidos e provocar danos.

A ligação do anticorpo ao antígeno pode ser altamente específica, distinguindo pequenas diferenças nas estruturas químicas. Reações cruzadas, onde dois ou mais antígenos podem ser ligados ao mesmo anticorpo também é possível. Diversas alterações na estrutura dos anticorpos sintetizados por um clone de linfócito B podem ocorrer durante uma resposta imune. Alterações no segmento gênico da região C, sem modificações da região V, são as bases da mudança de isotipos, com mudanças da função efetora, mas não de sua especificidade.

Diferentes isotipos de cadeias pesadas da molécula de imunoglobulina atuam com funções efetoras distintas (tabela 1). Algumas subclasses de IgG ligam-se a receptores Fc de fagócitos e promovem fagocitose de partículas cobertas por anticorpos; IgM e algumas subclasses de IgG ativam o sistema complemento e IgE ligam-se a receptores Fc de mastócitos provocando a ativação dessas células. A exposição a diferentes antígenos estimula a mudança de classe de isotipo na célula B para os que são mais adequados e assim ocorre uma resposta mais especializada e efetiva [27].

A neutralização é a única função dos anticorpos que é inteiramente mediada pela ligação ao antígeno, não sendo necessária a participação de regiões constantes de imunoglobulina. Apesar das várias funções efetoras dos anticorpos serem mediadas por regiões constantes da cadeia pesada Ig, todas estas funções são iniciadas pela ligação de antígeno às regiões variáveis do anticorpo.

A ligação de anticorpos a antígenos multivalentes, como polissacarídeos ou epítomos repetitivos presentes na superfície destes antígenos, faz com que as regiões Fc dos anticorpos fiquem próximas uma das outras, e este agrupamento de molécula de anticorpo leva à ativação de complemento e possibilita que os

anticorpos se liguem aos receptores Fc de fagócitos e os ative. A necessidade de ligação ao antígeno assegura que os anticorpos ativem vários mecanismos efetores apenas quando for necessário, ou seja, quando os anticorpos encontram e ligam-se especificamente aos antígenos, não quando estes estão sob a forma circulante ou livre de antígeno [26, 27].

Tabela 1. Funções dos isotipos de anticorpos

Anticorpos	Funções efetoras específicas
IgG	❖ Opsonização de antígeno para fagocitose por macrófago e neutrófilo ❖ Ativação da via clássica do complemento ❖ Citotoxicidade mediada por célula natural Killer ❖ Imunidade neonatal ❖ Inibição por retroalimentação da ativação de célula B
IgM	❖ Ativação da via clássica do complemento ❖ Receptor de antígeno dos linfócitos B virgens (naïve)
IgA	❖ Imunidade de mucosa (trato gastrointestinal e repertório) ❖ Ativação de complemento pelas vias lectinas ou pela via alternativa
IgE	❖ Desgranulação de mastócito (reação de hipersensibilidade imediata)
IgD	❖ Receptor de antígeno dos linfócitos B virgens

1.3.5 Isotipos de anticorpos associados à hemofilia A

O desenvolvimento de anticorpos contra o FVIII em pacientes com hemofilia A podem ser de dois tipos: (1) anticorpos neutralizantes da atividade coagulante do FVIII (inibitórios ou inibidores), e (2) anticorpos não neutralizantes (não inibitórios) [28]. A presença de anticorpos não neutralizantes contra o FVIII já foi relatada em pacientes com hemofilia A sem histórico de inibidor e também em indivíduos saudáveis [29]. Recentemente, alguns trabalhos demonstraram que a resposta de anticorpos contra FVIII em pacientes com hemofilia A são em sua maioria do isotipo IgG, e o perfil das subclasses destes isotipos de imunoglobulina (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), tem sido demonstrada em algumas grupos de pacientes com hemofilia [28, 30, 31]. O mesmo perfil de imunoglobulina tem sido

associado a pacientes que desenvolvem autoanticorpos neutralizantes (inibidores adquiridos).

Contudo, as informações ainda são limitadas e os desenhos dos estudos são heterogênicos. Os resultados são diferentes dependendo do produto que está sendo avaliado, bem como o tipo de técnica aplicada para análise. Além disso, também há limitação quanto ao número de pacientes estudados e na maior parte destes estudos não há avaliação dos isotipos de imunoglobulinas associadas à condição clínica do paciente quanto à classificação do inibidor, conforme mencionado anteriormente, quanto ao título de inibidor (alto ou baixo) e resposta anamnética (alta ou baixa resposta).

1.4 Protocolos de indução de imunotolerância ao FVIII

Conforme discutido anteriormente, uma vez que uma resposta imune adaptativa ao FVIII foi estabelecida, as células B de memória e plasmócitos específicos ao FVIII representam alvos terapêuticos muito importantes para a imunomodulação destes pacientes. Desta forma, o protocolo de indução de imunotolerância (ITI), é a única alternativa para se eliminar estes anticorpos inibitórios. Este protocolo consiste na exposição contínua do paciente ao FVIII, na tentativa de dessensibilizar o paciente à proteína do FVIII. Embora muitas vezes bem sucedido com taxa de sucesso em torno de 70% entre os diferentes tipos de protocolos, a ITI é extremamente dispendioso e é menos provável que pacientes com altos títulos de inibidores apresentem sucesso.

Durante a última década, um significativo progresso foi feito no esclarecimento do mecanismo da resposta aos anticorpos contra o FVIII e na supressão destas respostas. Estudos em modelos animais têm proposto novos protocolos que apresentam menos custo para induzir tolerância para o FVIII. Desta forma, avanços têm sido feitos com o propósito de reduzir a resposta imune anti-FVIII e promover tolerância imunológica sustentável em pacientes com inibidores pré-existentes.

A maior parte das informações relacionadas a fatores preditivos de resposta ao protocolo de ITI é advinda da análise retrospectiva de registros de pacientes

com inibidor que se submeteram ao protocolo [32-34]. Com base nesses registros, alguns fatores preditivos de sucesso foram estabelecidos, incluindo, o pico histórico de inibidor < 200 UB e o título de inibidor < 10 UB no momento do início do protocolo de ITI. Alguns estudos também sugerem resposta mais rápida em pacientes mais jovens com inibidores desenvolvidos há pouco tempo [35, 36].

1.5 Reações de hipersensibilidade na hemofilia A

Além da ocorrência dos inibidores, alguns pacientes com hemofilia podem apresentar reação de hipersensibilidade durante a infusão dos concentrados de fatores. Isto pode acontecer associado ou não à presença de inibidores. Em alguns casos esta reação alérgica, ou de hipersensibilidade, pode limitar-se a ocorrência de prurido, edema palpebral, erupções cutâneas como exantema (rash cutâneo), tremores e febre.

No entanto, alguns pacientes podem apresentar reação anafilática. A anafilaxia é um tipo de reação alérgica com resposta sistêmica de hipersensibilidade imediata caracterizada por edema em vários tecidos, levando à queda da pressão arterial após um processo de vasodilatação (choque anafilático) e em quadros graves, edema da glote, com risco de morte por insuficiência respiratória aguda. Neste tipo de reação, o alérgeno ativa os mastócitos em diferentes tecidos, resultando na liberação de mediadores que ganham acesso aos leitos vasculares em todo o corpo [37, 38].

As reações alérgicas para droga são de base imunológica, e podem ser agrupadas em 4 tipos de acordo com a classificação de Gell e Coombs: (1) reação de hipersensibilidade que são mediadas por IgE; (2) reação citotóxica; (3) reação mediada por complexos imune; (4) reação de hipersensibilidade mediadas por célula T. A reação mais frequente induzida por drogas é a do tipo I seguida da tipo IV. As reações que ocorrem em até uma hora são classificadas como reações imediatas e geralmente são mediadas por IgE. A resposta do tipo I, que ocorrem entre 1 a 6 horas ou após 24 horas são chamadas de reações tardias e estão relacionadas com a resposta do tipo IV [39].

A via clássica de ativação da resposta do tipo I é provocada por um antígeno (alérgeno) que adere à IgE pré-fixada aos mastócitos e leva à liberação de mediadores inflamatórios. No desenvolvimento da hipersensibilidade imediata as etapas são: exposição a um antígeno que estimula resposta de célula Th2 e produção de IgE, ligação da IgE a receptores Fc dos mastócitos, ligação cruzada da IgE e receptores Fc pelo alérgeno, ativação de mastócitos e liberação de mediadores. Indivíduos suscetíveis possuem maiores níveis de IgE na circulação e mais receptores Fc dos mastócitos específicos à IgE. A síntese da IgE é induzida por exposição do antígeno às citocinas Th2, em especial IL-4. Mastócitos ativados e basófilos produzem três classes importantes de mediadores: aminas biogênicas, como a histamina; mediadores de lipídios, como as prostaglandinas, os leucotrienos, fator de ativação plaquetária (FAP) e citocinas como TNF- α , IL-4 e IL-5, IL-13. As aminas biogênicas e os mediadores de lipídio provocam reações rápidas de hipersensibilidade imediata dos vasos e da musculatura lisa, como a permeabilidade vascular, vasodilatação e broncoconstrição [38].

Na hemofilia não está claro os mecanismos envolvidos nas reações alérgicas e anafiláticas durante a terapia de reposição. A hipersensibilidade mediada por IgE e a ativação pela via do complemento foram postulados anteriormente [38, 39]. No entanto, poucos estudos comprovaram o surgimento da imunoglobulina E (IgE) na anafilaxia ao FVIII [40], e não é observado pesquisas que avaliem os possíveis mecanismos envolvidos na resposta de hipersensibilidade com interação celular e imunológica na hemofilia. Estudos também mostraram as subclasses IgG2 e IgG4 como responsáveis pelas reações anafiláticas [41].

A reação alérgica na hemofilia pode estar associada diretamente ao tipo de concentrado utilizado, contudo, alguns pacientes podem apresentar reação toda vez que são expostos a diferentes produtos, sejam eles derivados de plasma ou recombinantes [42]. A reação anafilática é bem conhecida e mais prevalente na hemofilia B grave (FIX:C <1%). No entanto, mais recentemente com o maior controle das notificações das reações, em decorrência de novos produtos no mercado para reposição de FVIII e FIX, houve um aumento significativo na notificação deste tipo de reação não apenas na hemofilia B, mas também na

hemofilia A. A ocorrência de uma resposta anafilática para um produto de FVIII normalmente não cursa com o desenvolvimento de anticorpos inibitórios. Por outro lado, na hemofilia B é comum a reação anafilática ocorrer simultaneamente com o desenvolvimento do inibidor anti-FIX. Estudos evidenciaram que pacientes com hemofilia B grave com grandes deleções gênicas são 26% mais suscetíveis ao desenvolvimento de reação anafilática [43].

1.6 Perspectivas dos inibidores e reação alérgica na hemofilia

Embora muitos fatores de risco no desenvolvimento de inibidor já foram identificados, a modulação do sistema imunológico para anticorpos inibitórios específica contra o FVIII, ainda é um desafio. Recentemente alguns autores têm formulado a hipótese de que células T funcionais reguladoras possam modular a resposta imune nestes pacientes, e assim, contribuir para a compreensão do mecanismo da formação de inibidor, e identificar novos fatores de risco [44, 45].

Desta forma, atualmente não há informações clínicas e laboratoriais suficientes que possam determinar qual indivíduo irá desenvolver inibidor ou reação anafilática. A caracterização da resposta imunológica e celular ao longo do período de tratamento de pacientes com hemofilia pode auxiliar no desenvolvimento de novos marcadores biológicos que possam prever a ocorrência de reação alérgica ou formação de inibidor e favorecer o desenvolvimento de novos produtos menos imunogênicos ou determinar o uso de medidas adjuvantes capazes de prevenir esse tipo de resposta.

O conhecimento dos diferentes aspectos envolvidos no desenvolvimento de anticorpos na hemofilia A e B no quadro clínico da anafilaxia e inibidores é um desafio devido à complexidade do sistema imunológico. Entender os mecanismos envolvidos é de fundamental importância para amplificar este conceito e aplicá-los em condutas que melhorem o tratamento destes pacientes.

As primeiras informações da anafilaxia na hemofilia foram observadas durante a infusão de crioprecipitado e plasma. Na ocasião essas reações foram atribuídas à presença de anticorpos para leucócitos ou β -lipoproteína em pacientes politransfundidos [46]. Com a tecnologia de purificação de concentrado

de fator e síntese de fator recombinante, estas reações ao contrário do que se esperava, tornou-se mais frequentemente reportadas, possivelmente pelo melhor controle das notificações.

A ocorrência de resposta anafilática para produtos de concentrado de FVIII, normalmente não cursa com o desenvolvimento de inibidor, contudo quando estes coexistem o tratamento torna-se mais complicado [42].

Embora o número de pacientes com hemofilia que apresentam inibidor ou reação alérgica ao FVIII pareça limitado, o grande impacto na qualidade de vida destes indivíduos em decorrência das complicações da doença e o alto custo do tratamento são complicações constantes dos profissionais envolvidos na atenção assistencial destes pacientes e o desenvolvimento de políticas de saúde.

No Brasil, de acordo com a Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados do Ministério da Saúde, há atualmente mais de 14.000 pacientes com hemofilia cadastrados (<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/>). O tratamento da hemofilia representa, para o Brasil, um custo aproximado de R\$ 500 milhões ao ano com a aquisição dos concentrados de fator de coagulação [47]. Na verdade, os custos com a doença são ainda mais elevados se considerarmos o tratamento de pacientes com inibidor. Mais de 30% do orçamento total do tratamento destes pacientes é destinado à compra exclusiva dos produtos bypass utilizados pelos aproximadamente 500 pacientes com inibidor.

Contudo, ainda não é totalmente conhecida a caracterização dos anticorpos inibitórios na resposta imune em pacientes com hemofilia A. Além disso, poucos trabalhos discutem estas imunoglobulinas durante a terapia de ITI ou reação anafilática. Assim, a investigação e caracterização do comportamento da resposta imune humoral nos pacientes com hemofilia, particularmente as imunoglobulinas em diferentes contextos da prática clínica, contribuirá para a melhor compreensão destes mecanismos, e talvez prediga nestes pacientes um evento de reação anafilática com ou sem desenvolvimento de inibidor.

2-OBJETIVOS

2-Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar nos pacientes portadores de hemofilia A que desenvolveram anticorpos inibitórios e/ou reação alérgica ao FVIII os mecanismos de resposta imune humoral envolvidos, através da determinação dos isotipos de imunoglobulinas presentes e os fatores estimulatórios nesse tipo de resposta.

2.2. Objetivos Específicos

1. Avaliar a distribuição das imunoglobulinas das subclasses da IgG e IgM em pacientes com hemofilia A que desenvolveram anticorpos inibitórios.
2. Avaliar a distribuição destas imunoglobulinas em uma análise longitudinal em pacientes com hemofilia A com inibidor ao longo de um determinado período e em pacientes com inibidor durante o período de tratamento da indução da imunotolerância (ITI).
3. Avaliar a presença de imunoglobulinas anti-FVIII em pacientes com hemofilia A que apresentaram reação alérgica à produtos contendo FVIII.

3-MATERIAIS E MÉTODO

3. Casuística e metodologia

3.1 Casuística

Foram convidados a participar deste estudo, pacientes com hemofilia A com história de desenvolvimento de inibidor e/ou reação alérgica à infusão de concentrados de FVIII, regularmente atendidos na Unidade de Hemofilia do Hemocentro da UNICAMP. Para a padronização do método utilizado para a determinação das subclasses de imunoglobulinas, foram também utilizadas amostras de 20 indivíduos saudáveis (controles normais).

Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), foram coletados amostras de sangue em citrato de sódio 0,109 M. Em média foram coletados em cada momento três tubos de 4,5 ml de sangue em citrato de sódio, em um volume total de aproximadamente 15 ml de sangue total, de acordo com idade, peso do paciente e momento da avaliação. As amostras foram processadas no Laboratório de Hemostasia do Hemocentro da UNICAMP e avaliadas de acordo com os três grupos conforme esquema da figura 5.

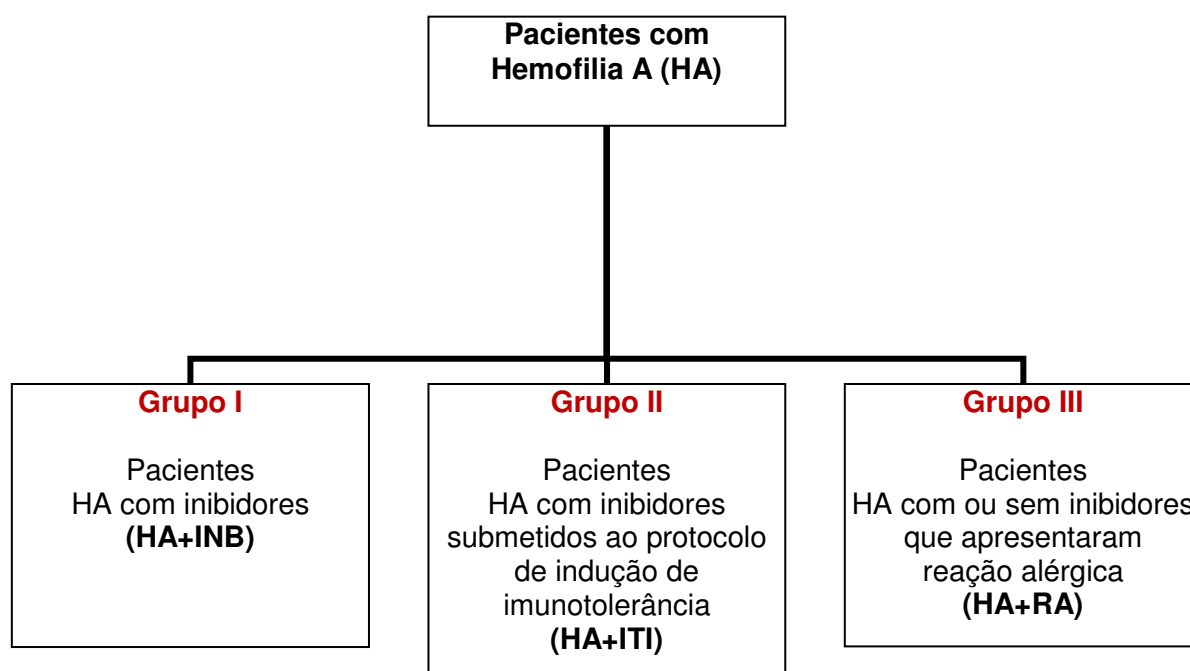


Figura 5. Esquema de divisão entre os grupos de pacientes com Hemofilia A participantes do estudo.

3.2 Metodologia

As amostras de sangue de cada participante dos estudos coletadas em citrato de sódio 0,109 M foram prontamente centrifugadas a 2500g por 10 minutos para a separação de alíquotas de plasma que foram armazenadas a -80°C até a realização dos testes.

Três metodologias foram aplicadas nesse projeto:

(1) Determinação dos anticorpos inibitórios (inibidores) através do método de Bethesda modificado por (Bethesda-Nijmegen);

(2) Determinação dos isotipos de imunoglobulinas envolvidas na resposta imune humoral anti-FVIII através do ensaio clássico de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), por metodologia desenvolvida *in house*. As avaliações das imunoglobulinas foram realizadas de acordo com o produto específico em que se desejou observar a reatividade específica das imunoglobulinas;

(3) Determinação das citocinas anti- e pró-inflamatórias através do método de citometria de fluxo em plataforma multiplex BDTM CBA[®] (*cytometric bead array*), comercializado pela empresa *BD Biosciences*, EUA.

O primeiro método, quantificação de inibidor, foi realizado para os três grupos de pacientes. O segundo método, isotipos de imunoglobulinas anti-FVIII, foi realizado sequencialmente nas amostras dos pacientes do grupo I e grupo III. Considerando os resultados de cada paciente do grupo I, foram selecionados os casos de acordo com a classificação clínica do inibidor e título apresentado. Após avaliação do perfil de imunoglobulinas encontrado, as subclasses IgG1 e IgG4 anti-FVIII foram avaliadas em uma análise longitudinal de 5 pacientes do grupo I e em todos os pacientes incluídos no grupo II. Adicionalmente, os pacientes do grupo II, os quais foram submetidos ao protocolo de ITI, foram avaliados para o perfil de interleucinas pro- e anti-inflamatórias/regulatórias. Finalmente o grupo III, além das IgG1 e IgG4 foram avaliados também o isotipo IgE anti-FVIII. A tabela 2 apresenta um resumo da aplicação de cada método de acordo com o grupo de pacientes estudado.

Tabela 2. Métodos utilizados de acordo com o grupo de pacientes estudados

Grupos de estudo	Bethesda-Nijmegen	ELISA (Ig anti-FVIII)	Método de citometria de fluxo em plataforma multiplex BD™ CBA®
Grupo I (HA+INB)	Aplicado para todas as amostras	IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM	Não aplicado
Grupo II (HA+ITI)		IgG1 e IgG4	Interleucinas pró-inflamatórias (IFN γ , TNF α , IL-2) e anti-inflamatória/regulatórias (IL-4, IL-6 e IL-10)
Grupo III (HA+RA)		IgG1, IgG4, IgE	Não aplicado

3.2.1 Tratamento com calor das amostras de plasma

Para a determinação dos anticorpos inibitórios e do isotipo de imunoglobulinas, as amostras de plasma passaram por tratamento de calor através do aquecimento a 56°C por 30 minutos. O objetivo desta aplicação técnica foi evitar a interferência da possível presença de FVIII endógeno residual ou exógeno proveniente da reposição de concentrado de produtos contendo FVIII. A presença de FVIII pode interferir na realização desses testes, com resultados falsos negativos ou encontrar menor titulação de anticorpos.

Esta interferência pode ocorrer devido à ocupação do sítio de ligação do anticorpo à proteína do FVIII. O aquecimento promoverá a denaturação do FVIII e das demais proteínas presentes na amostra. Como o que se está avaliando é a presença de imunoglobulina, estas são mais estáveis às alterações da temperatura e não há interferência nessa avaliação.

Esta rotina foi recentemente adotada em nosso laboratório, após uma completa avaliação para sua padronização. Estes dados foram apresentados em sessão oral no Congresso da Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia (*International Society on Thrombosis and Haemostasis*, ISTH) no ano de 2013 na cidade de Amsterdam, Holanda [48].

3.2.2 Determinação de anticorpos inibitórios: método Bethesda/Nijmegen

A determinação da quantificação (titulação) do inibidor pelo método de Bethesda modificado é considerada a técnica padrão ouro para este tipo de avaliação. Apresenta maior especificidade quando comparado à técnica original, além disso, é a técnica recomendada pelo subcomitê técnico da Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia (ISTH) para este tipo de análise [5].

O princípio desta técnica é avaliar indiretamente a ação do anticorpo em pesquisa junto a uma concentração da proteína de FVIII conhecida. Portanto a amostra teste do paciente deverá conter apenas o anticorpo e a fonte de FVIII deverá se provida pela técnica.

Após o tratamento das amostras com calor, estas foram seriadas em diferentes diluições do plasma junto a um plasma padrão normal de concentração de FVIII conhecida (plasma normal padrão de FVIII). Para o controle negativo foi realizado uma diluição 1:1 do plasma padrão normal de FVIII com plasma deficiente do fator FVIII (para simular amostra de um paciente com hemofilia sem a presença de inibidor). Após 2 horas de incubação a 37°C foi determinada a atividade residual do FVIII:C pelo método coagulométrico, os reagentes utilizadas para esta análise foram da marca IL (*Intrumentation Laboratory*, EUA).

Após a determinação do FVIII, calculou-se a atividade residual de FVIII para verificar junto à comparação do controle negativo a ação do inibidor. Este cálculo é aplicado para todas as diluições realizadas da amostra do paciente.

3.2.2.1. Cálculo da atividade do inibidor

Para o cálculo da atividade de inibidor, o valor encontrado de fator VIII residual de cada diluição foi dividido pelo valor de FVIII encontrado no plasma controle e multiplicado por 100. A atividade residual de FVIII versus a diluição foi plotada em papel mono-log em uma escala aritmética.

Por definição, uma unidade Bethesda corresponde à quantidade de inibidor capaz de neutralizar 50% da atividade de fator VIII plasmático, após incubação por 2 horas a 37°C. A atividade residual de 100% é o mesmo que zero unidade Bethesda, enquanto que 50% de atividade residual corresponde à 1 Unidade Bethesda (UB), sendo possível ter um gráfico que tenha correlação entre atividade

de fator VIII residual e o título de inibidor. O título de inibidor foi plotado em um gráfico quando a atividade de fator residual estava entre 25 e 75%. Os pontos são plotados em um gráfico log-linear com valores próximos a 75%, 50% e 25% de atividade residual, correspondendo aproximadamente a 0, 1 e 2 UB, respectivamente (figura 6). Valores menores que 0,6 UB são considerados negativos.

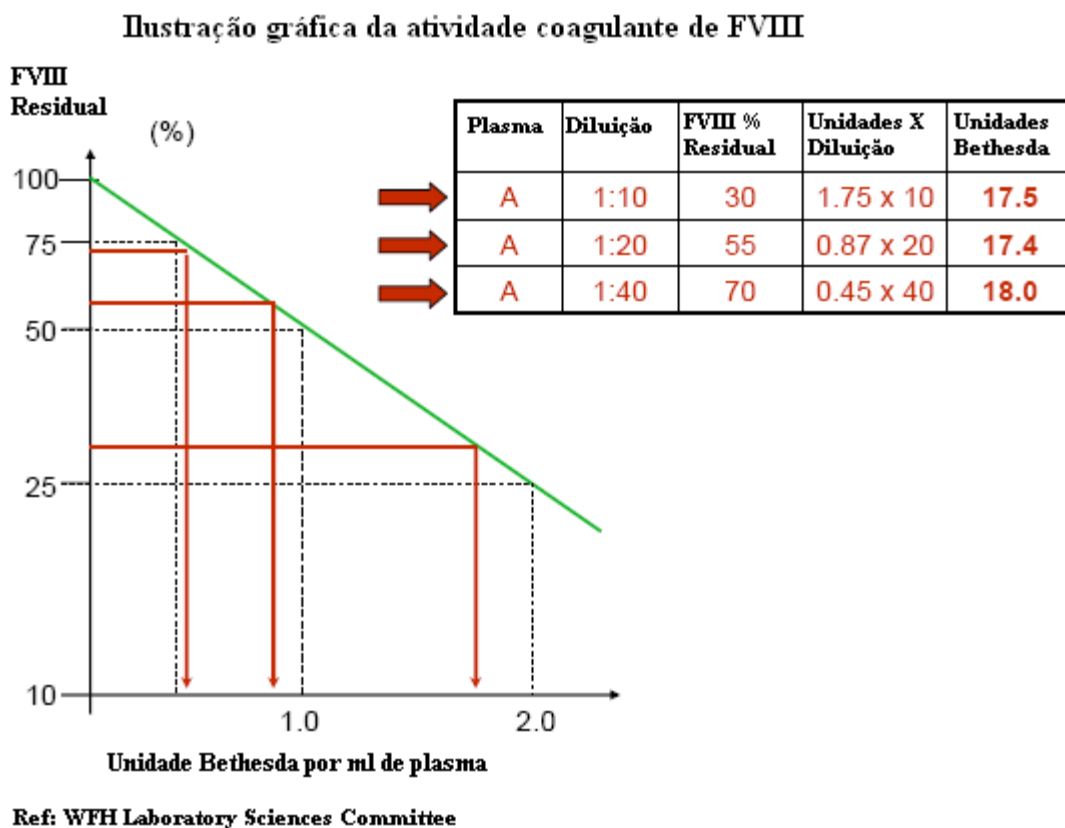


Figura 6. Cálculo da atividade residual do fator VIII (UB -Unidade Betesda)

3.2.3 Determinação das imunoglobulinas anti-FVIII

A determinação das imunoglobulinas foi realizada através do método clássico de ELISA. A microplaca de poliestireno (Nunc-Immuno™ PolySorp®, Thermo Scientific™, EUA) foi sensibilizada com o FVIII, utilizando diferentes tipos de concentrados de FVIII, produto derivado plasmático (pdFVIII) ou produto recombinante (rFVIII), na concentração de 1 µg/mL e em seguida adicionado a amostra teste. Na presença de anticorpo positivo, o mesmo se ligou a proteína do FVIII proveniente dos concentrados de FVIII.

Em seguida um anticorpo secundário conjugado com HRP (*horseradish peroxidase*) anti-imunoglobulina humana marcado com cromógeno foi utilizado para a reação de revelação, neste caso foram utilizados IgE, IgM, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (anticorpo policlonal de rato anti-humano Southern Biotech Assoc, EUA). Conforme mencionado anteriormente, os tipos de imunoglobulinas foram avaliadas de acordo com a condição clínica do paciente. A absorbância resultante foi lida a 492nm após adição de 50µl de H₂SO₄ 4N em todos os poços. Para este método, cada amostra foi analisada, pelo menos, oito vezes com diferentes diluições com um intervalo 1:10 até 1:640.

O resultado foi considerado positivo quando a densidade ótica foi maior do que o valor de corte estabelecido como branco (reação com todos os reagentes, sem a utilização da amostra teste). Para todas as amostras com suas respectivas diluições, foram contruídas curvas de calibração (diluição x densidade ótica), com o intuito de confirmar a reatividade de Ig contra o FVIII.

3.2.3.1 Validação do ELISA para a detecção de anticorpos contra o FVIII

Amostras de plasma de 20 indivíduos saudáveis (10 do sexo feminino e 10 do sexo masculino) de diferentes grupos sanguíneos foram utilizadas para a validação inicial do teste de ELISA IgG anti-FVIII. Todos estes indivíduos foram avaliados individualmente para a presença do inibidor. A precisão (inter-ensaio e intra-ensaio) do método foi avaliada e a variabilidade foi de ± uma etapa de diluição. Todas as amostras foram testadas no mínimo em dois dias diferentes com duas preparações diferentes de soluções.

3.2.4 Determinação das citocinas pró- e anti-inflamatórias/regulatórias

As citocinas foram avaliadas através do kit Th1-Th2 multiplex BD™ CBA® (*cytometric bead array*), comercializado pela empresa *BD Biosciences*, EUA. Este é um tipo de análise realizada através de citometria de fluxo e que tem a capacidade de analisar todas as citocinas ao mesmo tempo em uma única amostra, permitindo menor variabilidade técnica nas análises.

O CBA® é um método de captura de um analito solúvel (neste caso, a citocina), através de anticorpos específicos ligados a *beads* com detecção por citometria de fluxo. Cada *bead* de captura foi conjugada com um anticorpo específico para a citocina em análise. Em seguida um segundo anticorpo conjugado com PE (ficoeritrina), também específico, chamado de reagente de detecção é utilizado para identificação do analito ligado as *beads*. Os anticorpos que proporcionam um sinal fluorescente são considerados que formaram o complexo analito-anticorpo, sendo a fluorescência detectada proporcional à concentração da citocina. As interleucinas quantificadas foram: TNF- α , INF- γ , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10.

4-RESULTADOS

4- Resultados

Nossos resultados serão apresentados em três capítulos de acordo com a submissão dos artigos a revistas científicas internacionais.

Capítulo I *A longitudinal evaluation of anti-FVIII antibodies demonstrated IgG4 subclass is mainly correlated with high-titer inhibitor in haemophilia A patients*

Capítulo II IL4 and IL6 decrease whereas IgG4 shift to IgG1 during immune tolerance induction in patients with hemophilia A

Capítulo III Allergic reaction in a cohort of hemophilia A patients using plasma-derived factor VIII concentrate is rare and not necessarily triggered by factor VIII

4.1 Capítulo I: A longitudinal evaluation of anti-FVIII antibodies demonstrated IgG4 subclass is mainly correlated with high-titer inhibitor in hemophilia A patients

Autores: Silmara Aparecida de Lima Montalvão, Alini Camargo Tucunduva, Andrea Luísa de Almeida Sambo, Samuel de Souza Medina, Margareth Castro Ozelo

Local de desenvolvimento do trabalho:

Hemophilia Unit “Cláudio L. P. Corrêa”, Centro de Hematologia e Hemoterapia da Unicamp, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue, University of Campinas, São Paulo, Brazil.

Submissão do artigo:

*Artigo submetido para publicação na revista: **Haemophilia Journal***

A longitudinal evaluation of anti-FVIII antibodies demonstrated IgG4 subclass is mainly correlated with high-titer inhibitor in hemophilia A patients

Silmara Aparecida de Lima Montalvão, Alini Camargo Tucunduva, Andrea Luísa de Almeida Sambo, Samuel de Souza Medina, Margareth Castro Ozelo

Hemophilia Unit “Cláudio L. P. Corrêa”, Centro de Hematologia e Hemoterapia da Unicamp, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue, University of Campinas, São Paulo, Brazil.

Correspondence:

Margareth Castro Ozelo, MD, PhD

IHTC Hemophilia Unit Cláudio Luiz Pizzigatti Corrêa

INCT do Sangue Hemocentro Unicamp, University of Campinas

Rua Carlos Chagas 480, Cidade Universitária

Campinas, São Paulo 13.083.878 Brazil

Tel.: +55 19 3521 8756; fax: +55 19 3521 8670;

e-mail: margaret@unicamp.br

Running title: High-titer inhibitor is related to anti-FVIII IgG4

Keywords: hemophilia, IgG4, immunoglobulin, Inhibitor

The authors received funding support from the Bayer Hemophilia Awards Program, FAPESP and CNPq.

Abstract

The development of antibodies against factor (F) VIII comprises a polyclonal IgG response. Recent studies showed strong correlation between the presence of neutralizing anti-FVIII antibodies (inhibitors) and IgG4 subclass. The objective of this study was to evaluate anti-FVIII IgG subclasses in hemophilia A patients with inhibitor both in a single moment, and in a longitudinal analysis. Inhibitors were determined by Bethesda-Nijmegen modification assay. Anti-FVIII IgG subclasses were performed by ELISA, and samples from 20 healthy individuals were used to validate the test. We studied 25 hemophilia A patients with inhibitor, previously treated exclusively with plasma-derived FVIII (pdFVIII) concentrates or bypassing agents. IgG4 was present in samples from all 15 high-titer inhibitor patients, and IgG1 was detected in 20 analyzed patients. However, 10 patients with low-titer inhibitors in the moment of the analyses (5 low- and 5 high-responding inhibitor) had high presence of IgG1 and very low occurrence of the others IgG subclasses, including IgG4. These data were confirmed in the longitudinal analysis. When challenged with pdFVIII concentrate, patients showed an anamnestic response with increased IgG4 levels. This confirmed that the presence of IgG4 is mainly associated with high-titer inhibitor, whereas IgG1 is related in most of the time with low-titer inhibitors. In spite of being considered a nonpathologic antibody subclass with anti-inflammatory properties, IgG4 is correlated with the presence of high-titer inhibitor in the hemophilia setting. The comprehension of the role of IgG4 in immune response is important to establish the process for designing specific tolerance to FVIII.

Introduction

The development of inhibitory antibodies against factor (F) VIII, also called inhibitors, can occur in approximately 25% of hemophilia A patients after repeated infusion of FVIII protein [1]. This event involves a complex mechanism immune, and compromises the replacement therapy effectiveness in hemophilia A patients [2, 3]. The inhibitor presence is a major complication, and can lead to a significantly increase in the morbidity and negatively impacts in the quality of life of the hemophilia A patients. In this complication the immune response generates antibodies against FVIII protein that neutralizes the procoagulant function of FVIII or enhances its removal from the plasma, known as no-inhibitory antibodies [4, 5] . Both types of antibodies, inhibitory and no-inhibitory have been showed to be associated with IgG class immunoglobulin [6, 7]. Clinical and experimental data indicate that FVIII inhibitor development depends on CD4 T-cell help [8]. Interactions between B cells and CD4 T cells not only initiate expansion and differentiation of B cells, but also trigger isotype switching and affinity maturation of antibodies [9].

The characterization of immunoglobulin (Ig) subclass has been showed an important role to identify the reactivity of FVIII concentrate used in the treatment of patients with hemophilia A. Current studies demonstrated a strong correlation between high levels of anti-FVIII antibodies of IgG4 subclass with the presence of inhibitors and immune tolerance induction (ITI) failure [10, 11]. Whelan *et al.* demonstrated that non-inhibitory antibodies can be present in healthy individuals.

However, IgG4 is exclusively observed in hemophilia A patients with inhibitors or acquired hemophilia A.

We describe here the distribution of IgG subclasses observed in a population of hemophilia A patients with inhibitors (>0.6 BU) that corroborates those recent findings. Nevertheless, we obtained distinct results in the clinical setting of high- and low-responding inhibitors.

Patients and Methods

Ethics

This was part of a multicenter study, (*EMBIH - Estudo Multicêntrico Brasileiro de Inibidores em Hemofilia*) involving six Hemophilia Treatment Centers (HTCs) from Brazil and coordinated by the Hemophilia Unit from Hemocentro Unicamp in Campinas, Sao Paulo. Data collection was approved by the Institutional Review Board of the participating centers. The procedures followed were in accordance with the ethical standards and with the Helsinki Declaration.

Human plasma samples

Plasma samples from healthy individuals and hemophilia A patients were collected in 0.109 M citrated tubes as Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recommendation. The plasma samples were separated by 2500g for 10 min and storage at -80°C until the assay performance. All samples from hemophilia A patients were treated with heat, 56°C by 30 min, before the assay performance to improve the sensitivity of the tests.

Detection of neutralizing antibodies against FVIII

The neutralizing anti-FVIII antibodies were detected by Bethesda assay with Nijmegen modification [12, 13]. Considering the high variation of this assay demonstrated by different external quality control we performed three different dilutions for FVIII activity determination.[14]

ELISA for detection of binding antibodies

ELISA method was performed using two different plasma-derived FVIII (pdFVIII) concentrates, (I) Octavi SD Optimum[®], (Octapharma, France), and (II) an intermediate purity pdFVIII concentrate, 8Y[®] (Bio Products Laboratory, UK), which contains von Willebrand factor (VWF). In the first day, polysorp microtiter plates (Nunc ® MaxiSorp Sigma-Aldrich) were coated with 1 µg/mL FVIII overnight at 4°C. In the second day, the plates were washed (phosphate-buffered saline PBS; pH 7.4 containing Tween 20) and nonspecific binding sites were blocked by blocking buffers incubation (washing buffer with bovine serum albumin) for 1 hour at room temperature (RT). Afterward, considering the second washing step, test samples and both negative (healthy individual) and positive (patient with high title of inhibitor) controls were incubated for 2 hours at 37°C. The third washing was performed and then the antihuman-IgG specific for subclasses IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 and IgM (Southern Biotechnology Inc., USA) were applied as enzyme-conjugated secondary antibodies by incubation for 1 hour at 37°C. After the last washing step the o-phenylenediamine (OPD) was added and incubated at RT in

the dark. The optical density (OD) for each sample was assessed using a Microplate Reader (Sunrise, Tecan) in 492 nm. The OD of each sample was corrected for blank values.

For the ELISA method each sample was analyzed at least eight different times with an interval dilution from 1:10 until 1:640. The result was considered positive when the optical density was higher than the cutoff established for blank background signal level. For all samples a linear curve was designed to confirm the reactivity of Ig against FVIII.

Validation of ELISA for the detection of FVIII-binding antibody

Plasma samples from 20 healthy individuals (10 female, and 10 male) of different blood groups were used for the initial validation of the ELISA IgG subclass anti-FVIII. First, all samples were individually evaluated for the presence of inhibitor.

The precision (inter-assay and intra-assay variability) of the method was evaluated and the variability was $\pm$ one step of dilution in inter-assays.

Statistical analysis

The nonparametric coefficient of correlation according to Spearman was calculated for correlation analysis of FVIII-binding antibodies and FVIII inhibitors and paired t-test using Prism 6.0 (GraphPad Software).

Results

Healthy individuals were evaluated for the presence of antibodies against pdFVIII and no signal of reactivity was found. We analyzed samples from 25 Brazilian severe hemophilia A patients (median age, 23 years; range, from 8 to 49 years), with 44% African-descendants. These hemophilia A patients had exclusively received previous replacement therapy with pdFVIII concentrates, and after the development of inhibitor they were treated using bypassing agents, either activated prothrombin complex concentrate (aPCC) or recombinant activated FVII (rFVIIa). Patients with low-titer inhibitor eventually received pdFVIII, according to the clinical response.

From the total of 25 hemophilia A patients studied, 20 (80%) were classified as having high-responding inhibitors, among whom five had low-titer inhibitor (< 5 BU) at the time of analysis. IgG4 was present in the samples from all the 15 high-titer inhibitor patients, whereas IgG1 was present in other 21 patients (80%), independently of the inhibitor titer. Interestingly, 5 high-responding inhibitor patients with low-titer inhibitor at the moment of the analysis showed higher occurrence of IgG1 but very low occurrence of other IgG subclasses, including IgG4 (table 1).

Furthermore, a correlation between the IgG4 absorbance intensity and the inhibitor titer was observed ($r=0.67$; $p< 0.001$) (figure 01), suggesting the higher the titer of inhibitor, the greater the amount of IgG4 present in plasma. No correlation between IgG1 positive reaction and the inhibitor titer was observed. IgM was not detected in any analyzed sample.

Regarding the difference using the two pdFVIII concentrates, we observed a considerable reduction in the reactivity with pdFVIII concentrate containing von Willebrand factor (8Y[®], Bio Products Laboratory, UK).

IgG1 and IgG4 subclasses distribution in a longitudinal analysis

The observation of a lower occurrence of IgG4 in high-responding inhibitor patients with low-titer inhibitor led us to perform a longitudinal analysis of 5 high-responding inhibitor patients to better assess the relationship between IgG1 and IgG4 distribution and inhibitor titer. These patients were treated with bypass products, aPCC and/or rFVIIa in most of the time.

Patient 1 (figure 2), when challenged with pdFVIII concentrate showed an anamnestic response with increased inhibitor titer associated with higher IgG4 titer. No modification was observed in the IgG1 titer.

A similar pattern of the IgG subclasses titers associated to the inhibitor titer was also observed during the longitudinal evaluation for patients 2, 3 and 5 (figure 3). Patient 4 was the only case whose high-titer inhibitor (13 to 18 BU) presented a slightly different correlation, compared to the other four cases, with an upregulation for both IgG1 and IgG4 titers from 1:20 to 1:160.

Discussion

The characterization of the IgG1 and IgG4 subclasses in hemophilia A patients contributes to better understand the mechanism of immune response against FVIII.

Our results demonstrated that IgG4 subclass correlates with high-titer inhibitors, whereas IgG1 most of the time appears when the inhibitor titer is low, even in high-responding inhibitor patients. A similar result was observed during ITI response [11]. These data were confirmed in a longitudinal analysis and only IgG4 titers correlated with the anamnestic response to FVIII, with no IgG1 modulation in the presence of high levels of inhibitor.

We also observed that IgG subclasses reactivity was dependent on the type of product used in the analysis. The patients included in this study received exclusively pdFVIII and were evaluated with pdFVIII products. The difference of reactivity was also observed in other studies [10, 11].

IgG4 and IgG1 have different characteristics and there is little knowledge about the contribution of these subclasses in immune responses in the hemophilia setting. The IgG4 has long been considered a non pathologic antibody subclass with anti-inflammatory properties [15]. It is functionally different from other IgG subclasses because of its poor ability to activate complement and Fc-receptor– expressing effector cells. However, novel characteristics of IgG4 in fibroinflammatory diseases have been recently described [16]. Immune reactions in such diseases are characterized by the presence of a high level of IgG4 in the peripheral blood with an activation of regulatory T (Treg) cells. These findings further support the association of IgG4 with the activation of Treg cells. Understanding the behavior of each different type of CD4⁺ T-cells, particularly Treg cells, in the context of an environment with high levels of anti-FVIII IgG4 is important to establish the process

for designing specific tolerance to FVIII, which is crucial for the prevention and treatment of inhibitors in hemophilia patients.

What is known on this topic?

- Neutralizing anti-FVIII antibodies, known as inhibitors, have been associated with IgG subclasses immunoglobulin
- IgG1 and IgG4 appear to be correlated with high titer anti-FVIII inhibitors

What this paper adds?

- In a longitudinal analysis IgG4 is the only IgG subclass modulated with anti-FVIII inhibitor
- High- and low-responding inhibitor patients showed different distribution of IgG1 and IgG4, which IgG4 is correlated mainly with high titers inhibitors

Acknowledgments

The authors thank the collaborators of the EMBIH Project (*Estudo Multicêntrico Brasileiro de Inibidores em Hemofilia*), Marcelo Veiga, Cláudia Lorenzatto and Maria Cristina Montenegro (Hemocentro do Paraná, Curitiba, PR), Anelisa Strega (Hemocentro da Bahia, Salvador, BA), Denys Fujimoto (Hemocentro do Acre, Rio Branco, AC), Sylvia Thomas (Hemocentro do Mato Grosso, Cuiabá, MT), and Alessandra Prezotti (Hemocentro do Espírito Santo, Vitória, ES).

Authorship

Contribution: S.A.L.M. designed the study, performed the assays, collected and analyzed the data, and wrote the manuscript; A.C.T. performed the assays, A.L.A.S. collected the data; S.S.M., analyzed the data, and reviewed the manuscript; and M.C.O. designed the study, collected the data, and critically revised and approved the final version of the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

References

1. Darby, S.C., et al., *The incidence of factor VIII and factor IX inhibitors in the hemophilia population of the UK and their effect on subsequent mortality, 1977-99*. J Thromb Haemost, 2004. **2**(7): p. 1047-54.
2. Waters, B. and D. Lillicrap, *The molecular mechanisms of immunomodulation and tolerance induction to factor VIII*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(9): p. 1446-56.
3. Reding, M.T., *Immunological aspects of inhibitor development*. Haemophilia, 2006. **12 Suppl 6**: p. 30-5; discussion 35-6.
4. Astermark, J., S. Lacroix-Desmazes, and M.T. Reding, *Inhibitor development*. Haemophilia, 2008. **14 Suppl 3**: p. 36-42.
5. Lindgren, A., H. Wadenvik, and L. Tengborn, *Characterization of inhibitors to FVIII with an ELISA in congenital and acquired haemophilia A*. Haemophilia, 2002. **8**(5): p. 644-8.
6. Vincent, A.M., et al., *Non-neutralizing anti-FVIII antibodies: different binding specificity to different recombinant FVIII concentrates*. Haemophilia, 2009. **15**(1): p. 374-6.
7. Fulcher, C.A., S. de Graaf Mahoney, and T.S. Zimmerman, *FVIII inhibitor IgG subclass and FVIII polypeptide specificity determined by immunoblotting*. Blood, 1987. **69**(5): p. 1475-80.
8. Qadura, M., et al., *Recombinant and plasma-derived factor VIII products induce distinct splenic cytokine microenvironments in hemophilia A mice*. Blood, 2009. **114**(4): p. 871-80.
9. Abbas, A.K., K.M. Murphy, and A. Sher, *Functional diversity of helper T lymphocytes*. Nature, 1996. **383**(6603): p. 787-93.

10. Whelan, S.F., et al., *Distinct characteristics of antibody responses against factor VIII in healthy individuals and in different cohorts of hemophilia A patients*. Blood, 2013. **121**(6): p. 1039-48.
11. van Helden, P.M., et al., *IgG subclasses of anti-FVIII antibodies during immune tolerance induction in patients with hemophilia A*. Br J Haematol, 2008. **142**(4): p. 644-52.
12. Verbruggen, B., et al., *The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability*. Thromb Haemost, 1995. **73**(2): p. 247-51.
13. Verbruggen, B., W.L. van Heerde, and B.A. Laros-van Gorkom, *Improvements in factor VIII inhibitor detection: From Bethesda to Nijmegen*. Semin Thromb Hemost, 2009. **35**(8): p. 752-9.
14. Kitchen, S., et al., *Interlaboratory variation in factor VIII:C inhibitor assay results is sufficient to influence patient management: data from the UK national quality external assessment scheme for blood coagulation*. Semin Thromb Hemost, 2009. **35**(8): p. 778-85.
15. Aalberse, R.C., et al., *Immunoglobulin G4: an odd antibody*. Clin Exp Allergy, 2009. **39**(4): p. 469-77.
16. Zen, Y., et al., *Th2 and regulatory immune reactions are increased in immunoglobulin G4-related sclerosing pancreatitis and cholangitis*. Hepatology, 2007. **45**(6): p. 1538-46.

Figure 01. Correlation between titers of FVIII-specific IgG4 and inhibitor.

Correlation between titers of FVIII-specific IgG4 and titers of inhibitor in hemophilia A patients with inhibitors. The correlation was determined using the 2-tailed nonparametric correlation according to Spearman, and calculated using GraphPad Prism 6 software. The correlation is significant ($p < 0.001$).

Figure 02. Patient 1 longitudinal analysis of IgG1 and IgG4 in high-responding inhibitor patient and anamnestic response to pdFVIII with increase of IgG4. The correlation between inhibitor and IgG4 was $r^* 0.910$ (*Spearman correlation).

Figure 03. Patients 2-5 longitudinal analyses of IgG1 and IgG4 in high-responding inhibitor patients. The correlation between inhibitor and IgG4 for were $r^* 0.949$, $r^* 0.803$, $r^* 0.866$, patient 2, 3 and 5 respectively (*Spearman correlation).

Table 1. Evaluation of anti-FVIII IgG subclasses in hemophilia A patients with inhibitor.

Patients	Inhibitor titer (BU)	Responding inhibitor	IgG1		IgG2		IGg3		IgG4	
			I*	II*	I*	II*	I*	II*	I*	II*
Low-titer inhibitor (< 5 BU)										
L1	0.7	low	++++	-	+	-	-	-	-	-
L2	0.75	low	++	-	+	-	-	-	-	-
L3	0.95	low	+++	-	-	-	-	-	-	-
L4	1.4	low	+	-	-	-	-	-	+	-
L5	2.8	low	++	-	-	-	-	-	-	-
L6	0.9	high	-	+++	-	-	-	-	-	-
L7	1.9	high	++++	-	-	-	+	-	+	-
L8	3.15	high	+	+++	-	-	-	-	-	-
L9	2	high	++++	-	-	-	-	-	-	-
L10	4.9	high	++	-	-	-	-	-	-	-
High-titer inhibitor (> 5 BU)										
H11	7.4	high	++++	-	-	-	-	-	++++	-
H12	8	high	+++	-	-	-	-	-	+	-
H13	8.4	high	+++	-	+++	-	-	-	+	-
H14	11	high	++++	-	-	-	-	-	++++	-
H15	11.5	high	++++	-	++++	-	-	-	++	-
H16	12	high	+	-	+	-	-	-	++	-
H17	12.5	high	+	-	-	-	-	-	+	-
H18	14.5	high	-	-	-	-	-	-	+	-
H19	16	high	++	-	+++	-	-	-	+	-
H20	25	high	++	-	-	-	-	-	+++	-
H21	35	high	-	-	-	-	++++	-	++++	-
H22	40	high	++++	-	++++	-	++	-	++++	-
H23	58	high	-	-	-	-	-	-	++++	-
H24	155	high	+	-	+	-	-	-	+++	-
H25	384	high	+	+	-	-	-	-	+	-

*Two different pdFVIII concentrates were used as target antigen in the ELISA, (I) Octavi SD Optimum® (Octapharma, France), with FVIII 100 IU/mg, (II) 8Y® (Bio Products Laboratory, UK), with FVIII 2 IU/mg, and contains high levels of VWF. The results are presented as a positive reaction obtained with the following dilutions of the tests sample: -, negative; +, 1:10; ++ 1:40; +++ 1:80; +++++, 1:320.

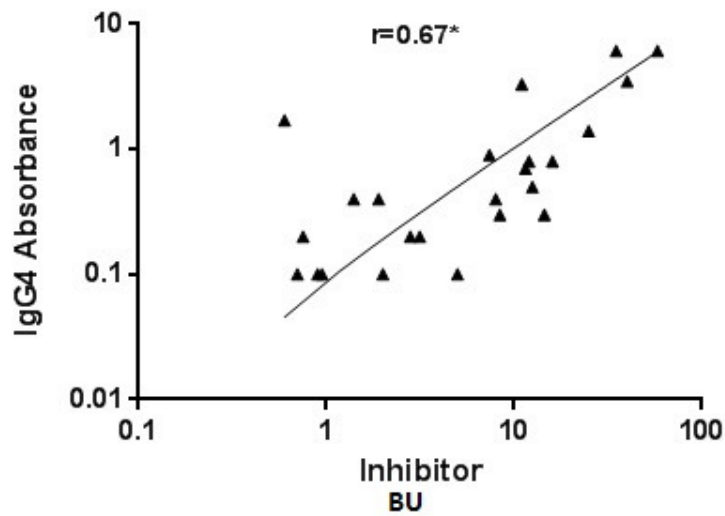


Figure 1

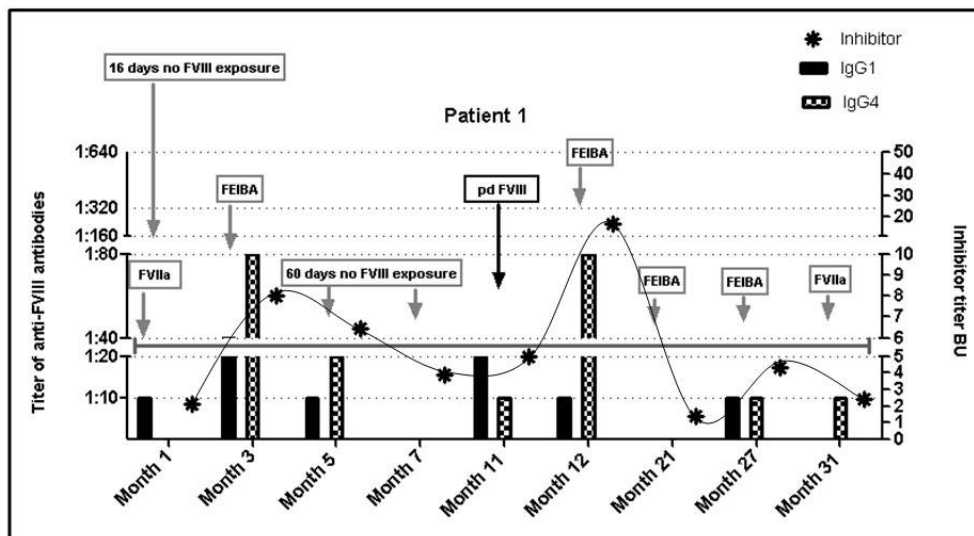


Figure 2

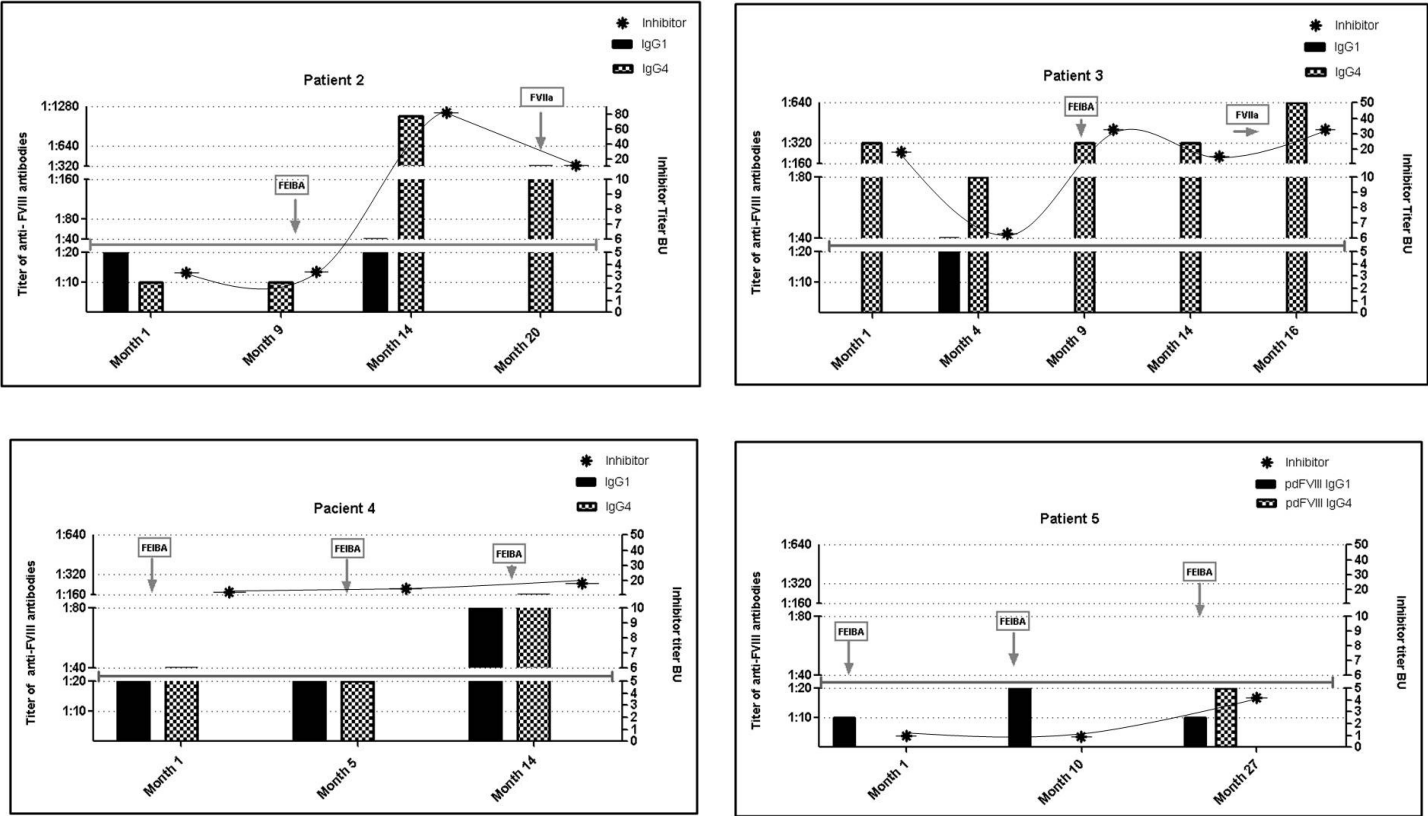


Figure 3

4.2 Capítulo II: *IL4 and IL6 decrease whereas IgG4 shift to IgG1 during immune tolerance induction in patients with hemophilia A*

Autores: Silmara Aparecida de Lima Montalvão, Alini Camargo Tucunduva, Andrea Luísa de Almeida Sambo, Lúcia Helena Siqueira, Samuel de Souza Medina, Margareth Castro Ozelo

Local de desenvolvimento do trabalho:

Hemophilia Unit “Cláudio L. P. Corrêa”, Centro de Hematologia e Hemoterapia da Unicamp, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue, University of Campinas, São Paulo, Brazil.

Submissão do artigo:

*Artigo será submetido para publicação na revista: **Haemophilia Journal***

IL4 and IL6 decrease whereas IgG4 shift to IgG1 during immune tolerance induction in patients with hemophilia A

Silmara Aparecida de Lima Montalvão, Alini Camargo Tucunduva, Andrea Luísa de Almeida Sambo, Lúcia Helena Siqueira, Samuel de Souza Medina, Margareth Castro Ozelo

Hemophilia Unit “Cláudio L. P. Corrêa”, Centro de Hematologia e Hemoterapia da Unicamp, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue, University of Campinas, São Paulo, Brazil.

Correspondence:

Margareth Castro Ozelo, MD, PhD

IHTC Hemophilia Unit Cláudio Luiz Pizzigatti Corrêa

INCT do Sangue Hemocentro Unicamp, University of Campinas

Rua Carlos Chagas 480, Cidade Universitária

Campinas, São Paulo 13.083.878 Brazil

Tel.: +55 19 3521 8756; fax: +55 19 3521 8670;

e-mail: margaret@unicamp.br

Running title: Shift of anti-FVIII IgG4 to IgG1 during ITI

Keywords: hemophilia, IgG4, immunoglobulin, inhibitor, immune tolerance induction

The authors received funding support from the Bayer Hemophilia Awards Program, FAPESP and CNPq.

Abstract

IgG subclasses distribution seems to be helpful for understanding the mechanism of factor (F)VIII tolerance. Current studies have shown that immune tolerance induction (ITI) treatment failure is associated with presence of anti-FVIII IgG4 antibodies. The objective of this study was to evaluate the distribution of IgG1 and IgG4, and the cytokine profile during ITI treatment in hemophilia A patients. Anti-FVIII inhibitor titer was determined by Bethesda-Nijmegen assay. The detection of IgG subclasses (IgG1 and IgG4) was performed by ELISA, and the assessment of cytokines TNF- α , IFN- γ , IL2 (pro-inflammatory) and IL-4, IL-6 and IL-10 (anti-inflammatory/regulatory) was performed using BDTM cytometric beads array (BD-CBA[®]). We analyzed samples from four severe hemophilia A patients for an interval from 30 to 115 weeks. Two patients obtained complete and one partial ITI success during the period of the observation. All patients had exclusively received plasma-derived FVIII (pdFVIII) concentrates before and during the ITI. Analyses of samples collected in different time points during the ITI revealed that the reduction in the inhibitor titer was associated with lower IL4 and IL6 levels. Besides, a shift from IgG4 to IgG1 and an increased level of TNF- α were detected when the patients achieved tolerance. These data widen knowledge about the tolerance mechanisms and can be helpful to develop new strategic, faster and less expensive treatments for achievement of tolerance to FVIII and restoration of regular therapy with FVIII concentrates in hemophilia A patients. In addition, IgG1 appears to be useful as a signal of good prognosis in tolerance protocols.

Introduction

Immune tolerance induction (ITI) for eradication of FVIII inhibitors in hemophilia A patients is the strategy of choice for eliminates inhibitors [1, 2]. ITI treatment comprises frequent administration of high or intermediate doses of FVIII, which generally results in a gradual decline in inhibitor titer [3]. Retrospective data from international registries indicate that the success rate for ITI varies between 70 to 80% [1, 4]. Outcome of ITI is influenced by the inhibitor titer at the onset of treatment, the historical peak titer and the peak titer during treatment.

The monitoring of inhibitor titers is essential clinical approach for protocol conduction and success evaluation of ITI. The anti-FVIII antibodies characterization by immunoglobulin (Ig) subclass evaluation has been showed an important issue to understand the real mean of the FVIII inhibition. First investigation of Ig and inhibitor showed a predominant presence of IgG and rare presence of IgM [5]. Current studies showed a strong correlation between high levels of anti-FVIII antibodies of IgG1 and IgG4 subclass with the presence of inhibitor and immune tolerance induction (ITI) failure [6, 7]. However, any study has been showed a longitudinal evaluation during the ITI protocol to identify the course of these IgG subclasses associated with success, partial success and failure of ITI protocol. Some in vitro studies with FVIII stimulation and cytokines has been associated high levels of interleukin (IL) 6 with presence of inhibitor [8], in the other hands some more recent study showed low levels of anti-inflammatory cytokines associated with inhibitor without FVIII stimulation [9]. The IgG subclasses and

cytokines profile association may show part of immune mechanism to tolerance of FVIII.

The objective of this study was to evaluate the distribution of the IgG1 and IgG4 and the cytokine profile during the period of ITI treatment.

Methods

Study design and ethics

Patients submitted to ITI protocol from May 2010 to December 2012 at the Hemophilia Unit from Hemocentro Unicamp in Campinas, Sao Paulo were selected to participate in this study. The ITI treatment was with low dose of plasma-derived FVIII (pdFVIII) concentrates, using 35 to 50 IU/kg 3 times per week. The samples were collected pre-treatment and during the protocol, from 30 to 115 weeks. The procedures followed were in accordance with the ethical standards and with the Helsinki Declaration.

Neutralizing antibodies against FVIII

The samples were collected in 0.109 M citrated tubes and separated by 2500g for 10 min and storage at -80°C until the assay was performed. The neutralizing antibodies anti-FVIII (inhibitors) were detected by Bethesda assay with Nijmegen modification. To improve the sensitivity of the test, the samples were previously treated with heat, 56°C by 30 min. Considering the high variation of this assay, demonstrated by different external quality controls [10, 11], we performed three different dilutions of FVIII determination.

Detection of anti-FVIII IgG subclasses by ELISA

The anti-FVIII IgG subclasses was performed by ELISA, using two different FVIII products, a pdFVIII concentrate, Octavi SD Optimum[®], (Octapharma, France), and a full-length recombinant FVIII (rFVIII) concentrate, Advate[®], (Baxter, Switzerland). In the first day, polystyrene microtiter plates (Nunc-Immuno[™] PolySorp[®], Thermo Scientific[™], USA) were coated with 1 µg/mL of FVIII overnight at 4°C. In the second day, the plates were washed (phosphate-buffered saline (PBS); pH 7.4 containing Tween 20) and unspecific binding sites were blocked by blocking buffers incubation (washing buffer with bovine serum albumin (BSA)) for 1 hour at room temperature (RT). Afterward, considering the second washing step, plasma samples from the ITI patients and from negative controls (healthy individual) and from positive controls (patient with high title inhibitor) were incubated for 2 hours at 37°C. The third washing was performed and then the antihuman-IgG specific for subclasses IgG1 and IgG4 (Southern Biotechnology Inc., USA) were applied as a horseradish peroxidase (HRP) enzyme-conjugated secondary antibodies by incubation for 1 hour at 37°C. After the last washing step the o-phenylenediamine (OPD) was added and incubated at RT in the dark. The optical density (OD) for each sample was assessed by Microplate Reader (Sunrise[™] Tecan, Switzerland) in 492 nm. The initial dilution sample for evaluation was 1:10 and the samples were considered positive when the optical density was higher than the cutoff established for blank background signal level. Each sample was analyzed at least for 8 dilutions from 1:10 to 1:640. For the result of each sample, a linear curve was constructed to confirm the reactivity of IgG against FVIII. The precision (inter- and

intra-assay variability) of the method were evaluated and the variability was $\pm$ one step of dilution in inter-assays.

BDTM Cytometric bead array (BD CBA[®]) to detection of cytokines profile

Plasma samples storage at -80 °C, from the same time points were also used to analyze the cytokines profile. This included interferon gamma (IFN- γ), tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and IL-2, IL-4, IL-6 and IL-10, performed using the Th1/Th2 BD CBA[®] kit for human cytokines (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) in accordance with manufacture. The fluorescence from the labeled beads was acquired in flow cytometer (FACSCaliburTM Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). The data were analyzed using the FCAP ArrayTM software v1.0.1 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

Statistical analysis

The nonparametric coefficient of correlation according to Spearman was calculated for correlation analysis of anti-FVIII antibodies and anti-FVIII inhibitors and paired t-test using Prism 6.0 (GraphPad Software).

Results

Four severe hemophilia A patients were included in this study. Patients were evaluated for an interval ranging from 30 to 115 weeks of the ITI protocol, corresponding to the time for ITI success achievement or the moment of the last

assessment. The clinical characteristics of patients and protocol details are showed in table 1.

Both patient 1, with partial success (figure 1), and patient 2, who did not achieve success at the time of last evaluation (figure 2A), showed persistent presence of IgG4, in spite of inhibitor decrease. Moreover, patients 3 and 4, which obtained complete success on ITI with good pharmacokinetic parameters, showed at the end of treatment absence or remarkable reduction of IgG4 anti-pdFVIII titer with presence of IgG1 (figure 2B and 2C). Interestingly, patient 4 after achieved success with negative inhibitor titer and low levels of IgG4 anti-pdFVIII, had increase in inhibitor titer after received a vaccine, which was negative again few weeks after. This patient continued to be treated with pdFVIII concentrates with good pharmacokinetic parameters, and was never challenged with rFVIII concentrates. During this period although IgG4 anti-pdFVIII was negative, the IgG4 anti-rFVIII still positive, with titer reduction at the last evaluation (figure 2C).

The pro- and anti-inflammatory cytokines were also evaluated in all patients during the period of ITI in order to verify if IgG4 is driven by increase of anti-inflammatory cytokines. A clear modulation of the ITI response was obtained with patient 1. We observed that at the moment of inhibitor decrease, between weeks 13 to 24, there was a decrease of IgG4 accompanied by a reduction of IL4 and IL6, and an increase of TNF- α (figure 1).

Samples from patient 4 were also analyzed for IgG1 and IgG4 subclasses, using rFVIII (figure 2C). The reactivity was higher in all time points. At the end, week 83, IgG4 disappeared when tested with pdFVIII. However, it still present when rFVIII was used to perform the ELISA.

Discussion

The IgG subclasses have been studied in different cohorts of the hemophilia A patients [7, 12], including during ITI treatment [6]. In this study, we determined the distribution of the IgG1 and IgG4 and the cytokine profile during the period of ITI protocol. The patients that achieved success showed IgG4 decreased with the increase or arise of IgG1 accompanied by the presence of TNF- α . The patient 1 had partial success to ITI protocol, determined by the low titer (< 1 BU) of inhibitor, but inadequate pharmacokinetic parameters to FVIII. This occurred associated with the continued presence of IgG4 even when the inhibitor titer decreased.

The IgG4 has long been considered as a nonpathologic antibody subclass, with anti-inflammatory properties, and also as a signal of tolerance in allergic diseases [13]. Nevertheless, the observation of a new class of IgG4 associated with a pathologic setting as pancreatitis autoimmune and hemophilia is still unclear [14, 16]. In addition, different than expected, in the hemophilia setting the IgG1 appears to be associated with FVIII tolerance.

The results presented in our study have been also observed in other ITI studies and in animal experiments [6, 12, 15]. van Helder *et al.* showed a correlation between low-titers of inhibitor just with IgG1 subclasses in ITI patients [6]. In a study conducted by Reding *et al.*, the isotypes of anti-FVIII antibodies in hemophilia A patients were analyzed, including patients underwent ITI treatment and found that, after successful ITI, patients mainly produced Th1- driven IgG1 and IgG2 isotypes, whereas patients in whom ITI was primarily failure had Th2-driven

IgG4 antibodies [12]. Waters *et al.* also observed a Th1-immune response when animals had success tolerance to FVIII with anti-CD3 therapy [15].

In conclusion, the shift from IgG4 to IgG1 in the ITI context has been confirmed in our study. In the longitudinal analyses with the distribution of the IgG1 and IgG4 during ITI protocol, we also demonstrated the agreement in the modulation of anti-inflammatory cytokine profile. The knowledge of the tolerance mechanism will contribute to proper new strategies that can promote faster and possibly less expensive tolerance to FVIII. Furthermore, based on previous and our results, IgG1 may be used as a signal of a good prognostic in tolerance protocols.

Authorship

Contribution: S.A.L.M. designed the study, performed the assays, collected and analyzed the data, and wrote the manuscript; A.C.T. and L.H.S. performed the assays, A.L.A.S. collected the data; S.S.M., analyzed the data, and reviewed the manuscript; and M.C.O. designed the study, collected the data, and critically revised and approved the final version of the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

References

1. DiMichele, D.M., et al., *International workshop on immune tolerance induction: consensus recommendations*. Haemophilia, 2007. **13 Suppl 1**: p. 1-22.

2. Dimichele, D., *The North American Immune Tolerance Registry: contributions to the thirty-year experience with immune tolerance therapy*. Haemophilia, 2009. **15**(1): p. 320-8.
3. Mauser-Bunschoten, E.P., et al., *Low-dose immune tolerance induction in hemophilia A patients with inhibitors*. Blood, 1995. **86**(3): p. 983-8.
4. Mariani, G., B. Kroner, and G. Immune Tolerance Study, *Immune tolerance in hemophilia with factor VIII inhibitors: predictors of success*. Haematologica, 2001. **86**(11): p. 1186-93.
5. Fulcher, C.A., S. de Graaf Mahoney, and T.S. Zimmerman, *FVIII inhibitor IgG subclass and FVIII polypeptide specificity determined by immunoblotting*. Blood, 1987. **69**(5): p. 1475-80.
6. van Helden, P.M., et al., *IgG subclasses of anti-FVIII antibodies during immune tolerance induction in patients with hemophilia A*. Br J Haematol, 2008. **142**(4): p. 644-52.
7. Whelan, S.F., et al., *Distinct characteristics of antibody responses against factor VIII in healthy individuals and in different cohorts of hemophilia A patients*. Blood, 2013. **121**(6): p. 1039-48.
8. Hu, G., et al., *Cytokine production by CD4+ T cells specific for coagulation factor VIII in healthy subjects and haemophilia A patients*. Thromb Haemost, 2007. **97**(5): p. 788-94.
9. Oliveira, C.A., et al., *Cytokine profile and FVIII inhibitors development in haemophilia A*. Haemophilia, 2013. **19**(3): p. e139-42.
10. Kitchen, S., et al., *Interlaboratory variation in factor VIII:C inhibitor assay results is sufficient to influence patient management: data from the UK national quality external assessment scheme for blood coagulation*. Semin Thromb Hemost, 2009. **35**(8): p. 778-85.
11. Verbruggen, B., W.L. van Heerde, and B.A. Laros-van Gorkom, *Improvements in factor VIII inhibitor detection: From Bethesda to Nijmegen*. Semin Thromb Hemost, 2009. **35**(8): p. 752-9.
12. Reding, M.T., et al., *Distribution of Th1- and Th2-induced anti-factor VIII IgG subclasses in congenital and acquired hemophilia patients*. Thromb Haemost, 2002. **88**(4): p. 568-75.
13. Aalberse, R.C., et al., *Immunoglobulin G4: an odd antibody*. Clin Exp Allergy, 2009. **39**(4): p. 469-77.
14. Zen, Y., et al., *Th2 and regulatory immune reactions are increased in immunoglobulin G4-related sclerosing pancreatitis and cholangitis*. Hepatology, 2007. **45**(6): p. 1538-46.
15. Waters, B., et al., *Anti-CD3 prevents factor VIII inhibitor development in hemophilia A mice by a regulatory CD4+CD25+-dependent mechanism and by shifting cytokine production to favor a Th1 response*. Blood, 2009. **113**(1): p. 193-203.
16. Chaves, D.G., et al., *A shift towards a T cell cytokine deficiency along with an anti-inflammatory/regulatory microenvironment may enable the synthesis of anti-FVIII inhibitors in haemophilia A patients*. Clin Exp Immunol, 2010. **162**(3): p. 425-37.

Figure 1. Longitudinal evaluation of with partial ITI success. Despite the low titer (< 1 BU) of inhibitor at week 108, the patient persisted with inadequate pharmacokinetic parameters to FVIII. This was associated with the continued presence of IgG4 **(A)**. The pro-inflammatory **(B)** and the anti-inflammatory **(C)** cytokines profile showed a reduction of IL4 and IL6, and an increase of TNF- α between weeks 23 to 24, when occurred decrease of IgG4 and inhibitor titers.

Figure 2. Patient 2, 3, and 4 longitudinal evaluation of ITI treatment. Patient 2 did not achieve success up to week 102 of the ITI protocol. The high inhibitor titer is associated with the persistence of IgG4 anti-pdFVIII **(A)**. Patient 3 obtained complete ITI success at week 30, with remarkable reduction of IgG4 and inhibitor titer, and a low titer of IgG1 anti-pdFVIII also appeared **(B)**. Patient 4 also achieved success at week 30, when was observed decrease of the inhibitor and IgG4 anti-pdFVIII titers. The patient continued to be treated with pdFVIII concentrates with good pharmacokinetic parameters. At week 91 after received vaccine, the inhibitor titer increased with no clinical relevance, and few weeks after was negative again. The immunoglobulin distribution showed that although the IgG4 anti-pdFVIII disappeared at week 83, the IgG4 anti-rFVIII still positive, with titer reduction at the last evaluation. This patient was not challenged with rFVIII concentrates and he maintained good response to pdFVIII concentrates **(C)**.

Table 1. Clinical characteristics of hemophilia A patients submitted to ITI treatment

Patients	1	2	3	4
Age of first inhibitor	2y 2m	3y 11m	1y 10m	1y 2m
Age at start of ITI	5y 9m	13y 2m	1y 11m	4y 7m
Diagnosis (<i>F8</i> genotype)	sHA (INV22)	sHA (INV22)	sHA (ND)	sHA (INV22)
Historical peak titer (BU)	150	56	9.19	54
Pre-ITI titer (BU)	3.7	11	7.8	1.7
ITI status	Partial success	On going	Success	Success
Period of follow-up	108 weeks	102 weeks	30 weeks	115 weeks
ITI protocol	35 IU/kg 3x/week	50 IU/kg 3x/week	35 IU/kg 3x/week	35 IU/kg 3x/week

ITI, immune tolerance induction; sHA, severe hemophilia A; ND, not determined;
INV22, intron 22 inversion of factor VIII gene.

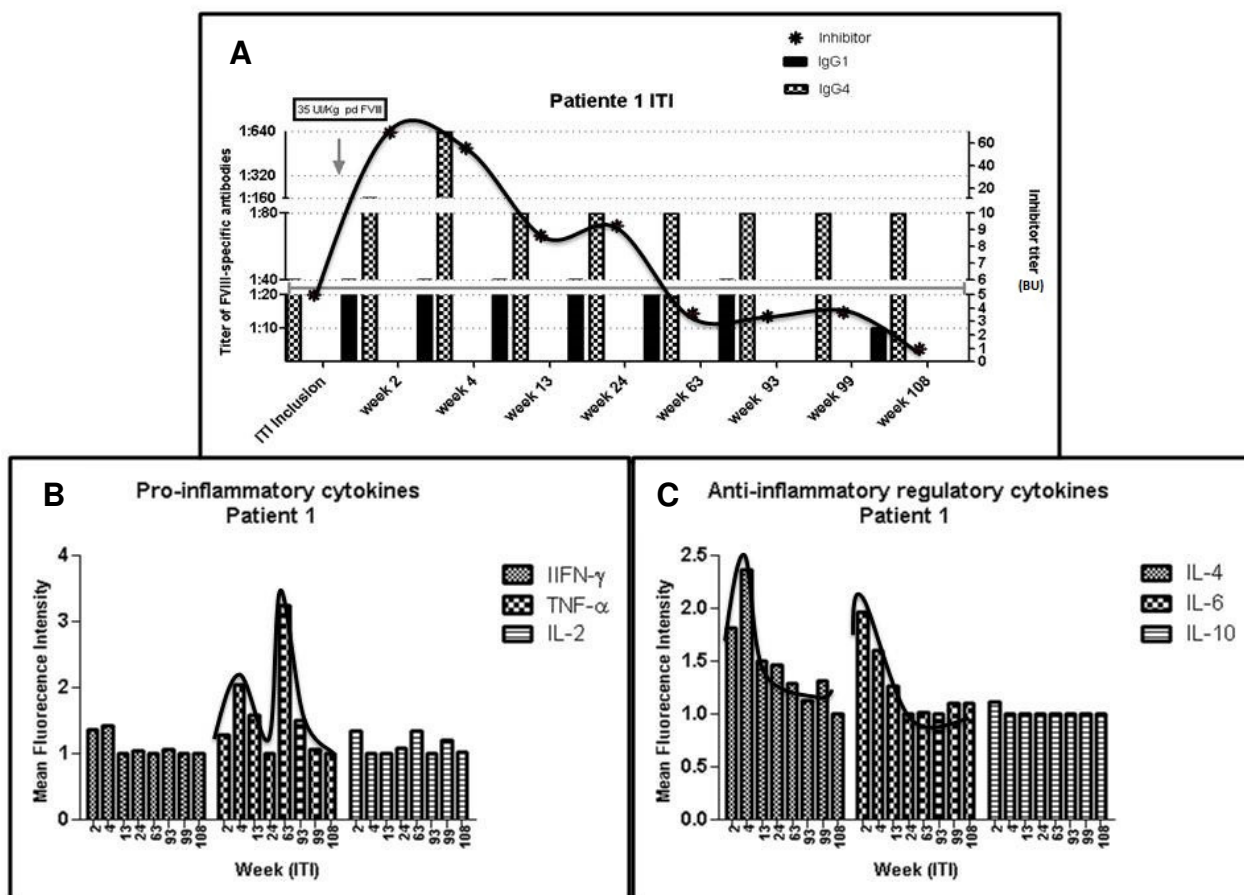


Figure 1

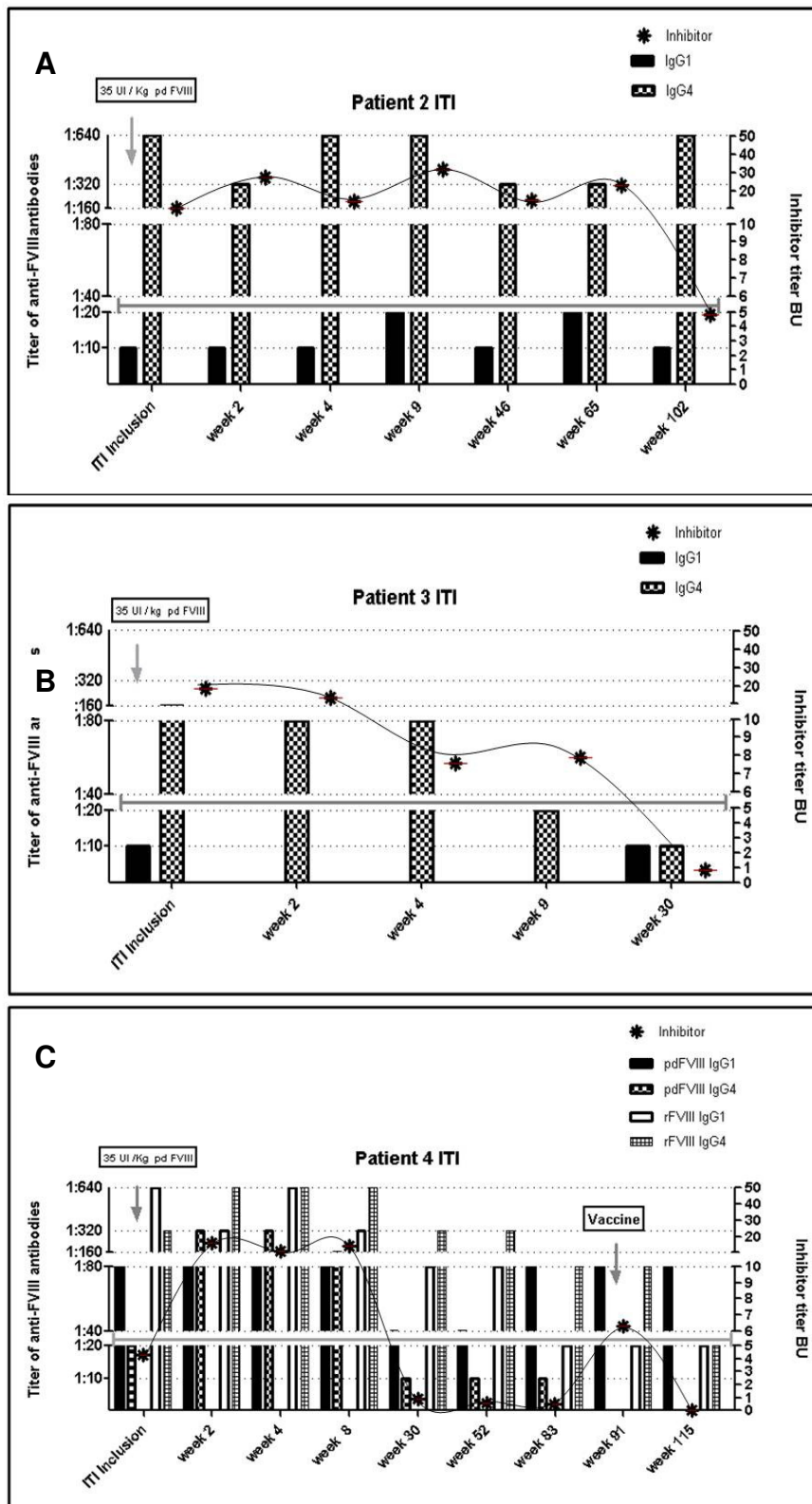


Figure 2

4.3 Capítulo III: *Allergic reaction in a cohort of hemophilia A patients using plasma-derived factor VIII concentrate is rare and not necessarily triggered by factor VIII*

Autores: Silmara Aparecida de Lima Montalvão, Alini Camargo Tucunduva, Andrea Luísa de Almeida Sambo, Lúcia Helena Siqueira, Samuel de Souza Medina, Margareth Castro Ozelo

Local de desenvolvimento do trabalho:

Hemophilia Unit “Cláudio L. P. Corrêa”, Centro de Hematologia e Hemoterapia da Unicamp, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue, University of Campinas, São Paulo, Brazil.

Submissão do artigo:

*Artigo submetido para publicação na revista: **Haemophilia Journal***

Allergic reaction in a cohort of hemophilia A patients using plasma-derived factor VIII concentrate is rare and not necessarily triggered by factor VIII

Silmara Aparecida de Lima Montalvão, Alini Camargo Tucunduva, Lúcia Helena de Siqueira, Andrea Luísa de Almeida Sambo, Samuel de Souza Medina, Margareth Castro Ozelo

Hemophilia Unit “Cláudio L. P. Correa”, INCT do Sangue Hemocentro de Campinas, Centro de Hematologia e Hemoterapia da Unicamp, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil.

Correspondence:

Margareth Castro Ozelo, MD, PhD

IHTC Hemophilia Unit Cláudio Luiz Pizzigatti Corrêa

INCT do Sangue Hemocentro Unicamp, University of Campinas

Rua Carlos Chagas 480, Cidade Universitária

Campinas, São Paulo 13.083.878 Brazil

Tel.: +55 19 3521 8756; fax: +55 19 3521 8670;

e-mail: margaret@unicamp.br

Running title: Allergic reaction in hemophilia A patients

Keywords: hemophilia A, IgE, inhibitor, allergic reaction, factor VIII

Word count: Summary: 250, Manuscript: 2482

Tables and Figures: 1 / 1

References: 12

Abstract

In contrast to hemophilia B, allergic manifestations are rare complications in hemophilia A patients treated with factor (F) VIII concentrates. Nevertheless, it can be serious and hamper the hemophilia treatment in these cases. The objective of this study was to evaluate the incidence of allergic reaction in a cohort of hemophilia A patients treated only with plasma-derived FVIII (pdFVIII) concentrates. In order to assess the possible mechanisms involved, plasma samples were collected in different time points in relation to the allergic event. These samples were analyzed for the presence of inhibitor and anti-FVIII immunoglobulins subclasses. Three out of 322 hemophilia A patients (0.9%) developed allergic reaction after exposure to pdFVIII products during the last fifteen years in our center. The first patient, with severe hemophilia A, without inhibitor, had anti-pdFVIII IgE and IgG4, but no anti-recombinant FVIII (rFVIII) IgE. The second patient, with severe hemophilia A, and high-responding inhibitor, presented allergic manifestation with the use of pdFVIII concentrate, and activated prothrombin complex concentrate (aPCC). Although anti-pdFVIII and anti-rFVIII IgG4 were detected, no anti-FVIII IgE was present. The third patient, a 5 year-old boy with moderate hemophilia A without inhibitor, and history of atopy, had no anti-FVIII immunoglobulin detected, and allergic symptoms disappeared after switching to rFVIII concentrate.

Thus, this study corroborates the low incidence of allergic reactions in hemophilia A patients. In the three cases presented here, the anti-FVIII immunoglobulin profile demonstrated that the allergic manifestation was triggered by other proteins contained in pdFVIII products, and not directed to FVIII.

Introduction

Allergic manifestations, including anaphylactic reaction, are well-known complication in hemophilia B, and are implicated in the higher risk of inhibitor development [1]. Nevertheless, allergic reactions in hemophilia A were more commonly seen when treatment was based on cryoprecipitate and low-purity plasma derived factor VIII (pdFVIII) concentrate [2, 3]. Nowadays, with the development of recombinant products, although the allergic events are more frequently notified, they possibly seldom occur [4, 5].

Limited numbers of studies were able to demonstrate the mechanism involved in allergic reactions and this issue remains unclear. In rare cases, immunoglobulin (Ig) IgG4 and IgG2 were associated to allergic reactions conditions in hemophilia A [6, 7]. Indeed, previous report demonstrated that IgG4 is associated with inhibitory antibodies to factor (F) VIII [8, 9]. In despite of the occurrence of inhibitor in up to 30% of severe hemophilia A patients, allergic reaction in this population is rare.

The most common allergic reaction to drugs are type I hypersensitivity (or immediate hypersensitivity) reaction which are mediated by IgE isotype [10]. So far, there is just one report of anaphylactic reaction associated with the use of recombinant factor VIII (rFVIII) concentrate that was proved to be IgE-mediated [11].

The objective of this study was to evaluate the frequency of allergic reaction in hemophilia A patients in a single reference Hemophilia Treatment Center (HTC) and identify the isotype of immunoglobulins involved in patients that presented allergic reaction to pdFVIII concentrates.

Method

Patients

All hemophilia A patients followed at the Hemophilia Unit from Hemocentro Unicamp in Campinas, Sao Paulo, during the past fifteen years had their medical history revised for the incidence of allergic reaction with the use of pdFVIII concentrates, which were the only type of FVIII-containing product available in our center during the time of the study.

Patients presenting with allergic symptoms after administration of pdFVIII concentrates were prospectively assessed for the occurrence of allergic reactions in subsequent infusions and evaluated for the presence of neutralizing antibodies against FVIII (inhibitors) and the anti-FVIII immunoglobulins subclasses.

The procedures followed were approved by the Institutional Review Board, and were in accordance with the ethical standards and with the Helsinki Declaration.

Detection of neutralizing antibodies against FVIII

Inhibitors were determined by Bethesda-Nijmegen modification assay, as previously described [12]. All plasma samples were treated with heat, 56°C by 30 min, before the assay performance to improve the sensitivity of the test.

ELISA for detection of binding antibodies

Anti-FVIII immunoglobulins were detected by ELISA method, according to standard procedures, using antihuman-Ig specific for subclasses IgG1, IgG4 and IgE

(Southern Biothechnology Inc., USA). The plates were coated with a pdFVIII, Octavi SD Optimum[®] (Octapharma, France), or a full-length recombinant FVIII concentrate (rFVIII), Advate[®] (Baxter, Switzerland). Plasma samples were diluted between 1:10 and 1:1,280. Samples from 20 healthy individuals were used to validate the test.

Results

Three out of 322 hemophilia A patients (0.9%) presented with allergic reaction after exposure to plasma derived products (pdFVIII or aPCC) during the past fifteen years in our center. Table 1 summarizes the clinical and laboratory findings of these three cases.

Patient 1

The first case was a 46 years-old man, with severe hemophilia A (FVIII < 1 IU/dL), without history of inhibitor, and no evidence of atopic diseases. As complications he has positive serology for hepatitis C, and mild hemophilic arthropathy. During the previous 5 years, he presented sporadic allergic reactions with the use of several different pdFVIII concentrates. The symptoms included tremor, and pruritus with urticaria that were controlled with intravenous (i.v.) corticosteroids. Prophylactic i.v. administration of antihistamines was occasionally used to prevent these symptoms. In the investigation no deficiency of IgA was detected, while elevated serum level of IgE was observed. During the treatment of a joint bleed event with pdFVIII concentrate, (Octavi SD Optimum[®], Octapharma, France) he developed a severe allergic reaction, with urticaria, laryngeal edema, and

bronchospasm. The symptoms resolved with i.v. corticosteroids. Plasma samples were collected and analyzed 3 hours, 15 days, and 25 days after the allergic reaction, and were compared to samples collected 6 months previous the event. Anti-pdFVIII IgG4 was detected in the samples collected at the same day of the allergic reaction with peak titer after 15 days. Interestingly, anti-pdFVIII IgE was also detected in the same samples. However, no IgE was observed when ELISA plates were coated with rFVIII, and low titer of IgG4 was detected in these analyses, although inhibitor remained negative during the whole period (Fig. 1A).

Patient 2

The second case was a 35 years-old man, with severe hemophilia A (FVIII < 1 IU/dL), and history of hepatitis C, and hemophilic arthropathy. Ten years before, he developed allergic reactions to pdFVIII concentrate, characterized by fever and chills. In that occasion inhibitor was detected for the first time, with peak titer of 160 BU. He started to receive activated prothrombin complex concentrate (aPCC) showing similar symptoms of allergic reaction, controlled with i.v. corticosteroids, and prevented with prophylactic i.v. administration of antihistamines. No evidence of IgA deficiency or clinical manifestations of atopic diseases were observed, despite high level of serum IgE. Plasma samples were collected when he presented allergic symptoms after he received aPCC for the treatment of a hemarthrosis, and were compared with plasma samples collected after fourteen months without recent exposure to plasma-derived concentrates. The analyses in those two occasions showed that anti-FVIII IgG1 and IgG4 were observed when

the ELISA plates were coated with both pdFVIII and rFVIII (Fig. 1B). Anti-FVIII IgE was negative in these analyses.

Patient 3

The third one was a 5 years-old boy with moderate hemophilia A (FVIII 4.6 IU/dL), with history of atopy, manifested as allergic rhinitis and asthma, with high serum level of IgE. One year before, during the treatment of a mild hematoma with pdFVIII, he developed urticarial reaction associated with bronchospasm, fever and facial angioedema controlled with i.v. corticosteroids. Less intense allergic reactions had already been observed upon use of pdFVIII. These allergic manifestations disappeared after switching to recombinant FVIII concentrate. Inhibitor was never detected and IgA deficiency was excluded. Plasma samples were collected 48 hours after a severe allergic reaction with the use of plasma-derived product and four months later. No anti-FVIII immunoglobulin was detected in the samples first collected, and only low titer of anti-pdFVIII IgG1 was observed in the samples collected four months after the reaction (Fig. 1C).

Discussion

Allergic reactions with the use of FVIII-containing products are not frequently observed [5]. In the past fifteen years we followed more than three hundred hemophilia A patients, that had received only pdFVIII products during this period. In this cohort we observed an occurrence of allergic reactions in 0.9% of these patients.

The use of rFVIII products can be an alternative for most of the cases in whom the allergic manifestation is related to other proteins present in plasma-derived products. However, in the case of FVIII driven allergic reaction the use of rFVIII products will not be the best choice, and in fact, this can intensify the reaction. Kadar et al., described a case report with anaphylactic reaction after the administration of rFVIII, and proved for the first time that it was mediated by anti-FVIII IgE [11].

In this study, the patient 3, with personal and family history of atopy, had no longer allergic symptoms after switching to rFVIII. Indeed, the in vitro analyses showed no specificity to either pdFVIII or rFVIII.

The patient 2 with high-responding inhibitor history developed allergic reaction to both pdFVIII and aPCC. The ELISA results demonstrated the presence of anti-rFVIII IgG1 and IgG4, and anti-pdFVIII IgG4. No anti-FVIII IgE was detected. This immunoglobulin profile can be associated only with the presence of inhibitor and it does not necessarily explain the allergic manifestations. This patient was never exposed to rFVIII concentrate due to the presence of inhibitor and the shortage of this type of product at that time in our country. However, based on these analyses, we believe that the use of rFVIII concentrate will be an alternative for an immune tolerance induction treatment for him.

Patient 1 was the only one in whom we observed the type I hypersensitivity reaction mediated by IgE isotype directed to pdFVIII. However the IgE was negative when the ELISA was performed with rFVIII, proving that there is no specificity to FVIII, and the reaction was probably triggered by other proteins present in the pdFVIII concentrate.

In conclusion, in our cohort of hemophilia A patient the incidence of allergic reaction to pdFVIII products was lower than 1%. The in vitro evaluation performed in samples from the three patients with these events, was not able to demonstrate that the allergic manifestation was directed to FVIII. Thus, apart from the limitations when inhibitor is present, the use of rFVIII concentrate can be a choice for this kind of complication.

Authorship

Contribution: S.A.L.M. designed the study, performed the assays, collected and analyzed the data, and wrote the manuscript; A.C.T. and L.H.S. performed the assays, A.L.A.S. collected the data; S.S.M., analyzed the data, and reviewed the manuscript; and M.C.O. designed the study, collected the data, and critically revised and approved the final version of the manuscript.

Disclosures

The authors received funding support from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The authors stated that they had no interests that which be perceived as posing a conflict or bias.

References

1. Recht, M., et al., *A retrospective study to describe the incidence of moderate to severe allergic reactions to factor IX in subjects with haemophilia B*. Haemophilia, 2011. **17**(3): p. 494-9.

2. Ahrons, S., et al., *Severe reactions after cryoprecipitated human factor VIII*. Vox Sang, 1970. **18**(2): p. 182-4.
3. Pernod, G., et al., *Anaphylaxis following the use of a plasma-derived immunopurified monoclate-P, and the recombinant Recombinate and Kogenate factor VIII: a therapeutic challenge*. Haemophilia, 1999. **5**(2): p. 143-4.
4. Shopnick, R.I., et al., *Anaphylaxis after treatment with recombinant factor VIII*. Transfusion, 1996. **36**(4): p. 358-61.
5. Jadhav, M. and I. Warrier, *Anaphylaxis in patients with hemophilia*. Semin Thromb Hemost, 2000. **26**(2): p. 205-8.
6. Tsuchiya, H., M. Shima, and A. Yoshioka, *Anaphylactic response to factor VIII preparations in a haemophilic child with an inhibitor of high titre during the tolerance induction*. Eur J Pediatr, 1998. **157**(1): p. 85.
7. Shakib, F. and D.R. Stanworth, *IgG4: a possible mediator of anaphylaxis in a haemophiliac patient*. Clin Allergy, 1979. **9**(6): p. 597-603.
8. Whelan, S.F., et al., *Distinct characteristics of antibody responses against factor VIII in healthy individuals and in different cohorts of hemophilia A patients*. Blood, 2013. **121**(6): p. 1039-48.
9. Lindgren, A., H. Wadenvik, and L. Tengborn, *Characterization of inhibitors to FVIII with an ELISA in congenital and acquired haemophilia A*. Haemophilia, 2002. **8**(5): p. 644-8.
10. Simons, F.E., *Anaphylaxis*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S161-81.
11. Kadar, J.G., J. Schuster, and N. Hunzelmann, *IgE-mediated anaphylactic reaction to purified and recombinant factor VIII in a patient with severe haemophilia A*. Haemophilia, 2007. **13**(1): p. 104-5.
12. Verbruggen, B., et al., *The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability*. Thromb Haemost, 1995. **73**(2): p. 247-51.

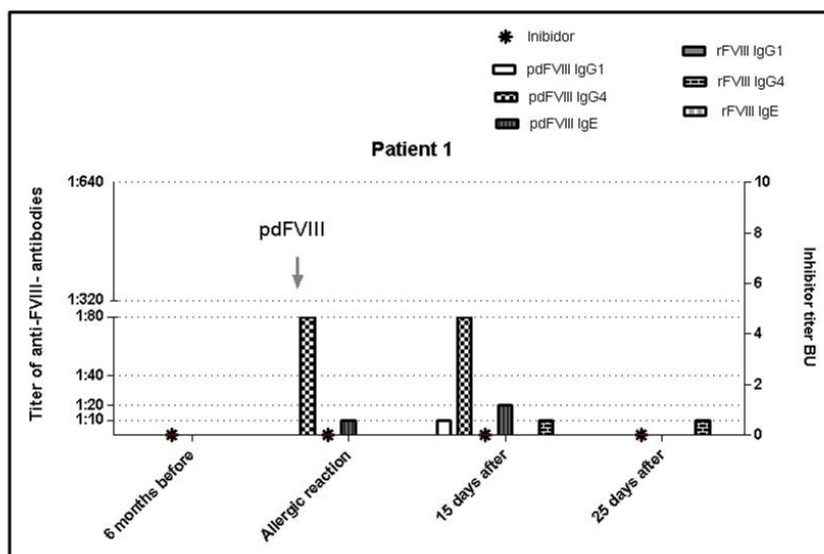
Figure 1. Longitudinal assessment of anti-FVIII specific antibodies and inhibitor titers of each patient. A. Patient 1. Plasma samples were collected 6 months before the allergic reaction, and 3 hours, 15 days, and 25 days later. **B. Patient 2.** Plasma samples were collected the day of allergic symptoms, and fourteen months later. **C. Patient 3.** Plasma samples were collected 48 hours after a severe allergic reaction and four months later. Samples from all time points were tested for inhibitor and anti-pdFVIII and anti-rFVIII IgG1, IgG4, and IgE.

Table 1. Clinical and laboratory findings of three cases with allergic reaction to pdFVIII concentrates

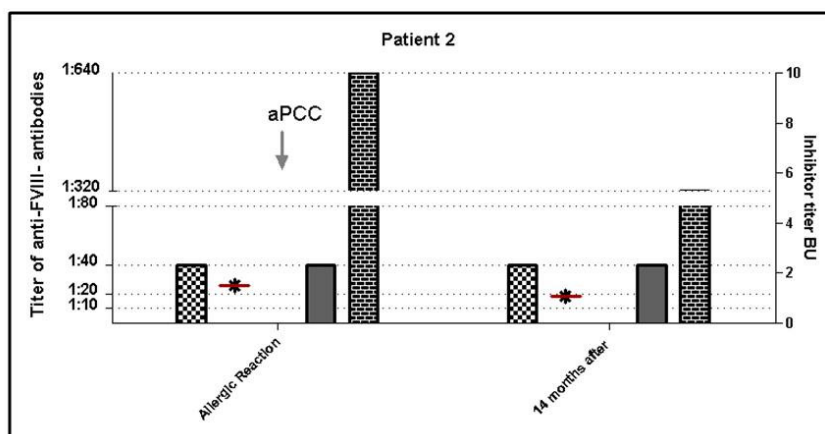
	Patient 1	Patient 2	Patient 3
Age at enrollment	46y	35y	5y
Race	Black	Caucasian	Black
Diagnosis	Severe HA	Severe HA	Moderate HA
FVIII genotype	ND	p.Q1659Stop	ND
Inhibitor history	No	High-responding	No
Comorbidities	HCV and chronic arthropathy	HCV and chronic arthropathy	None
Type of products related to allergic reactions	Several pdFVIII	Several pdFVIII and aPCC	Several pdFVIII
Atopic history	No	No	Yes
Family allergy history	No	No	Yes
Serum IgE level, IU/mL	1,430 (NR < 100 IU/mL)	6,430 (NR < 100 IU/mL)	3,560 (NR < 90 IU/mL)
IgA deficiency	No	No	No

HA, hemophilia A; ND, not determined; HCV, hepatitis C virus; pdFVIII, plasma-derived factor VIII concentrate; aPCC, activated prothrombin complex concentrate; NR, normal range according to the age.

A



B



C

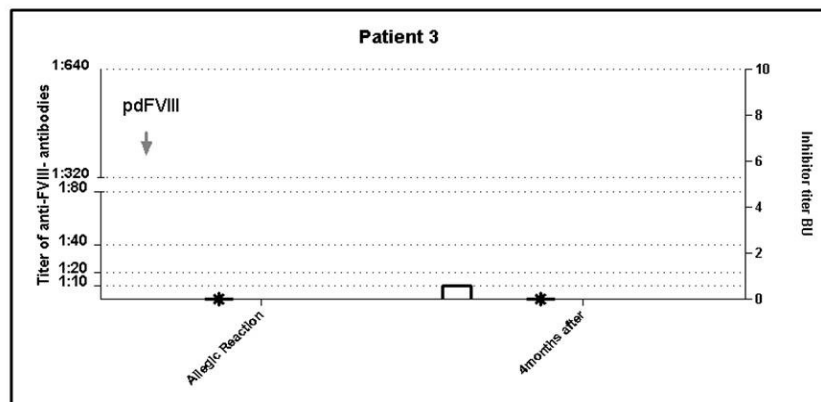


Figure 1.

5-DISSCUSSÃO GERAL

5. Discussão Geral

O desenvolvimento dos inibidores e reação alérgica a produtos utilizados na terapia de reposição do FVIII, são complicações de grande relevância clínica na hemofilia A. A avaliação da resposta imune humoral através da identificação do perfil das imunoglobulinas, pode auxiliar na compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos na reação de hipersensibilidade e no surgimento dos inibidores, possibilitando o desenvolvimento de novas estratégias para a dessensibilização aos produtos contendo FVIII e na indução da tolerância imune.

No primeiro capítulo deste trabalho, o perfil das imunoglobulinas envolvidas com o desenvolvimento dos inibidores foi caracterizado, principalmente com a presença da subclasse de imunoglobulina IgG4, a qual estava correlacionada principalmente com os inibidores de alto título. Por outro lado, a subclasse IgG1 estava presente em amostras de pacientes que apresentavam baixo e alto títulos de anticorpos inibitórios anti-FVIII. A avaliação destas imunoglobulinas foi realizada inicialmente de maneira transversal, ou seja, em uma única amostra que demonstrava a condição clínica do paciente naquele momento.

Contudo, um dos resultados mais interessantes do primeiro capítulo, foi observar que os pacientes classificados como alto respondedores, mas que no momento da análise estavam com baixo título de inibidor, apresentaram apenas a presença da subclasse IgG1. Este resultado demonstrou que poderia haver uma modulação de resposta entre as subclasses de IgG dependente do contexto clínico do paciente, e desta forma a análise longitudinal poderia fornecer respostas mais consistentes.

Na literatura, alguns trabalhos, mesmo com limitado número de pacientes, demonstraram aspectos importantes do perfil das imunoglobulinas no contexto dos anticorpos anti-FVIII. Em relação aos aspectos metodológicos para estas análises, é importante destacar que tanto as avaliações iniciais realizadas com a técnica imunoblotting, quanto as realizadas por ELISA, evidenciaram em sua maioria o mesmo perfil de resultados quanto a presença de IgG1 e IgG4 anti-FVIII [3, 29, 30, 59].

Recentemente, um estudo de um grupo norte americano, demonstrou que indivíduos saudáveis apresentam reatividade de imunoglobulinas IgG1, IgG2, IgG3 e IgM para a proteína do FVIII, no entanto a subclasse IgG4 foi ausente para estes indivíduos, estando presente em pacientes com altos títulos de inibidor [29]. Neste contexto, este estudo confirma os nossos dados quanto ao papel da subclasse de IgG4.

No entanto, diferentemente deste e dos demais estudos, nossos resultados demonstraram que a IgG4 quando avaliada em pacientes classificados como alto respondedores, relaciona-se na maior parte das análises apenas com as amostras coletadas quando há altos títulos de inibidor. Além disso, este é o primeiro estudo que apresenta informações em uma análise longitudinal de pacientes com hemofilia A que possuem inibidores em relação ao perfil das imunoglobulinas. Os resultados demonstraram que a IgG4 é a única subclasse correlacionada ao aumento ou ressurgimento dos títulos de inibidor, quando o paciente é desafiado produtos que contenham FVIII.

Embora a IgG1 esteja presente em algumas análises, não foi observado a modulação desta imunoglobulina junto ao inibidor. Na maior parte das análises longitudinais, a IgG1 está presente apenas na presença de baixos títulos de inibidor.

Para melhor entender os achados do capítulo I, no segundo capítulo nossa proposta foi avaliar o comportamento do perfil das imunoglobulinas na avaliação longitudinal de pacientes com hemofilia durante a realização do protocolo de ITI. Nesse contexto, foi possível verificar que no mecanismo de indução de tolerância ao FVIII, a IgG4 também é a subclasse de imunoglobulina que desaparece quando ocorre a queda dos títulos do inibidor. Além disso, o paciente que apresentou resposta parcial durante o protocolo de ITI, ou seja, que apresentou negatificação do inibidor, mas manteve a avaliação dos parâmetros farmacocinéticos inadequados, apresentou constante presença de IgG4.

Este dado corrobora com um estudo que mostrou que pacientes que falharam ao protocolo de ITI apresentavam a presença marcante de IgG4 ao final do protocolo [31]. Na tentativa de confirmar os dados da IgG4, nós também analisamos na mesma amostra o perfil de interleucinas pro- e anti-

inflamatórias/regulatórias. Foi possível observar, que a diminuição dos marcadores anti-inflamatórios, com queda da IL-4 e IL-6 em conjunto ao decaimento dos títulos de IgG4. A observação destes dados confirma um mecanismo já conhecido em que o ambiente de interleucinas anti-inflamatórias sinalizadas pelas células T CD4+, induz a produção de IgG4 pelas células B, caracterizando uma resposta imune do tipo Th2 [67].

Na hemofilia, há um único estudo que demonstrou aumento do perfil anti-inflamatório, quando amostras de pacientes hemofílicos com inibidor foram avaliados *in vitro* após estímulo com a proteína do FVIII [57]. Em contraste, recentemente foi demonstrado em plasma de pacientes hemofílicos com inibidor que o nível de interleucinais anti-inflamatórias é diminuído quando comparado a pacientes que não apresentam inibidores ou em amostras de indivíduos saudáveis [58]. No entanto, estes pacientes com hemofilia não foram estimulados com a proteína do FVIII conforme realizado no estudo anterior.

Ainda no contexto da imunotolerância, não foi observado um papel relevante da IgG1 na modulação do inibidor [3, 29]. Contudo, curiosamente nossos resultados evidenciaram uma nova informação quanto ao padrão de resposta obtido após a tolerância ao FVIII. Pacientes que apresentaram resposta completa ao protocolo de ITI, ou seja, inibidor negativo e adequado parâmetro farmacocinético, apresentaram apenas a presença de IgG1, e em alguns casos o surgimento desta suclasse de imunoglobulina. Além disso, observou-se que no momento em que ocorreu a queda do título da IgG4, houve simultaneamente queda da IL-4 e IL-6 e aumento significativo de TNF- α . Esta observação sugere um padrão de resposta pró-inflamatória compensatória, uma vez que há presença de IgG1 e aumento de TNF- α em momentos onde o título do inibidor é baixo ou ausente.

Para corroborar com estes achados, estudos em modelo animal com uso de anti-CD3 (anti- receptor de células T) em camundongos FVIII-KO, demonstrou que os animais que se tornaram tolerantes ao FVIII, apresentaram aumento de interleucinas pró-inflamatórias [60]. Além disso, um estudo clínico com uma avaliação transversal das imunoglobulinas em pacientes que foram submetidos ao

protocolo de ITI, demonstrou que pacientes com baixos títulos de inibidor também se correlacionavam com a presença isolada de IgG1 [31].

As imunoglobulinas da subclasse IgG4 apresentam várias características que são pouco compreendidas. Quando comparadas às outros subtipos esta é a menos presente com valores entre 0,8 a 11,7% do total de IgG. A subclasse proporcionalmente mais abundante é a IgG1, que compreende entre 43 a 75% das IgG. Além disso, a IgG4 apresenta baixa capacidade de interação com receptores celulares, e portanto, baixa capacidade de ativação de complemento. No entanto, apesar das poucas informações do papel da IgG4, novas descobertas a respeito desta imunoglobulina mostraram que esta subclasse é um anticorpo muito dinâmico, e que diferente do que se acreditava, não é uma imunoglobulina monovalente e sim heterobivalente. Isso significa que este anticorpo é capaz de se ligar a dois antígenos diferentes [68].

O desenvolvimento de uma imunoglobulina heterobivalente está envolvido em um processo chamado troca de braço Fab, isto é, a capacidade de troca da IgG4 entre cadeia leve e pesada. Isto resulta geralmente em um anticorpo assimétrico com dois sítios de combinação com antígenos diferentes [68]. Ainda não há muitas informações quanto a estes achados, mas o que podemos observar, é que as informações sobre o papel da IgG4 ainda é limitado.

Quanto a produção da subclasse IgG4, os requisitos para a mudança de classe desta imunoglobulina em células B são semelhantes ao que ocorre para a imunoglobulina IgE. Ambas dependem IL-4 e IL-13 [67, 69, 70], portanto, são considerados como parte da resposta imune do tipo Th2. Uma célula B, dependendo dos estímulos recebidos pode trocar a produção de imunoglobulina IgG4 para IgE, e esta troca é sequencial, ou seja, o contrário não acontece. Isto é uma consequência da ordem da sequência na qual os genes para os isotipos são dispostos no cromossomo [58-60].

Um dos efeitos desta dependência comum da IgG4 e IgE do tipo de resposta Th2, é que os antígenos que induzem respostas IgE, normalmente alérgenos, são também bons indutores de resposta IgG4. Possivelmente há algumas diferenças regulatórias antes da mudança de classe de imunoglobulinas, pois, a ocorrência de imunoglobulinas IgG4 com ausência do isotipo de imunoglobulina IgE não é

incomum, chamada de resposta Th2 modificada, sendo este o caso de pacientes portadores de hemofilia que desenvolvem inibidores.

A IL-10 é provavelmente a interleucina que está associada à esta regulação, uma vez que há evidências que a IL-10 interfere na mudança de classe da IgE e IgG4, bem como na produção destas imunoglobulinas. Além disso, a IL-10 é provavelmente necessárias para conduzir a diferenciação de célula B secretora de IgG4 [71, 72]. Alguns estudos também apontam a IL-21 como responsável em aumentar a produção *in vitro* de IgG4 [73]. Interessantemente, sabemos que alguns polimorfismos no gene da IL-10 estão associados a pacientes que desenvolveram inibidores contra o FVIII.

Como mencionado anteriormente, a IgG4 não apresenta boa capacidade de se relacionar com receptores celulares e não apresenta boa capacidade de formar imunocomplexos, assim, geralmente é considerada um anticorpo não patogênico. No entanto, recentemente alguns grupos de doenças têm evidenciado uma relação entre o aumento dos níveis de IgG4 com a sua etiologia, como na doença autoimune pênfigo foliáceo, ou como, consequência, que é o caso da pancreatite autoimune.

O pênfigo foliáceo, também chamado “fogo selvagem”, é uma dermatose autoimune bolhosa, caracterizada pelo aparecimento de bolhas intraepidérmicas, que aparecem primeiro nas membranas mucosas da boca, vagina e pênis, ou na pele do tórax, rosto e couro cabeludo, mas que depois se espalham pelo corpo todo. Alguns estudos têm demonstrado que anticorpos IgG4, purificados de pacientes que apresentam pênfigo foliáceo mostrou ser patogênico em camundongos, e também mostrou induzir separação dermo-epidérmica em modelo *ex-vivo* [74, 75].

A pancreatite auto-imune (PAI) é um tipo de pancreatite crônica caracterizada, histologicamente, por um infiltrado linfoplasmocitário e fibrose periductal. O PAI pode estar associada a outras doenças autoimunes e o diagnóstico tem por base a associação de características histológicas e radiológicas à elevação da IgG4 junto à resposta ao tratamento com corticóides. A expansão de células secretoras de IgG4 pode ser tão intensa que este aumento pode chegar em até 10 vezes o valor basal. A patogênese destas doenças ainda é

uma questão não esclarecida. No entanto, tendo em vista os efeitos da IgG4, que é promotora de citocinas anti-inflamatórias, na pancreatite autoimune é possível assumir que algum gatilho inicial ativa um processo fibrótico, incluindo o aumento da produção de TGF- β e IL-10 [56]. Estas citocinas possivelmente levam a um ambiente local que atrai as células B produtoras de IgG4.

Interessantemente, alguns estudos da pancreatite autoimune mostraram que uma das características da doença é a ativação de células T reguladoras (Treg), indicado por uma maior expressão do fator de transcrição FOXP3 nos tecidos analisados, bem como infiltrados de células CD4⁺ CD25⁺ em locais afetados [56]. Desta forma, estes resultados suportam uma associação de IgG4 com a ativação de células Treg. Na hemofilia esta relação ainda não foi investigada.

Conforme mencionado anteriormente, a produção de IgG4 e IgE são dependentes da mesma sinalização de interleucinas, IL4 e IL13. Muitas situações em doenças alérgicas, demonstram que alguns destes indutores de resposta IgE, são bons indutores de IgG4. Na hemofilia, a relação destas imunoglobulinas, quanto a relação inibidor e reação de hipersensibilidade é desconhecida, no entanto, é possível que exista relação entre estas condições clínicas.

Por outro lado é importante observar que mesmo sendo a ocorrência de inibidor em pacientes com hemofilia A próxima a 25%, raramente são reportados quadros de reação alérgica nesses casos e como na avaliação apresentada nesse estudo, nossa incidência foi de apenas 0,9% e o quadro de reação alérgica não estava direcionada a proteína FVIII nos três casos de hemofilia A que apresentaram essa complicação. De fato em nosso estudo de reação alérgica (capítulo III), apenas um paciente apresentou reatividade de IgE anti-pdFVIII, sustentada depois de 15 e 25 dias, mas IgE foi negativa para anti-rFVIII. Isso sugere que a reação alérgica que o paciente desenvolveu não foi específica ao FVIII, e sim a outro componente presente na formulação do concentrado de pdFVIII.

A reação alérgica em hemofilia A, embora seja um evento raro, tem uma relevância clínica importante, podendo evoluir com choque anafilático e edema de glote, cujo risco é ainda maior, levando-se em conta que normalmente o concentrado de fator é administrado em ambiente ambulatorial, ou até mesmo

domiciliar. Na hemofilia B a reação alérgica com posterior desenvolvimento de inibidor já é estabelecida [41]. Já na hemofilia A quando comparado à hemofilia B, há poucos registros e informações e neste contexto essa é a primeira vez que a incidência dessa complicação é reportada. Além disso, o surgimento de reação alérgica na hemofilia A não está vinculado ao desenvolvimento de inibidor [42].

Há poucas informações na literatura sobre os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento de reação alérgica em hemofilia A, em sua maioria observa-se apenas relatos de casos. No entanto, dois estudos avaliaram o envolvimento de imunoglobulinas nesta situação, sendo inicialmente a IgG4 e IgG2 mencionadas como responsáveis por este mecanismo [42, 66]. Na verdade, reações de hipersensibilidade a drogas são classicamente classificadas em quatro tipos. Entre os quatro tipos, o mecanismo mais prevalente envolve a presença da IgE. No entanto, na hemofilia há apenas um único estudo que demonstrou que a IgE e IgG estavam presentes em um quadro de reação alérgica específica ao FVIII, tendo sido exacerbada quando o paciente foi exposto a concentrado recombinante de FVIII [40].

No início do tratamento da hemofilia quando os únicos produtos disponíveis eram hemocomponentes, como o sangue total, plasma fresco congelado ou crioprecipitado, ou mesmo hemoderivados de baixa pureza, as reações alérgicas eram bastante frequentes. Com a substituição destes produtos por concentrados mais puros estas reações passaram a ser pouco frequentes, provavelmente devido à ausência de uma reação específica ao fator. No entanto, estas reações ainda ocorrem e embora haja na literatura a demonstração de reações alérgicas específica a proteína do FVIII, em nosso estudo a reação observada veiculada pela IgE, claramente não foi específica ao FVIII. Este é o primeiro estudo que demonstrou uma reação alérgica mediada por IgE a produto derivado plasmático, onde não houve especificidade ao FVIII.

No contexto de alergia, anticorpos do tipo IgG4 são intrigantes por causa de sua associação ambígua com os sintomas alérgicos. A associação de imunoglobulinas com a sintomatologia de alergia reflete, em grande parte, reposta imune mediada por IgE. No entanto, como já mencionado, antígenos que induzem anticorpos IgE são bons indutores de IgG4 anticorpos. Mesmo que haja a

presença de IgG4 em pacientes que apresentam sintomatologia de reação alérgica, com pouca ou nenhuma presença de IgE específica, não há nenhuma evidência de que os seus sintomas são causados por anticorpos do tipo IgG4. Além disso, não há nenhum mecanismo plausível que levaria à ativação de mastócitos ou basófilos por interação da IgG4 alérgeno-específica. As tentativas para sensibilizar basófilos humanos com IgG4 induzida por antígeno com liberação de histamina, não foram eficazes [76].

6-CONCLUSÃO GERAL

6. Conclusão Geral

A avaliação da resposta imune humoral em pacientes com hemofilia A relacionada ao desenvolvimento de inibidores e na ocorrência de reação alérgica, reportada nos três estudos apresentados, demonstrou que:

- 1) Na avaliação transversal de pacientes com hemofilia A e inibidor, foi possível evidenciar a correlação da presença da subclasse IgG4, apenas quando os pacientes apresentavam altos títulos de inibidor (> 5 UB). Quando o título do inibidor era baixo (< 5 BU), a IgG4 estava ausente ou era apenas minimamente reativa, mesmo entre os pacientes alto respondedores com baixos títulos de inibidor no momento da avaliação. Essa tendência foi mantida na avaliação longitudinal desses pacientes. Portanto, o perfil das imunoglobulinas envolvidas com o desenvolvimento dos inibidores está relacionado principalmente com a presença da subclasse IgG4.
- 2) A subclasse IgG1 pode estar presente tanto em pacientes com inibidor de baixo, ou com alto título e não mostra correlação direta constante com o tipo ou título de inibidor.
- 3) Na avaliação longitudinal de pacientes com hemofilia A e inibidores submetidos ao protocolo de ITI, foi possível observar que novamente a presença da IgG4 estava diretamente correlacionada com a presença de inibidor, evoluindo com queda ou desaparecimento, a medida que os critérios para tolerância imune eram atingidos.
- 4) Ao analisar o padrão das citocinas durante a avaliação longitudinal da ITI, foi observado que à medida que os títulos do inibidor diminuía, havia uma queda no título da IgG4, acompanhada da redução das citocinas pró-inflamatórias (IL-4 e IL-6) e aumento das citocinas anti-inflamatórias (TNF- α). Portanto, progressivamente há perda da resposta imune tipo Th2 à medida que o inibidor diminui seu título e o paciente torna-se tolerante ao FVIII.

- 5) O levantamento retrospectivo da ocorrência de reação alérgica em pacientes com hemofilia A associada ao uso de concentrado de pdFVIII em nosso serviço, mostrou uma baixa incidência (0,9%) desta complicação entre os 322 pacientes atendidos nos últimos quinze anos.
- 6) Embora a forma mais comum de reação alérgica por droga seja do tipo de hiperssensibilidade imediata, com a participação da IgE, entre os três casos com reação alérgica aos concentrados de fatores derivados de plasma que foram identificados, apenas um caso apresentou presença de IgE anti-pdFVIII, sendo que a IgE foi negativa quando testado ao rFVIII. Isso sugere que a reação alérgica que o paciente desenvolveu não foi específica ao FVIII, e sim a outro componente presente na formulação do concentrado de pdFVIII.

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7- Referências Bibliográficas

1. Bolton-Maggs, P.H. and K.J. Pasi, *Haemophilias A and B*. Lancet, 2003. **361**(9371): p. 1801-9.
2. Astermark, J., S. Lacroix-Desmazes, and M.T. Reding, *Inhibitor development*. Haemophilia, 2008. **14 Suppl 3**: p. 36-42.
3. Lindgren, A., H. Wadenvik, and L. Tengborn, *Characterization of inhibitors to FVIII with an ELISA in congenital and acquired haemophilia A*. Haemophilia, 2002. **8**(5): p. 644-8.
4. Wight, J. and S. Paisley, *The epidemiology of inhibitors in haemophilia A: a systematic review*. Haemophilia, 2003. **9**(4): p. 418-35.
5. Verbruggen, B., et al., *The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability*. Thromb Haemost, 1995. **73**(2): p. 247-51.
6. Hedner, U., *Recombinant factor VIIa (Novoseven) as a hemostatic agent*. Semin Hematol, 2001. **38**(4 Suppl 12): p. 43-7.
7. DiMichele, D.M., et al., *International workshop on immune tolerance induction: consensus recommendations*. Haemophilia, 2007. **13 Suppl 1**: p. 1-22.
8. Coppola, A., et al., *Understanding inhibitor development in haemophilia A: towards clinical prediction and prevention strategies*. Haemophilia, 2010. **16 Suppl 1**: p. 13-9.
9. Viel, K.R., et al., *Inhibitors of factor VIII in black patients with hemophilia*. N Engl J Med, 2009. **360**(16): p. 1618-27.
10. Santos, A., J.M. Annichino-Bizzacchi, and M.C. Ozelo, *Inhibitors of factor VIII in hemophilia*. N Engl J Med, 2009. **361**(3): p. 309-10; author reply 310.
11. Astermark, J., et al., *Polymorphisms in the IL10 but not in the IL1beta and IL4 genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A*. Blood, 2006. **107**(8): p. 3167-72.
12. Pavlova, A., et al., *Impact of polymorphisms of the major histocompatibility complex class II, interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha and cytotoxic T-*

lymphocyte antigen-4 genes on inhibitor development in severe hemophilia A. J Thromb Haemost, 2009. **7**(12): p. 2006-2015.

13. Amano, K., et al., *The molecular basis for cross-reacting material-positive hemophilia A due to missense mutations within the A2-domain of factor VIII.* Blood, 1998. **91**(2): p. 538-48.
14. Madoiwa, S., et al., *Induction of factor VIII-specific unresponsiveness by intrathymic factor VIII injection in murine hemophilia A.* J Thromb Haemost, 2009. **7**(5): p. 811-24.
15. Krudysz-Amblo, J., et al., *Quantitation of anti-factor VIII antibodies in human plasma.* Blood, 2009. **113**(11): p. 2587-94.
16. van Schooten, C.J., et al., *Macrophages contribute to the cellular uptake of von Willebrand factor and factor VIII in vivo.* Blood, 2008. **112**(5): p. 1704-12.
17. Stern, L.J., et al., *Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide.* Nature, 1994. **368**(6468): p. 215-21.
18. Davis, S.J., et al., *The nature of molecular recognition by T cells.* Nat Immunol, 2003. **4**(3): p. 217-24.
19. Qadura, M., et al., *Recombinant and plasma-derived factor VIII products induce distinct splenic cytokine microenvironments in hemophilia A mice.* Blood, 2009. **114**(4): p. 871-80.
20. Slifka, M.K., et al., *Humoral immunity due to long-lived plasma cells.* Immunity, 1998. **8**(3): p. 363-72.
21. Hausl, C., et al., *Long-term persistence of anti-factor VIII antibody-secreting cells in hemophilic mice after treatment with human factor VIII.* Thromb Haemost, 2002. **87**(5): p. 840-5.
22. Goodnow, C.C., et al., *Control systems and decision making for antibody production.* Nat Immunol, 2010. **11**(8): p. 681-8.
23. Crotty, S., R.J. Johnston, and S.P. Schoenberger, *Effectors and memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation.* Nat Immunol, 2010. **11**(2): p. 114-20.

24. Neuberger, M.S., *Antibody diversification by somatic mutation: from Burnet onwards*. Immunol Cell Biol, 2008. **86**(2): p. 124-32.
25. Peled, J.U., et al., *The biochemistry of somatic hypermutation*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 481-511.
26. Cogne, M., *[Humoral immunity. B lymphocytes; immunoglobulins (structure, diversity, function); clinical practice investigations; concept of humoral immunity deficiency]*. Rev Prat, 2001. **51**(2): p. 193-202.
27. Schroeder, H.W., Jr. and L. Cavacini, *Structure and function of immunoglobulins*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S41-52.
28. Gilles, J.G., et al., *Anti-factor VIII antibodies of hemophiliac patients are frequently directed towards nonfunctional determinants and do not exhibit isotypic restriction*. Blood, 1993. **82**(8): p. 2452-61.
29. Whelan, S.F., et al., *Distinct characteristics of antibody responses against factor VIII in healthy individuals and in different cohorts of hemophilia A patients*. Blood, 2013. **121**(6): p. 1039-48.
30. Fulcher, C.A., S. de Graaf Mahoney, and T.S. Zimmerman, *FVIII inhibitor IgG subclass and FVIII polypeptide specificity determined by immunoblotting*. Blood, 1987. **69**(5): p. 1475-80.
31. van Helden, P.M., et al., *IgG subclasses of anti-FVIII antibodies during immune tolerance induction in patients with hemophilia A*. Br J Haematol, 2008. **142**(4): p. 644-52.
32. Mariani, G., B. Kroner, and G. Immune Tolerance Study, *Immune tolerance in hemophilia with factor VIII inhibitors: predictors of success*. Haematologica, 2001. **86**(11): p. 1186-93.
33. Dimichele, D., *The North American Immune Tolerance Registry: contributions to the thirty-year experience with immune tolerance therapy*. Haemophilia, 2009. **15**(1): p. 320-8.
34. Lenk, H. and I.T.T.S. Group, *The German Registry of immune tolerance treatment in hemophilia--1999 update*. Haematologica, 2000. **85**(10 Suppl): p. 45-7.
35. Kreuz, W., *The role of VWF for the success of immune tolerance induction*. Thromb Res, 2008. **122 Suppl 2**: p. S7-S12.

36. Mauser-Bunschoten, E.P., et al., *Low-dose immune tolerance induction in hemophilia A patients with inhibitors*. Blood, 1995. **86**(3): p. 983-8.
37. Simons, F.E., *Anaphylaxis*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S161-81.
38. Peavy, R.D. and D.D. Metcalfe, *Understanding the mechanisms of anaphylaxis*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2008. **8**(4): p. 310-5.
39. Mayorga, C., et al., *In vitro diagnosis of immediate allergic reactions to drugs: an update*. J Investig Allergol Clin Immunol, 2010. **20**(2): p. 103-9.
40. Kadar, J.G., J. Schuster, and N. Hunzelmann, *IgE-mediated anaphylactic reaction to purified and recombinant factor VIII in a patient with severe haemophilia A*. Haemophilia, 2007. **13**(1): p. 104-5.
41. Sawamoto, Y., et al., *Measurement of anti-factor IX IgG subclasses in haemophilia B patients who developed inhibitors with episodes of allergic reactions to factor IX concentrates*. Thromb Res, 1996. **83**(4): p. 279-86.
42. Jadhav, M. and I. Warrier, *Anaphylaxis in patients with hemophilia*. Semin Thromb Hemost, 2000. **26**(2): p. 205-8.
43. Thorland, E.C., et al., *Anaphylactic response to factor IX replacement therapy in haemophilia B patients: complete gene deletions confer the highest risk*. Haemophilia, 1999. **5**(2): p. 101-5.
44. Cao, O., P.A. Loduca, and R.W. Herzog, *Role of regulatory T cells in tolerance to coagulation factors*. J Thromb Haemost, 2009. **7** Suppl 1: p. 88-91.
45. Waters, B. and D. Lillicrap, *The molecular mechanisms of immunomodulation and tolerance induction to factor VIII*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(9): p. 1446-56.
46. Ahrons, S., et al., *Severe reactions after cryoprecipitated human factor VIII*. Vox Sang, 1970. **18**(2): p. 182-4.
47. Rezende, S.M., B.D. Pimentel, and J.P. Araujo, *Knocking down the price of factor concentrates in Brazil*. Haemophilia, 2005. **11**(3): p. 290-1.
48. *Abstracts of the XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. June 29-July 4, 2013. Amsterdam, The Netherlands*. J Thromb Haemost, 2013. **11** Suppl 2: p. 1-1322.

49. Darby, S.C., et al., *The incidence of factor VIII and factor IX inhibitors in the hemophilia population of the UK and their effect on subsequent mortality, 1977-99*. J Thromb Haemost, 2004. **2**(7): p. 1047-54.
50. Reding, M.T., *Immunological aspects of inhibitor development*. Haemophilia, 2006. **12 Suppl 6**: p. 30-5; discussion 35-6.
51. Vincent, A.M., et al., *Non-neutralizing anti-FVIII antibodies: different binding specificity to different recombinant FVIII concentrates*. Haemophilia, 2009. **15**(1): p. 374-6.
52. Abbas, A.K., K.M. Murphy, and A. Sher, *Functional diversity of helper T lymphocytes*. Nature, 1996. **383**(6603): p. 787-93.
53. Verbruggen, B., W.L. van Heerde, and B.A. Laros-van Gorkom, *Improvements in factor VIII inhibitor detection: From Bethesda to Nijmegen*. Semin Thromb Hemost, 2009. **35**(8): p. 752-9.
54. Kitchen, S., et al., *Interlaboratory variation in factor VIII:C inhibitor assay results is sufficient to influence patient management: data from the UK national quality external assessment scheme for blood coagulation*. Semin Thromb Hemost, 2009. **35**(8): p. 778-85.
55. Aalberse, R.C., et al., *Immunoglobulin G4: an odd antibody*. Clin Exp Allergy, 2009. **39**(4): p. 469-77.
56. Zen, Y., et al., *Th2 and regulatory immune reactions are increased in immunoglobulin G4-related sclerosing pancreatitis and cholangitis*. Hepatology, 2007. **45**(6): p. 1538-46.
57. Hu, G., et al., *Cytokine production by CD4+ T cells specific for coagulation factor VIII in healthy subjects and haemophilia A patients*. Thromb Haemost, 2007. **97**(5): p. 788-94.
58. Oliveira, C.A., et al., *Cytokine profile and FVIII inhibitors development in haemophilia A*. Haemophilia, 2013. **19**(3): p. e139-42.
59. Reding, M.T., et al., *Distribution of Th1- and Th2-induced anti-factor VIII IgG subclasses in congenital and acquired hemophilia patients*. Thromb Haemost, 2002. **88**(4): p. 568-75.
60. Waters, B., et al., *Anti-CD3 prevents factor VIII inhibitor development in hemophilia A mice by a regulatory CD4+CD25+-dependent mechanism and*

by shifting cytokine production to favor a Th1 response. Blood, 2009. **113**(1): p. 193-203.

61. Chaves, D.G., et al., *A shift towards a T cell cytokine deficiency along with an anti-inflammatory/regulatory microenvironment may enable the synthesis of anti-FVIII inhibitors in haemophilia A patients.* Clin Exp Immunol, 2010. **162**(3): p. 425-37.
62. Recht, M., et al., *A retrospective study to describe the incidence of moderate to severe allergic reactions to factor IX in subjects with haemophilia B.* Haemophilia, 2011. **17**(3): p. 494-9.
63. Pernod, G., et al., *Anaphylaxis following the use of a plasma-derived immunopurified monoclate-P, and the recombinant Recombinate and Kogenate factor VIII: a therapeutic challenge.* Haemophilia, 1999. **5**(2): p. 143-4.
64. Shopnick, R.I., et al., *Anaphylaxis after treatment with recombinant factor VIII.* Transfusion, 1996. **36**(4): p. 358-61.
65. Tsuchiya, H., M. Shima, and A. Yoshioka, *Anaphylactic response to factor VIII preparations in a haemophilic child with an inhibitor of high titre during the tolerance induction.* Eur J Pediatr, 1998. **157**(1): p. 85.
66. Shakib, F. and D.R. Stanworth, *IgG4: a possible mediator of anaphylaxis in a haemophiliac patient.* Clin Allergy, 1979. **9**(6): p. 597-603.
67. Jabara, H.H., et al., *Sequential switching from mu to epsilon via gamma 4 in human B cells stimulated with IL-4 and hydrocortisone.* J Immunol, 1993. **151**(9): p. 4528-33.
68. Rispen, T., et al., *Mechanism of immunoglobulin G4 Fab-arm exchange.* J Am Chem Soc, 2011. **133**(26): p. 10302-11.
69. Agresti, A. and D. Vercelli, *Analysis of gamma4 germline transcription in human B cells.* Int Arch Allergy Immunol, 1999. **118**(2-4): p. 279-81.
70. Punnonen, J., et al., *Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(8): p. 3730-4.
71. Meiler, F., et al., *Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors.* Allergy, 2008. **63**(11): p. 1455-63.

72. Satoguina, J.S., et al., *T regulatory-1 cells induce IgG4 production by B cells: role of IL-10*. J Immunol, 2005. **174**(8): p. 4718-26.
73. Wood, N., et al., *IL-21 effects on human IgE production in response to IL-4 or IL-13*. Cell Immunol, 2004. **231**(1-2): p. 133-45.
74. Rock, B., et al., *The pathogenic effect of IgG4 autoantibodies in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem)*. N Engl J Med, 1989. **320**(22): p. 1463-9.
75. Mihai, S., et al., *IgG4 autoantibodies induce dermal-epidermal separation*. J Cell Mol Med, 2007. **11**(5): p. 1117-28.
76. van Toorenenbergen, A.W. and R.C. Aalberse, *IgG4 and passive sensitization of basophil leukocytes*. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1981. **65**(4): p. 432-40.

8.1 Documentos dos pareceres do Comitê de Ética em Pesquisa para o desenvolvimento dos trabalho



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 26/10/10
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 1024/2010 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 0799.0.146.000-10

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "CARACTERIZAÇÃO IMUNOBIOLOGICA DA REAÇÃO ALÉRGICA ASSOCIADA OU NÃO A PRESENÇA DE ANTICORPOS NEUTRALIZADORES EM RESPOSTA AO TRATAMENTO DE TERAPIA DE REPOSIÇÃO EM PACIENTES COM HEMOFILIA A E B".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Silmara Aparecida de Lima Montalvão

INSTITUIÇÃO: Hemocentro/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 13/10/2010

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 26/10/11 (O formulário encontra-se no site acima).

II - OBJETIVOS

Caracterizar a resposta imunológica da reação anafilática na presença ou não de inibidor em pacientes com hemofilia A e B.

III - SUMÁRIO

Trata-se de um trabalho de mestrado onde serão avaliados 10 pacientes portadores de hemofilia A ou B com história de reação alérgica à infusão de concentrados de fator VIII ou IX. Serão coletadas amostras de sangue periférico em EDTA, heparina e tubo seco, total de 25 a 28 ml, não excedendo 10% da volemia se o paciente for criança. Será feita a determinação da atividade dos fatores VIII e IX, dos níveis circulantes dos antígenos dos fatores, pesquisa de inibidores contra fator VIII ou IX e quantificação dos inibidores. Será feita também a caracterização molecular da hemofilia A ou B, determinação da imunodeficiência associada com IgE através de 3 técnicas. Os níveis circulantes de IL4, IL-5, TNF, IL-10 serão analisados através da técnica de ELISA e a avaliação de resposta das células T⁺ através de citometria de fluxo. Os resultados permitirão verificar quais são os parâmetros envolvidos na resposta anafilática e se há correlação entre a presença de marcadores biológicos e o evento de anafilaxia.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O projeto foi bem elaborado e é cientificamente relevante. Não há risco aos sujeitos de pesquisa. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido está redigido de modo claro e com linguagem acessível. O projeto foi submetido a FAPESP para o financiamento.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br



V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, bem como todos os anexos incluídos na pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

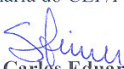
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e).

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII – DATA DA REUNIÃO

Homologado na X Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 26 de outubro de 2010.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM/UNICAMP



CEP, 25/10/11
(Grupo II)

PARECER CEP: Nº 1036/2011 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 0942.1.146.000-11

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "CARACTERIZAÇÃO DE FATORES DE RISCO GENÉTICOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE INIBIDORES EM PACIENTES COM HEMOFILIA A".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Thaís Helena Trento

INSTITUIÇÃO: Hemocentro/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 05/10/2011

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 25/10/12 (O formulário encontra-se no site acima).

II – OBJETIVOS.

Investigar mutações no gene do fator VIII e polimorfismos em genes codificadores de citocinas associadas à resposta imunológica e relacioná-los com o desenvolvimento de inibidores em pacientes com hemofilia A pertencentes a diferentes regiões do Brasil.

III – SUMÁRIO.

Tese de mestrado. Portadores de hemofilia A, provenientes dos seguintes centros: Hemoacre, Hemoba, Hemomat, Hemepar, Hemoes e Hemocentro Unicamp serão convidados a participar do estudo através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os voluntários doarão cerca de 9 ml de sangue total, para posterior extração de DNA genômico e pesquisa das mutações e polimorfismos relatados no item acima. Espera-se estabelecer as possíveis associações entre mutações e polimorfismos e desenvolvimento de anticorpos inibitórios do fator VIII.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES.

Projeto adequado em seus itens. Consta agência financiadora do estudo e cronograma detalhado. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido está adequado, no qual sujeitos poderão autorizar ou não a guarda de material biológico. Há previsão de inclusão de menores de idade na amostra, com autorização do responsável legal.

V - PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, bem como todos os anexos incluídos na pesquisa supracitada.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br



O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES.

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e).

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na X Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 25 de outubro de 2011.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

8.2 Trabalhos premiados e apresentados em congresso nacional e internacional relacionados a esta dissertação

(1) Trabalho recebeu o prêmio de Melhor Trabalho de Hemostasia e apresentado na categoria apresentação oral no Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia de 2012 (HEMO 2012)

Silmara A L Montalvão, Thais Trento, Marcelo Veiga, Maria Cristina Montenegro, Anelisa Streva, Erich V De Paula, Marina P Colella, Margareth C Ozelo. *IgG4 subclass of anti-FVIII antibodies is correlated to high-titer inhibitor in hemophilia A patients*. Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia – HEMO 2012. Rio de Janeiro. Categoria: Apresentação Oral.

(2) Trabalho apresentado na categoria apresentação oral no XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis-ISTH 2013.

Montalvão SAL, Tucunduva AC, Machado TFGS, Quaino SKP, Colella MP, Paula EV- Medina SS, Ozelo MC . *A high performance of Nijmegen-Bethesda Assay in therapy to induce immune tolerance (ITI) for hemophilia patients*. XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis-ISTH 2013. Amsterdam. Categoria: Apresentação Oral

(1)

IGG4 SUBCLASS OF ANTI-FVIII ANTIBODIES IS CORRELATED TO HIGH-TITER INHIBITOR IN HEMOPHILIA PATIENTS

Montalvão SAL¹, Trento T¹, Veiga M², Montenegro MC², Streva A³, Paula EV¹, Colella MP¹, Ozelo MC¹

¹*Centro de Hematologia e Hemoterapia, INCT do Sangue, Hemocentro da UNICAMP, Campinas, SP,*

²*Hemocentro do Paraná – Curitiba, PR, Brazil*

³*Hemocentro da Bahia – Salvador, BA, Brazil.*

Introduction: the presence of anti-factor VIII alloantibodies, also called inhibitor, in hemophilia patients compromises the replacement therapy effectiveness. The characterization of immunoglobulin (Ig) subclass has been showed an important role to identify the reactivity of factor (F) VIII concentrate used in the treatment of patients with hemophilia A (HA). Recent studies showed a strong correlation between high levels of anti-FVIII antibodies of subclass IgG4 with high-titre inhibitor and immune tolerance induction (ITI) failure. The objective of this study was to evaluate the characteristics of anti-FVIII IgG subclasses in HA patients with inhibitor. **Method:** we analyzed in this study samples from hemophilia A patients with inhibitor (> 0.6 BU/mL). The anti-FVIII inhibitor was determined by Bethesda assay with the Nijmegen modification. The antihuman-IgG specific for subclasses IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 (Southern Biotechnology Inc., USA) were performed by ELISA assay using two different plasma-derived FVIII (pdFVIII) concentrates, commonly used in Brazil I) Octavi SD Optimum, (Octapharma, France), and II) 8Y (Bio Products Laboratory, UK). **Results :** Twenty-six patients with congenital hemophilia A with inhibitor were included in this study. The mean age was 23y (range 8 - 49y), and twenty four patients had the diagnosis of severe HA, one moderate HA, and one mild HA. Twenty among twenty-six (77%) were high-responder inhibitors patients, and four of them had low-titre inhibitor (< 5 BU/mL) at the moment of the analysis. IgG1 subclass was positive in 23/26 (88%) patients, and in six low-titer inhibitor patients was the only IgG subclass present. In contrast, IgG4 was positive in all high-titer inhibitor patient, and in only one low-titer moderate HA patient. Furthermore, we also observed a correlation between the signal intensity of IgG4 and the inhibitor titer r 0.67 (Spearman Rank). No correlation between IgG1 positive reaction and the inhibitor titer was observed. We also included in our analysis two different pdFVIII concentrates, one with 100 IU/mg of protein (Octavi SD Optimum, Octapharma), and another intermediate purity pdFVIII concentrate (2 IU FVIII per mg) with high levels of von Willebrand factor (8Y, Bio Products Laboratory). It was observed a considerable reduction in the reactivity with FVIII concentrate 8Y. **Conclusion:** Our results demonstrated that IgG4 subclass of anti-FVIII antibodies is correlated to high-titre inhibitor, whereas IgG1 subclass is related to low-titre inhibitor in hemophilia A patients. We also observed a correlation of IgG4 positive reaction and high-titre of inhibitor. The presence of IgG4 anti-FVIII antibodies is related to Th2 immune response to FVIII, what can interfere in the success of immune tolerance induction (ITI) as previous reported. Therefore, the evaluation of IgG subclasses in patients with inhibitor may be useful alternative for monitoring the presence of inhibitor, and the decision of ITI treatment and outcome.

(2)

A high performance of Nijmegen-Bethesda Assay in therapy to induce immune tolerance (ITI) for hemophilia patients

The Bethesda method originally described by Kasper in 1975 and later modified by Verbruggen in 1995 is the gold standard for assessment of inhibitory antibodies against factors (F) VIII and FIX. The method has some limitations, such as the presence of residual endogenous or exogenous factor in moderate and mild haemophilia or from replacement therapy, respectively. Some studies show that treatment of these samples with heat improves the sensitivity of this test. The objective of this study is to compare inhibitor quantification obtained of samples previously treated and untreated with heat from hemophilia patients with and without inhibitor. For each analysis the plasma samples were collected and processed equally and separated into two aliquots. In the moment of the analysis one of the aliquots was treated with heating at 56°C for 30min and then centrifuged at 15000rpm 5min. The Nijmegen-Bethesda assay was performed for the two aliquots. Results <0.6BU were considered negative for the presence of inhibitor. The statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test. One hundred nine analyses from 46 patients with severe hemophilia A (FVIII<1.0IU/dL) were performed. Patients were divided into three distinct groups: Group (I) 20 patients without history of inhibitor, exposed and not recently exposed to FVIII. Group (II) 21 patients with history of inhibitor not exposure to FVII. Group (III) 5 patients (68 analysis) undergoing ITI protocol. For patients with no history of inhibitor the heating of samples did not modify results when compared with no heating sample ($P=0.24$). However, a statistical significant difference between the samples was observed in patients with positive history of inhibitor. The difference found in the group II ($P<0.05$) was evaluated against a ratio of FVIII:C/FVIII:Ag to obtain data about the FVIII exogenous to confirm the days without FVIII exposition. The higher difference was observed in the group III ($P<0.001$), the title of inhibitor obtained with heat samples had a median of 7.1 times (2.0-16.1 times) higher when compared with samples without heat treatment and 6 of them shift the negative (0.19-0.39BU) to positive (1.8– 4.43BU) results. In additional, the results obtained from each ITI patients show the same trend line obtained with the results of heating and no heating samples. The presence of FVIII in patient samples violates the principle of Bethesda method, where patient and control samples must be equivalent before incubation. Therefore, the additional presence of FVIII (exogenous) may modify the kinetics between antigen and antibody and provide results lower than the expected. In our experience, heating sample showed increased sensitivity of method and no shift from negative to positive was observed in results of patients without history of inhibitor. Furthermore, this procedure appears to be an important application for samples from patients undergoing ITI protocol. In daily practice, when one cannot wait 72 hours without infusion of FVIII containing products for analysis of quantification of inhibitor, heat treatment of samples may enable the determination of the test.