

# Factores Predictores de Respuesta a los Tratamientos de Inmunotolerancia en Pacientes Hemofílicos A con Inhibidores

Doctorando: Saturnino Haya Guaita

Directores: Dr. Carlos Solano Vercet

Dra. Pilar Casaña Gargallo

Programa de Doctorado RD778/1998



Valencia, octubre de 2015

Departamento de Medicina. Facultad de Medicina de la  
Universidad de Valencia







# Factores Predictores de Respuesta a los Tratamientos de Inmunotolerancia en Pacientes Hemofílicos A con Inhibidores

Doctorando: Saturnino Haya Guaita

Directores: Dr. Carlos Solano Vercet

Dra. Pilar Casaña Gargallo

Programa de Doctorado RD778/1998





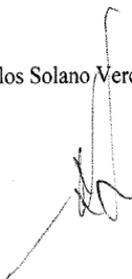




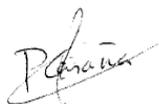
El Dr. Carlos Solano Vercet y la Dra. Pilar Casaña Gargallo, **hacen constar** que el presente trabajo, titulado “**Factores Predictores de Respuesta a los Tratamientos de Inmunotolerancia en Pacientes Hemofílicos A con Inhibidores**”, que presenta Saturnino Haya Guaita para la obtención del título de doctor, ha sido realizado bajo su dirección y reúne las condiciones necesarias para ser defendida delante del Tribunal correspondiente.

Los directores de la tesis doctoral:

Carlos Solano Vercet

Handwritten signature of Carlos Solano Vercet, consisting of a vertical line with a loop at the top and a horizontal stroke at the bottom.

Pilar Casaña Gargallo

Handwritten signature of Pilar Casaña Gargallo, featuring a stylized 'P' and 'C'.

Valencia, 28 de noviembre de 2015







## DEDICATORIA

A mis padres **Saturnino** y **Amparo** por su educación en el esfuerzo y la valoración del bien común.

A mi tía **Isabel**.

A **Inma** y a mis hijos **Javi** y **Rafa**.







## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a mis directores, Pilar Casaña y Carlos Solano, por la orientación en la realización de esta tesis, por sus cuidadosas correcciones, por su paciencia y por sus palabras de ánimo para concluir este trabajo doctoral.

A todo el personal de la Unidad de Coagulopatías Congénitas de La Fe. Parte de los datos aquí presentados reflejan su trabajo y dedicación con los pacientes hemofílicos.

A mis pequeños pacientes y a sus padres, por la confianza depositada en nosotros.

A David Hervás, por el análisis estadístico de los datos presentados en este trabajo.



## ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	15
<b>I.1. Antecedentes</b> .....	15
<b>I.2. Tratamiento de la hemofilia</b> .....	18
<b>I.3. Desarrollo de inhibidores</b> .....	22
<b>I.4. Tratamientos de inducción de inmunotolerancia en hemofilia A grave</b> .....	26
<b>I.4.1. Factores que pueden influir en los resultados de los ITI</b> .....	31
I.4.1.1. Tipo de mutación causal de la hemofilia.....	31
I.4.1.2. Etnia de los individuos .....	32
I.4.1.3. Título del inhibidor en el momento de iniciar el ITI.....	32
I.4.1.4. Título máximo histórico de inhibidor .....	33
I.4.1.5. Dosis de FVIII en el ITI .....	33
I.4.1.6. Tipo de concentrado utilizado en el ITI.....	35
I.4.1.7. Cuándo empezar el ITI .....	36
I.4.1.8. Edad en el momento del tratamiento.....	37
I.4.1.9. La infección de los accesos venosos .....	37
I.4.1.10. Utilización de inmunosupresión.....	38
<b>I.5. Tratamientos de inducción de inmunotolerancia en hemofilia A moderada y leve</b> .....	40
<b>II. HIPÓTESIS</b> .....	45
<b>III. OBJETIVO</b> .....	46
<b>IV. DISEÑO Y POBLACIÓN DE ESTUDIO</b> .....	47
<b>IV.1 Estudio estadístico</b> .....	53
<b>V. RESULTADOS</b> .....	55
<b>V.1. Descriptivo</b> .....	55
<b>V.1.1 Análisis de las variables principales</b> .....	58
<b>V.2. Análisis de las variables predictoras de respuesta</b> .....	67
<b>V.3 Tratamiento de inmunotolerancia de rescate</b> .....	79
<b>V.3.1. Paciente 10</b> .....	80

V.3.2. Paciente 12.....	83
V.3.3. Paciente 15.....	86
V.3.4. Paciente 17.....	88
V.3.5. Paciente 18.....	92
V.3.6. Paciente 22.....	93
V.3.7. Paciente 23.....	95
<b>VI. DISCUSIÓN.....</b>	<b>98</b>
<b>VII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>123</b>
<b>VIII. REFERENCIAS.....</b>	<b>125</b>
Anexo 1.....	151
<b>TÉCNICAS Y MÉTODOS DE LABORATORIO</b>	
<b>EMPLEADOS.....</b>	<b>151</b>
<b>1. Medición del FVIII por técnica coagulativa en un</b>	
<b>tiempo FVIII:C).....</b>	<b>151</b>
<b>2. Técnica de detección de los inhibidores.....</b>	<b>152</b>
<b>2.1. Técnica de Kasper.....</b>	<b>152</b>
<b>2.2. Técnica Bethesda.....</b>	<b>154</b>
<b>3. Mapeo de epítomos en inhibidores del</b>	
<b>factor VIII.....</b>	<b>158</b>
3.1. Digestión.....	158
3.2. Electroforesis y western blot.....	159
3.3. Incubaciones.....	159
3.4. Revelado.....	160
Anexo 2.....	161
<b>RECUPERACIÓN Y VIDA MEDIA DEL FVIII.....</b>	<b>161</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Evolución del tratamiento de la hemofilia .....	21
Figura 2. Estructura de la molécula de FVIII.....	26
Figura 3. Representación de los resultados de la regresión logística con penalización L1 (LASSO) .....	69
Figura 4. Distribución de los valores de título máximo en ITI.....	70
Figura 5. Distribución del logaritmo de los valores de título máximo en ITI .....	71
Figura 6. Tiempo hasta que el inhibidor es negativo .....	72
Figura 7. Tiempo hasta que la recuperación es normal.....	73
Figura 8. Tiempo hasta que la vida media es normal .....	73
Figura 9. Tiempo hasta que el inhibidor es negativo dependiendo de la dosis empleada .....	74
Figura 10. Tiempo hasta que la recuperación es normal dependiendo de la dosis empleada .....	74
Figura 11. Tiempo hasta que la vida media es normal dependiendo de la dosis empleada .....	75
Figura 12. Paciente 10. Evolución del título de inhibidor .....	82
Figura 13. Paciente 10. Evolución de la cifra de CD19.....	83
Figura 14. Paciente 12. Evolución del título de inhibidor .....	85
Figura 15. Paciente 12. Evolución del título de inhibidor y recuperación del FVIII .....	86
Figura 16. Paciente 15. Evolución del título de inhibidor .....	87
Figura 17. Paciente 17. Evolución del título de inhibidor .....	89
Figura 18. Paciente 17. Evolución del título de inhibidor .....	90
Figura 19. Paciente 17. Evolución del título de inhibidor y valores de FVIII valle.....	91
Figura 20. Paciente 17. Evolución de la cifra de CD19.....	91
Figura 21. Paciente 18. Evolución del título de inhibidor .....	93
Figura 22. Paciente 12. Evolución del título de inhibidor y valores valle de FVIII .....	95
Figura 23. Paciente 23. Evolución del título de inhibidor .....	96

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Datos demográficos .....	48
Tabla 2. Títulos de inhibidor .....	48
Tabla 3. Variables propias del ITI.....	49
Tabla 4. Variables principales en los pacientes en primera línea de ITI .....	56
Tabla 4 (continuación). Variables principales en los pacientes en primera línea de ITI .....	57
Tabla 5. Títulos de inhibidor .....	58
Tabla 6. Edad al inicio del ITI .....	59
Tabla 7. Demora .....	59
Tabla 8. Hemorragias durante el ITI.....	60
Tabla 9. Tiempos de tratamiento.....	61
Tabla 10. Días libres de infección desde la colocación del AVC..	63
Tabla 11. Relación de casos con caracterización epitópica.....	65
Tabla 12. Tiempo de seguimiento en los pacientes con éxito en primera línea de ITI .....	66
Tabla 13. Resultados del modelo de regresión .....	67
Tabla 14. Pacientes con más de una línea de ITI.....	77
Tabla 14 (cont.). Pacientes con más de una línea de ITI.....	78

## SIGLAS

AVC: accesos venosos centrales

CD4<sup>+</sup> T: linfocitos T CD4<sup>+</sup>

DDAVP: 1-ácido- 8-D-arginina vasopresina (desmopresina)

FEIBA: Factor Eight Inhibitor Bypass Activity (concentrado de complejo protrombínico activado)

FIX: factor IX

FIXa: factor IX activado

FVIII: factor VIII

FVW: factor von Willebrand

FX: factor X

FXa: factor X activado

ITI: Tratamientos de inducción de inmunotolerancia

kDa: kilodaltons

M: molar

mL: mililitros

pdFVIII: concentrados plasmáticos de FVIII

pdFVIII/FVW: concentrados plasmáticos de FVIII con factor von Willebrand

PVDF: difluoruro de polivinilo

rFIX: concentrado de factor IX recombinante

rFVIIa: factor VII activado recombinante

rFVIII: concentrado de FVIII recombinante

TTPa: tiempo parcial de tromboplastina activado

UB: unidades Bethesda

UI: unidades internacionales

VHC: virus de hepatitis C

VIH: virus de inmunodeficiencia humana



## **I. INTRODUCCIÓN**

### **I.1. Antecedentes**

La hemofilia es la diátesis hemorrágica congénita clínicamente más importante por su frecuencia y su gravedad. Las primeras referencias de la enfermedad se encuentran en el Talmud babilónico hace más de 1500 años. En él constaba que a una mujer que había perdido a sus dos primeros hijos varones en la circuncisión, se le eximia de la obligación de circuncidar al tercer hijo varón

En el siglo X de nuestra era, el médico árabo-andalusí Khalaf ibn Abbas Abu-al-Kasim (Albucasis) describió en su vademecum varios varones de un pueblo que murieron por hemorragia tras pequeños traumatismos; y en el siglo XII Maimónides eximía de la circuncisión a los varones, en base a la misma regla de los rabinos, pero aplicada también aunque la mujer esposara un nuevo marido<sup>1</sup>.

La primera referencia de la enfermedad en Estados Unidos se remonta a 1791, en el obituario de Isaac Zoll, en el que se cita la muerte de seis hermanos después de mínimos traumatismos<sup>2</sup>. El trastorno hemorrágico recibe el nombre de hemofilia en 1828 en el tratado de Hopff<sup>3</sup>.

Al inicio del siglo XIX se conocía la existencia de la fibrina y se consideraba que la coagulación era una propiedad del plasma. Wright, en 1893, observó que los hemofílicos tenían alargado el tiempo de coagulación en sangre total. A mediados de la década de los 30 del siglo

pasado, Armand Quick desarrolló un método de laboratorio conocido con el nombre de tiempo de protrombina o tiempo de Quick, siendo todavía una de las pruebas hemostáticas básicas actualmente<sup>4</sup>. Este mismo autor, demostró también, en 1954, que el tiempo de protrombina es normal en los hemofílicos<sup>5:6</sup>. En 1936, Patek y Taylor descubrieron la sustancia deficiente en los hemofílicos al observar que una fracción globulínica del plasma normal corregía el defecto de coagulación del plasma hemofílico, y la denominaron *globulina antihemofílica*<sup>7</sup>. En el año 1947, el médico argentino Pavlovsky observó que la mezcla de sangre de dos pacientes con hemofilia se comportaba como sangre normal y que la transfusión de sangre de un hemofílico a otro mejoraba el tiempo de coagulación en el receptor; lo cual orientó hacia la presencia de una nueva globulina<sup>8</sup>. En 1952, Biggs describió la enfermedad de Christmas, en reconocimiento del paciente afecto, lo que sirvió para diferenciar dos tipos de hemofilia<sup>9</sup>. Sin embargo, hasta 1973 no se reconocieron como entidades independientes la glicoproteína procoagulante factor VIII (FVIII) y la glicoproteína multimérica del factor von Willebrand (FVW)<sup>10</sup>.

La hemofilia A se debe a defectos en el gen *F8* que provocan la ausencia o la disminución de la actividad del FVIII plasmático. La hemofilia B está causada por alteraciones en el gen *F9* que tienen como consecuencia la pérdida o disminución de la función del factor IX (FIX) de la

coagulación. Ambos genes están situados en el extremo del brazo largo del cromosoma X. La incidencia de la hemofilia está en torno a 1/5.000 varones con una distribución homogénea en todo el mundo. Aproximadamente el 85% son hemofílicos A y el 15 % hemofílicos B. Dependiendo del valor del factor plasmático se divide en hemofilia grave, cuando el valor es menor de 1UI/dL, hemofilia moderada, cuando el valor es de 1-5 UI/dL, y hemofilia leve, si el valor es superior a 5 UI/dL<sup>11</sup>.

El factor VIII se sintetiza en los endotelios vasculares, fundamentalmente el hepático, como un precursor inactivo de 2.351 aminoácidos con un peso molecular de 330 kDa. Tras la eliminación de los 19 aminoácidos del péptido señal, queda la molécula madura de 2.332 aminoácidos con una estructura en dominios A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2. El FVIII es un heterodímero que consta de dos cadenas, la pesada con un peso molecular entre 90 y 200kDa, comprende los dominios A1-B; la cadena ligera de aproximadamente 80kDa se corresponde con los dominios de A3 a C2<sup>12</sup>. El dominio B no interviene en la función biológica<sup>13</sup>, y el resto de los dominios interacciona con otros componentes clave de la cascada de la coagulación sanguínea<sup>14;15</sup>.

El FVIII circula en plasma a muy baja concentración (~ 100 ng/mL), unido a su transportador, el FVW) formando un complejo no covalente que se mantiene unido por fuerzas

electrostáticas lábiles, el cual protege al FVIII de la proteólisis y de un aclaramiento rápido.

## **I.2. Tratamiento de la hemofilia**

La transfusión sanguínea se empieza a practicar a principios del siglo XIX. En 1840, Samuel Lane, médico del St George's Hospital Medical School de Londres, practicó una transfusión de sangre a un hemofílico en una hemorragia postquirúrgica<sup>16</sup>. Durante el siglo XX los conflictos bélicos en Europa marcan los progresos en la transfusión. El germen del tratamiento sustitutivo actual tiene su origen en los años 40 del pasado siglo, cuando Edwin J. Cohn consiguió el fraccionamiento del plasma con diferentes concentraciones de etanol<sup>17</sup>. Un hecho verdaderamente determinante fue el que Judith Pool, en 1964, describiese que la fracción crioprecipitada del plasma fuese rico en FVIII. Esto sirvió como base para la obtención de los concentrados liofilizados a principios de los años 70<sup>18</sup>.

La disponibilidad de los concentrados de factor, otro de los cambios sustanciales en el tratamiento de la hemofilia, permitió un tratamiento más precoz, al poder efectuar administraciones domiciliarias y por lo tanto aplicar con más facilidad, los tratamientos profilácticos.

La clonación de los genes del FIX y del FVIII, a mitad de los años 80<sup>19;20</sup>, fue el punto de partida para la consecución de los concentrados de origen recombinante

mediante ingeniería genética. Desde entonces se ha progresado mucho tanto en la seguridad biológica de los concentrados como en la obtención de factores de vida media más prolongada. La terapia génica es uno de los tratamientos en desarrollo para esta enfermedad. Desde hace más de dos décadas, tenemos la reiterada percepción de una pronta instauración de este recurso en los tratamientos rutinarios, pero todavía seguimos en fase de investigación. Figura 1.

Antes de la amplia disponibilidad de concentrados del factor de la coagulación deficitario correspondiente, un número considerable de pacientes con hemofilia no alcanzaba la edad adulta, dado que solían morir por hemorragias. El desarrollo de estos concentrados a partir de los años 70 del pasado siglo, permitió que la esperanza de vida de los hemofílicos pasase de 7,8 años antes de 1939 a más de 70 años en 2001<sup>21-23</sup>, en los países con suficientes recursos económicos. Con anterioridad al año 1985, estos concentrados no estaban sometidos a procedimientos de inactivación viral. Esto supuso un alto porcentaje de infecciones por virus hemotransmisibles, fundamentalmente el virus de hepatitis C (VHC) y el de la inmunodeficiencia humana (VIH). Estas infecciones originaron un descenso de la esperanza de vida en la década de los 80 y los 90, durante las que se produjo un pico de mortalidad debido fundamentalmente a la infección por el VIH. En un estudio

prospectivo realizado en Holanda<sup>23</sup>, en una población de 967 pacientes hemofílicos seguidos entre 1992-2001, la esperanza de vida, independientemente de la gravedad, era de 67 años (59 en los pacientes graves), 70 si eran VIH negativos y 74 si negativos para VIH y VHC; lo cual se aproximaba a los 76 de la población general. Si comparamos estos datos con los publicados previamente por este grupo, la esperanza de vida de los pacientes con hemofilia grave había descendido de 63 a 61 años en el periodo 1973-1986, y de 61 a 59 en el periodo de 1986-1992<sup>24</sup>. Este descenso está relacionado con la epidemia del VIH.

En el momento actual, en los países desarrollados, podemos decir que los niños con hemofilia tienen una esperanza de vida muy cercana al de la población general. Entre los diferentes factores relacionados con la mejora en la esperanza y calidad de vida de estos pacientes, se pueden mencionar la disponibilidad de concentrados de factores de alta calidad, es decir, concentrados plasmáticos sometidos a procedimientos de inactivación viral, así como la introducción de productos recombinantes desde principios de los años 90 del pasado siglo.

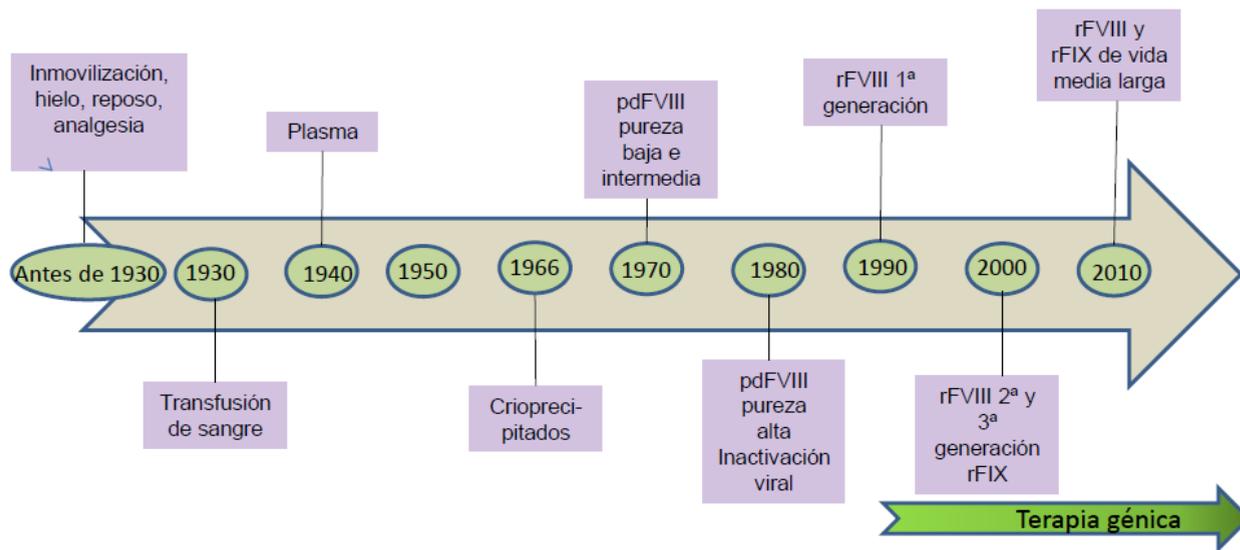


Figura 1. Evolución del tratamiento de la hemofilia

### **I.3. Desarrollo de inhibidores**

El tratamiento más habitual de la hemofilia es la administración del factor deficitario, el cual puede desencadenar la aparición de anticuerpos, conocidos como inhibidores, que neutralizan la función de la proteína infundida

Todas las mejoras conseguidas con la infusión de concentrados son muy evidentes en los pacientes que no desarrollan inhibidores. Por el contrario, al paciente con inhibidores no le es útil el tratamiento sustitutivo. Además, la eficacia de los tratamientos alternativos es menor. Por lo tanto, el paciente con inhibidores tiene más riesgos vitales y una peor calidad de vida.

La aparición de los inhibidores ya se había observado en la época de las transfusiones de sangre total<sup>25;26</sup>. El problema se hizo más evidente tras la utilización de los concentrados de FVIII con más controversia desde la incorporación de los concentrados de origen recombinante.

Actualmente se considera que la aparición de inhibidores es la complicación más seria y que condiciona en mayor medida el tratamiento y la calidad de vida de los hemofílicos. Este problema es mucho más frecuente en hemofilia A (21-33%) sobre todo en los pacientes graves<sup>27-29</sup>, mientras que en los hemofílicos A leves y en la hemofilia B la incidencia es inferior<sup>30-35</sup>. La aparición de los inhibidores se

suele producir en los primeros años de vida después de recibir las primeras dosis de concentrado de factor<sup>27;28;36-38</sup>.

Los pacientes con inhibidores pueden ser bajos y altos respondedores. Bajo respondedor es el hemofílico que desarrolla inhibidores pero sus titulaciones son inferiores o igual a 5 UB/mL, aunque se le exponga de forma reiterada al factor deficitario. Se considera alto respondedor al paciente que muestra títulos de inhibidor superiores a 5 UB/mL tras la reiterada exposición al factor deficitario.

Los mecanismos de acción de los inhibidores son variados, aunque en general se puede afirmar que comprometen la unión (impidiéndola estéricamente) entre el FVIII y las moléculas con las que debe interactuar para que produzca la necesaria coagulación. Se han descrito otras posibilidades intermedias como el bloqueo parcial que se traduciría en actividad inhibitoria debido a la reducción en la cinética de liberación FVIII por el factor von Willebrand (FvW)<sup>39</sup>. Los inhibidores también podrían producir un aumento sorprendente de la proteólisis del FVIII<sup>40</sup>. Aunque típicamente los puntos de unión del inhibidor sobre el FVIII se sitúan en A2, C2 y A3, es posible encontrar en la literatura médica referencias en las que se identifican anticuerpos dirigidos contra el resto de los dominios del factor. Así, se han estudiado inhibidores que actúan:

- Sobre el dominio A1 interfiriendo la unión al FX<sup>41</sup>.
- Sobre el dominio A2 impidiendo la unión FIXa-FVIII<sup>42</sup>.

- Sobre A3 bloqueando las uniones FVIII-FVW, FVIII-FIX y FVIII-FIXa<sup>43</sup>.
- Sobre C1 interfiriendo la unión FVIII-FVW<sup>44</sup>.
- Sobre C2, afectando a las uniones FVIII-fosfolípidos, FVIII-FVW y FVIII-FXa<sup>45-50</sup>. Habría unos epítomos en C2 “clásicos” cuyos anticuerpos interferirían la unión de C2 con los fosfolípidos y el FVW. Una segunda clase de anticuerpos C2, los llamados “no clásicos”, que impedirían la activación del FVIII por la trombina y el FXa<sup>51</sup>. Incluso se sugiere la existencia de anticuerpos anti-FVIII con punto de unión en el dominio B sin efectos en la actividad fisiológica (medidos como título Bethesda), pero con consecuencias sobre la vida media del FVIII perfundido, que se vería anormalmente reducida al eliminarse los inmunocomplejos formados<sup>52</sup>.

En la literatura hay pocos trabajos en los que se relacionen los estudios de caracterización de los epítomos con la respuesta a los ITI. En el estudio de Greningre se aprecia correlación de los epítomos y la respuesta en los ITI<sup>53</sup>. En este estudio de pacientes sometidos a ITI con un único producto plasmático con FVW, se disponía de la caracterización epitópica de 10 de los 11 pacientes tratados; en 9 de ellos se tenía señal. En los 9 tenían especificidad para C2 y en 4 para A2. La presencia de inhibidor dirigido frente a A2 estaría asociada a un mal resultado; 3 de los pacientes fracasaron y el otro fue éxito parcial, mientras que en el resto de pacientes todos fueron éxito a excepción de

un éxito parcial. En el trabajo publicado por un grupo holandés, los pacientes que respondían al ITI, tenían predominio de inhibidores dirigidos frente a cadena ligera. Seis pacientes con éxito y 5 fracasos; 3 de los pacientes con éxito presentaban inhibidores frente a epítomos de la cadena ligera y sólo uno de los 5 que fracasaron. En cuanto a los inhibidores frente al epítomo de dominio A2, está en 4 de 5 pacientes sin respuesta al ITI y sólo en 2 de 6 de los que respondieron<sup>54</sup>. En el trabajo de Gringeri<sup>55</sup>, aunque la serie es más irregular no se aprecia mejor resultado en los pacientes con inhibidores dirigidos frente a cadena ligera, no obstante el estudio es menos sistemático y no hay pacientes con inhibidores dirigidos exclusivamente frente a cadena ligera. Figura 2.

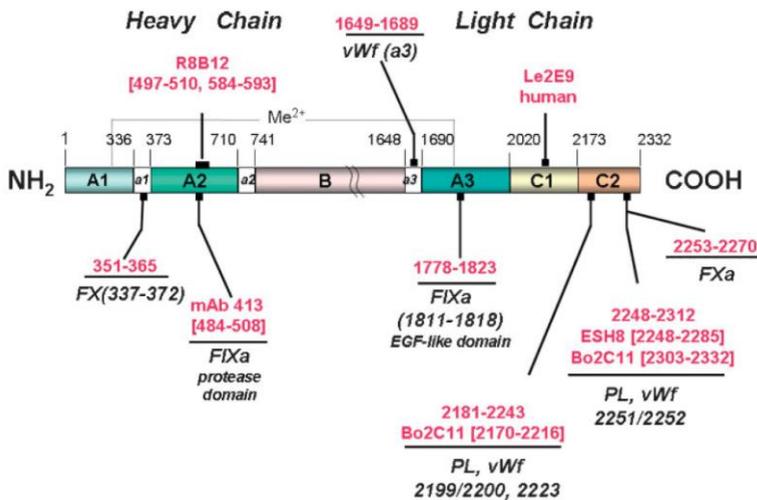


Figura 2. Estructura de la molécula de FVIII. Dominios del FVIII y epítopos frente a los que van dirigidos los inhibidores, (en rojo). El dominios A están flanqueado por las regiones ácidas a1, a2 y a3; ricos en residuos de cargas negativas. La activación proteolítica del FVIII se efectúa sobre R372, R740 y R1689 liberándose el dominio B y a3. La digestión con trombina corta el FVIII en las regiones ácidas a1, a2 y a3, permitiendo obtener, mediante electroforesis, bandas discretas para A1, A2 y A3-C1-C2. (Obtenido de Ananyeva, N.M; 2009<sup>56</sup>).

#### I.4. Tratamientos de inducción de inmunotolerancia en hemofilia A grave

El manejo del paciente hemofílico con inhibidores es uno de los mayores retos para los médicos dedicados al tratamiento de la hemofilia, suponiendo un mayor requerimiento de recursos humanos y económicos. En estos pacientes hay dos aspectos del tratamiento a tener en cuenta. Por una parte se deben controlar los episodios hemorrágicos, y por otra llevar a cabo los tratamientos de

inducción de inmunotolerancia (ITI), con el objetivo de eliminar el inhibidor de forma permanente. Para conseguir esta erradicación del inhibidor los tratamientos actuales están basados en la exposición al factor desencadenante, el FVIII o FIX, de forma más o menos intensiva y continuada. Este tratamiento se mantiene hasta que el paciente se haga tolerante al producto administrado, o lo que es lo mismo, que la recuperación y la vida media del factor infundido sea normal.

La erradicación del inhibidor en los hemofílicos es el objetivo fundamental en aquellos pacientes que lo han desarrollado. Cuando se consigue la tolerancia podemos volver a utilizar los concentrados de FVIII para el control de los episodios hemorrágicos. Esta es la opción terapéutica más adecuada, dado que ofrece la mejor relación coste eficacia, y además permite aplicar los tratamientos profilácticos tradicionales para prevenir las hemorragias articulares y la consecuente artropatía. En definitiva, la posibilidad de utilizar los concentrados del factor deficitario en la hemofilia repercute en mejorar la calidad de vida de estos pacientes, aspecto que se ve claramente deteriorado mientras el inhibidor está presente.

Para conseguir eliminar el inhibidor, inicialmente se ensayaron los mismos tratamientos inmunosupresores utilizados en la hemofilia adquirida, pero los resultados fueron sustancialmente menores y muy diversos. En este

sentido, se exploraron diferentes regímenes de ciclofosfamida administrada junto al FVIII para conseguir evitar la respuesta anamnésica, con pobres resultados<sup>57</sup>. En la mayoría de los trabajos, no se conseguía evitar la respuesta anamnésica, pero sí demostraron que ésta era de menor intensidad y más demorada<sup>58;59</sup>. La completa erradicación del inhibidor fue comunicada en pocos casos<sup>60;61</sup> y en algunas ocasiones el paciente pasaba de ser alto respondedor a bajo respondedor<sup>62</sup>, pero la mayoría de las veces se producían fracasos<sup>61;63;64</sup>.

Después de estos resultados poco alentadores, Brackmann y Gormsen publicaron el caso de un paciente en el que se consiguió eliminar el inhibidor de alto título con la administración de altas dosis diarias de FVIII y FEIBA®<sup>65</sup>. Esto dio lugar al ITI conocido posteriormente como el protocolo de Bonn<sup>66</sup>, que utiliza 100-150 UI/kg/12h de FVIII con o sin 50 U/Kg/12h de FEIBA® dependiendo de la clínica hemorrágica del paciente. El esquema anterior ofrecía notables éxitos, pero, por el elevado coste, surgieron otros protocolos con menores dosis y también buenos resultados: el protocolo de Valencia<sup>67</sup> con 50 UI/kg/día de FVIII acompañado de tratamiento esteroideo al final del ITI, el protocolo de Los Ángeles<sup>68</sup> con igual esquema pero sin esteroides y el grupo holandés con dosis todavía inferiores, 25UI/kg cada 48-72 horas<sup>69-71</sup>.

El grupo de Malmö diseñó un protocolo de ITI intensivo, asociando la administración de altas dosis de factor, inmunosupresión e inmunoglobulinas que resultó eficaz, incluso en pacientes portadores del inhibidor durante mucho tiempo<sup>72</sup>. En los últimos años ha disminuido la utilización de esta modalidad de tratamiento, en gran medida por la dificultad para su aplicación en la edad pediátrica<sup>73</sup>.

En los años noventa se recopilaban datos retrospectivos, incluyendo un número considerable de pacientes sometidos a ITI, que dieron lugar a diferentes registros. El objetivo fundamental era obtener más información sobre los factores predictores de respuesta que influyen en la respuesta de los ITI. En el Registro Internacional se aprecian como variables asociadas con un índice de mayor éxito el uso de dosis  $\geq 100$  UI/kg/día y la presencia de un bajo título de inhibidor ( $< 10$  UB/mL) en el momento de iniciar el ITI<sup>74</sup>. La actualización de este registro en el año 2001 determinó que, además de las dos variables previas, también son factores de buen pronóstico un título máximo de inhibidor más bajo y una edad más temprana al comienzo del tratamiento<sup>75</sup> de inmunotolerancia.

El otro gran registro es el Norteamericano<sup>76;77</sup>. En él se pone de manifiesto que responden mejor los pacientes con un menor título máximo de inhibidor, un menor título durante el ITI y los que inician el ITI con un título  $< 10$  UB/mL. En cuanto a la dosis, hay una asociación inversamente pro-

porcional entre esta y el éxito; los pacientes que utilizan dosis menores responden mejor al tratamiento. Sin embargo, se observa que en los casos con éxito, cuando se emplean dosis más altas, la respuesta es más rápida. La utilización concomitante de inmunomodulación no influía en la tasa de éxito.

Los datos del Registro Alemán<sup>78</sup> identifican dos variables significativas de buen pronóstico: tener un título máximo de inhibidor menor, e iniciar el ITI cuando el título de inhibidor es más bajo.

En la actualización del Registro Español del 2005<sup>79</sup> se aprecian tres variables con influencia positiva en el pronóstico: un título de inhibidor <10 UB/mL en el momento de iniciar el ITI, la utilización de dosis de factor <100 UI/kg/día y la ausencia de infección de los reservorios subcutáneos.

Como podemos deducir, los conocimientos actuales en relación con los factores predictores de respuesta en los ITI proceden de estudios no controlados, en los que se han utilizado dosis diversas de FVIII, y en ocasiones, diferentes criterios para considerar el éxito del tratamiento, además, de los 4 registros mencionados previamente. Este material nos ha permitido definir algunos factores predictores pero todavía hay muchos aspectos inciertos, entre ellos el mecanismo por el que se consigue la tolerancia. Se piensa que la infusión reiterada de FVIII puede llegar a producir la

inactivación o depleción de las células B y CD4<sup>+</sup> T con memoria específica al FVIII; esto impediría la renovación de las células plasmáticas productoras de este anticuerpo específico<sup>80-82</sup>. Consecuentemente, la nueva exposición al FVIII no estimularía la diferenciación de células B memoria en células plasmáticas productoras del inhibidor. También se podría conseguir la inmunotolerancia sin depleción de células T<sup>80;83</sup>. Otro posible mecanismo es que la infusión reiterada del FVIII provocaría un incremento del inhibidor, lo cual daría lugar a la generación de anticuerpos anti-idiotipo dirigidos frente a la parte variable del primer anticuerpo produciendo su neutralización<sup>84</sup>. Se están llevando a cabo estudios para determinar si estos anticuerpos pueden actuar también sobre los receptores de las células B<sup>85</sup>.

#### **I.4.1. Factores que pueden influir en los resultados de los ITI**

##### **I.4.1.1. Tipo de mutación causal de la hemofilia**

Hay algunas alteraciones genéticas asociadas con un mayor riesgo en la aparición de inhibidores. En este grupo se encuentran las inversiones en el intrón 22 o en el intrón 1, las grandes deleciones y las mutaciones que predicen un codón de parada temprana de la traducción o también llamadas mutaciones terminadoras; el resto de mutaciones se asocian con un menor riesgo de aparición de inhibidores<sup>86;87</sup>. De la misma forma, en algunas series de

pacientes se ha visto que estos tipos de mutación influyen en la respuesta de los ITI; los peores resultados se han obtenido entre los pacientes portadores de grandes deleciones<sup>88</sup>. No obstante, estos datos no han sido confirmados en otras series<sup>71</sup>.

#### I.4.1.2. Etnia de los individuos

Este es otro punto en controversia. El Registro Norteamericano de Inmunotolerancia al examinar la etnia como predictor de éxito, no aprecia diferencias significativas entre africanos (67%) y latinos (58%) con respecto al resto de etnias (71%). Una publicación más reciente del centro de tratamiento de hemofilia en Detroit, sí que ha mostrado peores resultados entre los pacientes de origen afroamericano, que concluyeron con éxito el ITI en el 57.9% de los casos, comparado con los pacientes de otras etnias que alcanzó el 92%<sup>89</sup>

#### I.4.1.3. Título del inhibidor en el momento de iniciar el ITI

En todas las series y registros la variable más uniformemente relacionada con un buen pronóstico, es el título de inhibidor bajo en el momento de iniciar el ITI. De una recopilación de los datos del Registro Internacional y del Norteamericano<sup>90</sup> se muestra que, en los pacientes que inician el tratamiento con un título <10 UB/mL, se consigue el

éxito en el 85% de los casos y en un tiempo medio de 11 meses, comparado con el 33% y 15 meses cuando el título es  $>10\text{UB/mL}$ . Los estudios donde el inicio del ITI se pospuso hasta que los pacientes tuvieran un título de inhibidor  $<10\text{ UB/mL}$ , reflejan éxitos notables<sup>70;91</sup>. Con estos resultados parecería lógico recomendar en todo hemofílico que desarrolla un inhibidor, esperar un tiempo sin exponerlo a productos que lleven FVIII, con mediciones periódicas del título de inhibidor, hasta comprobar que el título ha descendido por debajo de  $10\text{ UB/mL}$ , antes de iniciar el ITI. Este descenso se suele producir en unos meses en la mayoría de los pacientes<sup>92</sup>.

#### I.4.1.4. Título máximo histórico de inhibidor

Aunque es una variable menos uniforme, en la mayoría de las series o registros los pacientes con títulos de inhibidor más altos tienen peor pronóstico<sup>74;76;78;93</sup>. Los pacientes con un título  $>500\text{ UB/mL}$  tienen claramente peor pronóstico. En el Registro Norteamericano también es un factor de mal pronóstico los elevados títulos durante el ITI.

#### I.4.1.5. Dosis de FVIII en el ITI

Uno de los puntos de mayor controversia es la dosis de concentrado de factor a emplear en el ITI. En el Registro Norteamericano<sup>76</sup>, al igual que en el Registro Español<sup>93</sup>, se constata un mejor pronóstico cuando se utilizan dosis bajas,

lo cual está en contraposición con el Registro Internacional, donde la administración de dosis  $\geq 100$  UI/Kg/día está asociada a un mayor número de éxitos. En el análisis conjunto de los datos del Registro Internacional y Registro Norteamericano efectuada por Kroner<sup>90</sup> se aprecia que la tasa de éxito es independiente de la dosis de FVIII utilizada en aquellos pacientes con supuesto buen pronóstico, definidos como los que tienen un título histórico de inhibidor  $< 200$  UB/mL y empiezan el ITI con un título  $< 10$  UB/mL. Además, en este mismo análisis se objetiva que, aquellos pacientes con un título histórico de inhibidor  $> 200$  UB/mL y un título previo al ITI  $> 20$  UB/mL, sólo tienen unas posibilidades razonables de éxito si son tratados con dosis igual o superiores a 200 UI/kg/día. El empleo de dosis altas de factor también implica que aquellos pacientes que consiguen el éxito lo hacen en menos tiempo.

En los pacientes con un buen pronóstico puede no estar justificado el empleo de dosis altas. Para intentar aclarar este punto, se puso en marcha un ensayo clínico, el ITI Study. En él se incluían niños hemofílicos A graves, menores de 8 años de edad, con un título de inhibidor máximo entre 5-200 UB/mL y que hubieran transcurrido menos de dos años desde la detección del inhibidor y el inicio del ITI. En este ensayo clínico los pacientes se aleatorizaban según la dosis de FVIII en dos ramas: 50 UI/Kg tres días por semana o 200 UI/Kg/día<sup>94</sup>. El ensayo se

terminó de forma prematura porque los pacientes incluidos en la rama de dosis bajas de FVIII presentaban mayor número de hemorragias. En cualquier caso el número de éxitos en ambos grupos fue similar, 69% y 71% con dosis bajas y altas respectivamente. En el estudio también se demostró que los pacientes que utilizan dosis altas, conseguían el éxito en menos tiempo, lo cual concordaba con lo observado en otras series<sup>95</sup>

#### I.4.1.6. Tipo de concentrado utilizado en el ITI

De forma habitual se ha utilizado para el ITI el mismo concentrado de FVIII que desencadenó la aparición del inhibidor. Analizando los resultados del conjunto de registros, no se aprecian diferencias significativas cuando se analiza el tipo de factor empleado en los ITI. No obstante, algunas publicaciones han mostrado mejores resultados cuando se emplean concentrados de baja pureza. Pacientes que no respondían al utilizar concentrados de alta pureza, consiguen el éxito tras cambiar a un concentrado con alto contenido en factor von Willebrand<sup>96</sup>. Cuando se compararon los resultados de la serie de Bonn, los pacientes sometidos a ITI en la década de los 90 exhibían peores resultados, un 50% de éxito, frente a los tratados con anterioridad<sup>97</sup>. Este declinar en la eficacia se atribuyó al cambio de productos plasmáticos por recombinantes. No obstante, las características individuales de estos pacientes no han sido

publicadas y no se puede excluir la posibilidad que otros factores pudieran estar influyendo. Los autores sugirieron que los concentrados plasmáticos de FVIII con FVW (pdFVIII/FVW) pueden ser más eficaces en los ITI porque el FVW protege al dominio C2 de la acción del inhibidor y consecuentemente se prolonga la vida media del FVIII infundido<sup>98-100</sup>. Por lo tanto, en pacientes con peores factores predictores podría tener cierta ventaja tratarlos con estos productos<sup>55;101-103</sup>. No obstante, revisiones sistemáticas no muestran diferencias significativas que soporten la ventaja de los productos ricos en FVW<sup>104;105</sup>.

#### I.4.1.7. Cuándo empezar el ITI

Algunos grupos siguen apostando por iniciar los ITI lo antes posible tras la detección del inhibidor<sup>106</sup>. Esto está basado en lo observado por algunas series en las que se aprecia un mejor resultado, cuando el intervalo entre la detección del inhibidor y el ITI es corto<sup>95;107</sup>. No obstante, esto no se ha confirmado con los datos provenientes de los registros y otras series<sup>74-76;78;91;93;108-110</sup>. Dado que la variable más significativa en el momento actual es el título de inhibidor antes del ITI, parece lógico iniciar el tratamiento cuando el título decaiga por debajo de 10 UB/mL e incluso de 5 UB/mL. Para que se produzca este descenso se intenta evitar los productos que contengan FVIII, y los episodios

hemorrágicos en este periodo se tratan con factor VII activado recombinante (rFVIIa).

#### I.4.1.8. Edad en el momento del tratamiento

La edad en el momento del inicio del ITI es otro punto de controversia. En algunas series<sup>95</sup> y en el Registro Internacional<sup>75</sup> es una variable significativa, consiguiéndose peores resultados en pacientes mayores de 20 años; sin embargo, este hecho no se aprecia en los otros registros<sup>76;78;93</sup>.

#### I.4.1.9. La infección de los accesos venosos

Para poder efectuar las repetidas infusiones de factor en los ITI, con frecuencia hay que recurrir a la colocación de un acceso venoso central (AVC). La infección del AVC es la complicación más frecuente en estos pacientes sometidos a ITI.

Es conocido que infecciones de cualquier tipo durante el ITI, y particularmente en los AVC, suelen causar un aumento inespecífico en el título de inhibidor. La infección de los AVC puede retrasar o incluso dificultar la consecución de la inmunotolerancia. En una revisión sistemática efectuada por Valentino LA et al<sup>111</sup>, hay dos factores independientes que aumentan el riesgo de infección de los AVC: su empleo en pacientes hemofílicos con inhibidores y el uso en niños menores de 6 años. Por tanto, como la mayoría de los

hemofílicos que se someten a inmunotolerancia, lo hacen en los primeros años de vida, es una población con mayor riesgo de infección de los AVC.

Una de las ventajas más claras de las pautas de tratamiento con menor número de administraciones, como son las de tres días por semana, es que pueden llevarse a cabo con mayor facilidad sin utilizar AVC. Aún en el caso de precisarse en la pauta de tres días por semana, el riesgo de infección continuará siendo inferior por su menor uso, lo cual podría redundar en mayores éxitos de los ITI y en la disminución de los riesgos infecciosos con complicaciones graves en ocasiones<sup>112</sup>.

#### I.4.1.10. Utilización de inmunosupresión

Los tratamientos inmunosupresores por sí solos, a diferencia de lo que sucede en la hemofilia adquirida, se desestimaron al ver que no aportaban grandes ayudas en la erradicación de los inhibidores<sup>61;63;113</sup>. Por los potenciales efectos adversos y las dudas en su utilidad, no se suelen emplear en primeras líneas de ITI. Además hay consenso en no emplear inmunosupresión en los ITI en pacientes menores de 6 años. Como la mayoría de los pacientes sometidos a estos tratamientos son de poca edad, sería otra de las razones para no emplearlos. No obstante, podrían tener cierto papel administrados conjuntamente con altas dosis de factor, sobre todo en pacientes con mal pronóstico,

es decir, aquellos con altos títulos de inhibidor, que empiecen el ITI con título alto o hayan presentado fracasos a primeras líneas de ITI<sup>60;114</sup>. Por lo tanto, la inmunosupresión se suele considerar en ITI de rescate cuando los pacientes no han respondido a tratamientos con concentrados de factor exclusivamente, o en adultos con malos factores predictores; de esta forma se podría acortar el tiempo de respuesta y el coste del tratamiento. El grupo sueco defendía la utilización conjunta de concentrados a altas dosis con ciclofosfamida e inmunoglobulinas porque con la utilización de los concentrados de factor junto con uno de ellos solamente, no conseguían la erradicación del inhibidor.

En los últimos años se ha utilizado con relativa frecuencia un nuevo inmunosupresor, el rituximab, un anticuerpo monoclonal contra un epítipo de CD20, molécula que identifica a linfocitos B. Cuando se emplea solo, sin FVIII, la respuesta es pobre, a semejanza de lo ocurrido con los otros inmunosupresores<sup>115</sup>. Los resultados son más esperanzadores con el empleo conjunto de rituximab y FVIII en pacientes que habían fracasado en intentos previos de ITI<sup>116-121</sup>. En una recopilación de los tratamientos efectuados por los Centros de Tratamientos de Hemofilia Británicos, se aprecia que la erradicación del inhibidor de forma sostenida es poco común; no obstante, sí que se produce una mejoría clínica en el 50% de los pacientes. Los efectos secundarios

a corto o medio plazo son pocos, pero se desconocen los efectos a largo plazo <sup>122</sup>.

La decisión de realizar un segundo intento de ITI debería estar basada en la frecuencia de las hemorragias, su gravedad y la respuesta a los tratamientos con agentes baipás en cada caso.

### **I.5. Tratamientos de inducción de inmunotolerancia en hemofilia A moderada y leve**

De forma clásica se consideraba que la aparición de inhibidores en pacientes afectos de hemofilia A moderada y leve era poco frecuente, pero en cierto modo esta idea cambió con la publicación efectuada por los centros británicos de tratamiento de la hemofilia en 1998<sup>123</sup>. En este estudio y tras un periodo de seguimiento de 7 años, se mostraba que 15 de los 57 casos nuevos de inhibidores se producían en pacientes con hemofilia moderada o leve. Estos datos suponen que la incidencia anual es de 0,84 por cada 1.000 pacientes moderados y leves frente a 3,5 para los pacientes graves. En un estudio posterior publicado por Sharathkumar<sup>124</sup> se comunicó que de 54 hemofílicos leves 4 desarrollaron inhibidor, un 7,4%. Si se consideraban solamente los que habían recibido tratamiento, el porcentaje aumentaba al 14% y todavía más si la administración se efectuaba en infusión continua 57% (4 de 7).

Al igual que en la hemofilia A grave, hay una predisposición familiar y el tipo de mutación también es muy importante; las mutaciones de los hemofílicos leves que desarrollan inhibidores suelen estar agrupadas en el dominio A2, residuos 482-501 y en el dominio C2, residuos 2248-2312. Las mutaciones más recurrentes en estos pacientes son la Arg593Cys<sup>123;125-127</sup>, Arg2150His<sup>123;128-130</sup> y Trp2229Cys<sup>123</sup>. Otro factor de riesgo asociado con la aparición de inhibidores en estos pacientes es la exposición intensiva y, posiblemente, más todavía si es en infusión continua<sup>124;126;131;132</sup>. El inhibidor habitualmente neutraliza el FVIII propio y el exógeno<sup>126</sup>, aunque en ocasiones sólo neutraliza el FVIII exógeno<sup>129</sup>. Se han descrito tanto inhibidores con cinética de tipo I como del tipo II, aunque ésta última es más frecuente, al igual que sucede en la hemofilia adquirida<sup>128;133</sup>. Los valores de FVIII plasmático pueden ser indetectables, aunque en ocasiones, bien porque se comportan con cinética tipo II, o porque no hay reacción cruzada con el factor endógeno, estos son similares a los basales del paciente; pero cuando se le administran concentrados de FVIII se aprecia una recuperación y vida media reducida. Debido a estas peculiaridades es especialmente importante efectuar estudios farmacocinéticos.

Con el desarrollo de inhibidores, habitualmente se produce un empeoramiento de la sintomatología

hemorrágica del paciente, con una clínica similar a los hemofílicos graves y muchos de ellos con un comportamiento similar a la hemofilia adquirida.

Tradicionalmente se había considerado que gran parte de los inhibidores en la hemofilia leve y moderada eran transitorios. En los Centros Británicos de Tratamiento de Hemofilia, 1/3 de los pacientes presentaban inhibidores transitorios, en otro tercio desaparecerían tras inmunotolerancia y el resto mantenían el inhibidor<sup>123</sup>. Los episodios hemorrágicos se trataban habitualmente con FEIBA o rFVIIa y en ocasiones con DDAVP. La no exposición a FVIII puede facilitar un descenso más rápido del título de inhibidor. La desmopresina será más útil en aquellos pacientes en los que no hay reactividad cruzada frente al FVIII propio. Hay múltiples publicaciones donde se ha demostrado su utilidad<sup>123;128;129;134;135</sup>. En cualquier caso ante hemorragias de cierta consideración puede ser complicado mantener unos valores adecuados de FVIII durante suficiente tiempo. La desmopresina minimizaría también los riesgos de la respuesta anamnésica al liberar factor endógeno que es menos inmunogénico que el exógeno<sup>128</sup>. La utilización de desmopresina como profilaxis administrada tres días por semana también ha logrado buenos resultados<sup>136</sup>.

En cuanto a los tratamientos de inmunotolerancia en éste grupo de pacientes, hay poca casuística en la literatura

y la mayoría son casos aislados. La serie más amplia es la de los Centros Británicos de Tratamiento de Hemofilia; en ella 8 de los 26 pacientes recibieron inmunotolerancia. El esquema de Malmö se utilizó en 4 pacientes, en dos con éxito y en los otros dos con éxito parcial. El esquema del grupo holandés usando dosis bajas fracasó en un paciente y tuvo éxito parcial en el otro. El protocolo de Bonn fue aplicado en otros dos pacientes obteniéndose un resultado similar al anterior. También se han publicado otros trabajos en los que se apreció la utilidad de la inmunosupresión<sup>137</sup>. En publicaciones más recientes se destaca que, el uso de rituximab en hemofilia congénita con inhibidores logra mejores respuestas en hemofilia leve que en la grave<sup>117;138</sup>.

Aunque los datos en la literatura son limitados, sí apuntan a que la respuesta ha sido mayor cuando se ha utilizado inmunosupresión. Esto se explicaría porque el inhibidor en el paciente leve tiene un comportamiento más parecido al de los autoanticuerpos propios de la hemofilia adquirida. De este modo en la hemofilia congénita leve y moderada con inhibidores, una opción válida sería la utilización de inmunosupresores como único tratamiento para erradicar el inhibidor.

Debido a esta escasez de documentación se hace más preciso insistir que los datos provenientes de todos estos pacientes se incorporen a estudios o registros. En este sentido está la iniciativa del grupo franco-belga y el

INSIGHT. (**IN**ternational **S**tudy on etiology of inhibitors in patients with a moderate or mild form of hemophilia A influences of Immuno **G**enetic & **H**emophilia **T**reatment factors)<sup>35;139</sup>.

Por tanto, es evidente que existe información insuficiente y en ocasiones contradictoria acerca de cuáles son los factores predictores de respuesta en los ITI y de la posterior evolución en pacientes con hemofilia que han desarrollado inhibidores. A pesar de la baja frecuencia, se trata de una complicación potencialmente grave y, por ello, es importante seguir investigando e identificar variables clínicas o biológicas que permitan mejorar el tratamiento de estos pacientes, personalizando los ITI en función de los factores predictores.

Dada la baja incidencia de inhibidores en la población general, sólo mediante ensayos clínicos, registros o series de casos grandes se puede aportar información de utilidad para identificar factores predictores de respuesta en los ITI. Este es el caso de la Unidad de Coagulopatía Congénita de la Comunidad Valenciana, donde se atiende al conjunto de pacientes de toda la Comunidad, contando con un registro extenso de datos clínicos y biológicos a lo largo de un tiempo prolongado.

## **II. HIPÓTESIS**

La identificación de factores predictores de respuesta a los ITI en pacientes con hemofilia que han desarrollado inhibidores, puede ser de gran importancia en el manejo de esta complicación. El análisis de una amplia serie de pacientes y con un tiempo de seguimiento prolongado es una herramienta fundamental para conseguir identificar estas variables.

### **III. OBJETIVO**

Determinar la asociación de diferentes variables con el éxito en los tratamientos de inmunotolerancia en hemofílicos A graves, que se han efectuado en la Unidad de Coagulopatías Congénitas de la Comunidad Valenciana.

#### IV. DISEÑO Y POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se trata de un estudio mixto retrospectivo y prospectivo que recoge información de las bases informáticas y de las historias clínicas de los pacientes que efectuaron tratamientos de inmunotolerancia en la Unidad de Coagulopatías Congénitas de la Comunidad Valenciana, actualmente incluida en la Unitat d'Hemostàsia i Trombosi, Servei d'Hematologia, Hospital Universitari i Politècnic La Fe de València.

Se diseñó una hoja de recogida de datos para obtener los aspectos fundamentales relacionados con los tratamientos de inmunotolerancia realizados. En la hoja de recogida de datos podemos apreciar tres apartados: **a)** datos demográficos de los pacientes, tabla 1; **b)** datos referentes al inhibidor, tabla 2; y **c)** un tercer apartado referente al ITI propiamente dicho, tabla 3.

Tabla 1.

<b>Datos demográficos</b>
Fecha de nacimiento
Gravedad de la hemofilia
Antecedentes familiares de inhibidor
Tipo de alteración genética
Fecha de primera exposición al factor
Tipo de factor
Fecha de detección del inhibidor
Días de exposición
Antecedentes de enfermedades con hiperreactividad del sistema inmune

Tabla 2.

<b>Títulos de inhibidor</b>
Título máximo antes de iniciar el ITI
Título previo al ITI
Título máximo durante el ITI
Caracterización de epítomos frente al FVIII

Tabla 3.

Variables propias del ITI	
Fecha de inicio del ITI	
Tipo de factor empleado en el ITI	
Dosis de factor	
Tratamiento concomitante	
Se produjo interrupción del ITI	
Profilaxis con agente baipás durante el ITI	
Número de eventos hemorrágicos durante el ITI	
Se utilizó acceso venoso central	
Infección del acceso venoso central	
Trombosis del acceso venoso central	
Fecha en la que el inhibidor es negativo (meses de tratamiento)	
Fecha en que la recuperación es normal (meses de tratamiento)	
Fecha en que la vida media es normal (meses de tratamiento)	
Causa de la suspensión del tratamiento	Éxito
	Cambio de inmunorrespuesta
	Fracaso
	Cambio de régimen de ITI
Se produjo recidiva	

En nuestro estudio, la variable dependiente es el éxito o el fracaso al tratamiento, y como variables independientes el resto de las recogidas en la base de datos, a saber: tipo de alteración genética, edad de inicio del ITI, demora o el tiempo transcurrido desde la aparición del inhibidor y el inicio del ITI, título máximo de inhibidor, título pre ITI, título máximo durante el ITI, dosis de factor utilizada, tipo de FVIII empleado, utilización de reservorios, infección de estos, alergias u otros fenómenos de estímulo del sistema inmune, interrupciones del tratamiento, tratamientos concomitantes.

El título del inhibidor se mide en unidades Bethesda (UB), cuya técnica se describe en anexo 1.

Título máximo histórico de inhibidor, es el título máximo registrado desde la detección del inhibidor y el inicio del ITI.

Título pre ITI, es el título disponible más cercano al inicio del ITI.

Título máximo durante el ITI, es el título máximo registrado durante el periodo del ITI.

Se considera alto respondedor al paciente que en los días siguientes a ser expuesto al factor deficitario presenta un título de inhibidor superior a 5 UB/mL.

Bajo respondedor, cuando el título de inhibidor es inferior a 5 UB/mL aunque el paciente sea expuesto de forma reiterada al factor.

Recaída, cuando reaparece el inhibidor después que el paciente haya cumplido los criterios de tratamiento con éxito y lleve al menos 6 meses sin inhibidor.

Interrupción del ITI, cuando se deja de administrar por un periodo superior a 2 semanas.

Tratamiento concomitante, indica la administración de inmunosupresión o inmunomodulación.

Tipo de factor: para el análisis se han considerado los concentrados de origen plasmático (pdFVIII) y los de origen recombinante (rFVIII). Dentro de los primeros con o sin contenido en FVW.

La dosis de factor para el análisis se ha diferenciado en tres categorías: los que han recibido <100 UI/kg/día, 100 UI/kg/día y >100 UI/kg/día.

Las alteraciones genéticas se han agrupado en: a) inversiones, b) grandes deleciones, c) mutaciones terminadoras, d) pequeñas deleciones o inserciones y e) Sitio corte-empalme. En nuestros pacientes las grandes deleciones afectan como mínimo a todo un exón.

#### Tipo de inhibidor

Cinética tipo 1, es la típica de la hemofilia congénita. El inhibidor inactiva al FVIII exógeno de forma progresiva, en proporción directa a su concentración: mientras hay inhibidor

sigue inutilizando el factor. La unión del inhibidor con el factor es irreversible. No pueden coexistir factor e inhibidor en circulación.

Cinética tipo 2, es la típica de la hemofilia adquirida. Es más compleja; en ella hay una inactivación inicial rápida, seguida de una segunda fase más lenta o fase de equilibrio en la que se puede medir FVIII. La unión al factor es reversible y coexisten FVIII e inhibidor en circulación. El FVIII circulante no previene de los riesgos hemorrágicos. En la cinética tipo 2 es más difícil determinar el título de inhibidor con exactitud.

Los resultados del ITI se clasificaran en:

- Tratamiento con éxito: cuando el inhibidor es negativo, (no se detecta) la recuperación y vida media del factor vuelve a ser normal.

- Éxito parcial: cuando se produce un cambio en la respuesta inmune pasando de alto respondedor a bajo respondedor; en estos pacientes las exposiciones sucesivas al FVIII no inducen una elevación del inhibidor por encima de 5 UB/mL.

- Fracaso: cuando no hay cambios en la respuesta inmune, persistiendo después del tratamiento unos valores de inhibidor similares a los previos o con criterios de alto respondedor.

- Pacientes que siguen en ITI.

Para el seguimiento de los pacientes en ITI habitualmente se efectúa una determinación mensual del título de inhibidor. Cuando hay dos determinaciones con inhibidor negativo, se efectúa una valoración de la recuperación tras un periodo de lavado de tres días, en los que no ha recibido factor, se considera normal cuando es superior al 66%. Si la recuperación es normal, a lo largo de las dos semanas siguientes se planifica la medición de la vida media del factor; si resulta superior a 6-7h se considera que el paciente es tolerante (anexo 3). También se puede considerar que, si a las 48h de recibir una dosis de FVIII de 50 UI/kg todavía persiste FVIII en plasma, la vida media es normal; más aún si se trata de un niño, teniendo en cuenta que los niños tienen una farmacocinética más acelerada.

#### **IV.1 Estudio estadístico**

Los datos se han resumido mediante la media, la mediana, el primer y el tercer cuartil en el caso de variables continuas, y mediante las frecuencias relativas y absolutas en el caso de variables categóricas. La selección de variables asociadas al éxito en ITI se ha realizado mediante un modelo de regresión logística con penalización L1 (LASSO)<sup>140</sup>. La utilización de modelos penalizados es necesaria en casos como este, en el que el número de variables es muy elevado en relación al número de observaciones. Aquellas variables que no han sido

penalizadas a cero, se consideran asociadas a la probabilidad de éxito del tratamiento. El análisis estadístico se ha realizado mediante el software R (versión 3.2.1).

## **V. RESULTADOS**

### **V.1. Descriptivo**

Todos los pacientes incluidos en el presente estudio son hemofílicos A graves, nacidos entre 1956 y 2011. Durante este periodo, se ha incluido en el Registro de la Unidad de Coagulopatías Congénitas un total de 395 pacientes con hemofilia A, 166 graves, 28 moderados y 201 leves. Los tratamientos se han llevado a cabo entre 1980 y 2015.

Hay un total de 26 pacientes que han seguido al menos un tratamiento de inducción de inmunotolerancia; tres de ellos todavía siguen tratamiento en su primera línea sin haberlo finalizado. Por tanto, hay 23 pacientes analizables en tratamiento de primera línea.

Las variables principales de estos 23 pacientes están descritas en la tabla 4.

La alteración genética es conocida en todos los pacientes y se muestran también en la tabla 4.

Tabla 4. Variables principales en los pacientes en primera línea de ITI

Paciente	Año de nacimiento	Tipo de mutación	Tít máx inh histórico <sup>(a)</sup>	Fecha de inicio de ITI	Años al ITI	Demora (meses)	Tít pre ITI <sup>(a)</sup>	Tít máx en ITI <sup>(a)</sup>	CFVIII PL/R	Dosis y pauta
1	1956	Inversión intrón 22	22	19/11/1981	25	50	8	23	PL	50 UI/Kg/día
2	1961	Inversión intrón 22	41	22/12/1981	21	132	6	40,8	PL	50 UI/Kg/día
3	1970	Gran deleción	295	28/11/1980	10	25	50	294	PL	50 UI/Kg/día
4	1977	Gran deleción	86	29/01/1986	8	46	2	211	PL	10 UI/kg/3 x sem.
5	1977	Inversión intrón 22	70	08/03/1980	2	12	32	32	PL	50 UI/Kg/día
6	1977	Gran deleción	1075	12/02/1982	4	32	183	1075	PL	50 UI/Kg/día
7	1988	Gran deleción	14	17/04/1996	8	55	2	2,2	PL	100 UI/Kg/día
8	1990	Inversión intrón 22	114	09/07/1992	2	15	1	53	PL	100 UI/Kg/día
9	1996	Gran deleción	13	03/05/2000	4	11	6	2,66	PL	70 UI/Kg/día
10	1996	Inversión intrón 22	52	01/07/1996	0	0	52	276	R	200 UI/Kg/día
11	1998	Inversión intrón 22	5	05/07/2000	2	1	5	4,3	R	50 UI/Kg/3 x sem.
12	2001	Inversión intrón 22	6,6	25/04/2005	3	12	2,6	723	PL	50 UI/Kg/3 x sem.
13	2002	Inversión intrón 22	2	11/04/2005	2	5	2	0,7	R	50 UI/Kg/3 x sem.
14	2004	Inserción exón 14	21	16/05/2005	1	14	2	150	PL	200UI/Kg/día
15	2004	Sitio corte-empalme	4	06/02/2008	4	0	2	1,7	R	50 UI/Kg/3 x sem.
16	2005	Deleción exón 14	13	03/11/2006	2	3	4	3	R	50 UI/Kg/3 x sem.
17	2005	Inversión intrón 22	11	23/07/2007	1	5	4	209	R	50 UI/Kg/3 x sem.
18	2008	Inversión intrón 22	134	25/05/2011	3	10	4,6	340	R	50 UI/kg/3 x sem.
19	2009	Inversión intrón 22	29	30/03/2011	2	9	1	19	PL	133 UI/Kg/día
20	2009	Terminadora	6,75	01/03/2010	0	0	3,9	2,6	R	200 UI/Kg/día
21	2010	Inversión intrón 22	10,9	10/06/2011	1	1	10,9	9	PL	80 UI/Kg/3 x sem.
22	2010	Inversión intrón 22	9,5	21/02/2012	1	1	9,5	2,5	R	200 UI/kg/3 x sem.
23	2011	Inversión intrón 22	24	13/12/2012	1	0	5,6	23,7	PL	100 UI/Kg/3 x sem.

<sup>(a)</sup>: UB/mL, Tít max inh: título máximo de inhibidor, CFVIII PL/R: concentrado de FVIII plasmático/recombinante, 3 x sem: tres días por semana

Tabla 4(continuación). Variables principales en los pacientes en primera línea de ITI

Paciente	TTO concomitante	Profilaxis antiemorrágica en ITI	Número de episodios hemorrágicos durante ITI	Fecha de finalización del tratamiento	Se produjo recidiva	Acceso venoso central	Infección del AVC	Fecha del último control	Resultado del tratamiento
1		No	0	03/03/1982	No	No	No	25/11/1995	Éxito
2	Cortic final del ITI	No	3	09/11/1982	No	No	No	20/04/1992	Éxito
3	Plasmaféresis y Cortic. final del ITI	No	22	08/03/1983	Si	No	No	07/07/2015	Éxito
4		No	13	01/01/1987		No	No	18/10/2013	Fracaso
5	Cortic. final del ITI	No	20	09/11/1982	No	No	No	28/05/2015	Éxito
6	Cortic. final del ITI	No	12	23/05/1984		No	No	08/05/2015	Fracaso
7	Cortic. final del ITI	No	3	05/05/1997	No	No	No	15/07/2015	Éxito
8	Ig	No	3	24/04/1994	No	Si	Si	19/12/2012	Éxito
9	Cortic. final del ITI	No	12	14/03/2003	No	Si	Si	03/07/2015	Éxito
10	Ig	No	1	12/12/1997		Si	Si	26/06/2015	Fracaso
11		No	13	13/01/2003	No	No	No	29/05/2015	Éxito
12		No	17	20/02/2006		No	No	15/06/2015	Fracaso
13		No	0	27/07/2005	No	No	No	13/07/2015	Éxito
14		No	0	12/05/2006	No	Si	Si	19/02/2015	Éxito
15		No	2	07/04/2008		No	No	12/05/2015	Fracaso
16		Si	2	01/08/2007	No	Si	No	05/05/2015	Éxito
17		Si	16	25/08/2008		No	No	07/07/2015	Fracaso
18		Si	13	13/05/2013		No	No	08/07/2015	Fracaso
19		No	1	17/01/2012	No	Si	Si	12/11/2012	Éxito
20		Si	1	19/07/2010		Si	Si	06/09/2013	Fracaso
21		Si	9	17/05/2012	No	No	No	27/05/2015	Éxito
22		No	2	14/02/2013		No	No	10/07/2015	Fracaso
23		Si	4	20/05/2013		No	No	19/06/2015	Fracaso

TTO: tratamiento, AVC: acceso venoso central, Ig: inmunoglobulinas, Cortic: corticoides

### V.1.1 Análisis de las variables principales

En la tabla 5 se recogen tres variables correspondientes a diferentes títulos. Los títulos máximos históricos de inhibidores. En todos los pacientes el inhibidor era de cinética tipo 1, a excepción del paciente 15, que tenía una cinética de tipo 2. El título de inhibidor previo al inicio del ITI. En los últimos años, la práctica habitual en nuestro centro es esperar a que el título de inhibidor decline por debajo de 10 UB/mL antes de iniciar el ITI, por tanto, la gran mayoría de los pacientes han iniciado el tratamiento con un título bajo. Esto queda reflejado en el valor del 3.º cuartil, 8,75 UB/mL. Los títulos máximos durante los ITI, en un porcentaje elevado de pacientes el título es inferior a 200 UB/mL; tenemos un 3.º cuartil de 210 UB/mL.

Tabla 5. Títulos de inhibidor (UB/mL)

	Máximo histórico	Pre ITI	Durante ITI
Mínimo	2	1	0,7
1.º cuartil	10	2	2,83
Mediana	22	4,6	23,7
3.º cuartil	100	8,75	210
Máximo	1.075	173	1.075
Media	107,86	17,35	152

En la tabla 6 se reflejan los datos de edad de los pacientes al inicio del ITI. La mayoría de los pacientes se han tratado antes de los 2 años de vida, aspecto lógico si la aparición de los inhibidores se produce tras pocas exposiciones a los concentrados de FVIII y los ITI los iniciamos en cuanto descende el título de inhibidor. En este punto tenemos la demora, la mitad de los pacientes esperan al inicio del ITI un máximo de 10 meses. Tabla 7.

Tabla 6. Edad al inicio del ITI (años)

Mínimo	0
1. <sup>er</sup> cuartil	1
Mediana	2
3. <sup>er</sup> cuartil	4
Máximo	25
Media	4,65

Tabla 7. Demora (meses)

Mínimo	0
1. <sup>er</sup> cuartil	1
Mediana	10
3. <sup>er</sup> cuartil	20
Máximo	132
Media	19

En la tabla 8 se describen las hemorragias durante los ITI. Hay pacientes con un número considerable. No obstante, en la mayoría de los pacientes el número es reducido, con una mediana de 3. Los pacientes que utilizan  $\geq 100$  UI/kg diariamente, son los que tienen un menor número de hemorragias, con una mediana de 1,5 (Q1,Q3: 1, 3). De los 4 pacientes que utilizan 200 UI/kg/día, uno no tiene ningún evento hemorrágico, dos tienen uno y el cuarto tiene 2. Ver tabla 4.

Tabla 8. Hemorragias durante el ITI

Mínimo	0
1.º cuartil	1,5
Mediana	3
3.º cuartil	13
Máximo	22
Media	7,35

En la tabla 9 están recogidos los tiempos de tratamiento, de forma global en todos los pacientes, en los pacientes con éxito y los que no responden al tratamiento.

Tabla 9. Tiempos de tratamiento (meses)

	Todos los pacientes	Pacientes con éxito	Pacientes con fracaso
Mínimo	2	3,46	2
1. <sup>er</sup> cuartil	9	9,77	5,26
Mediana	11,4	11,7	11,23
3. <sup>er</sup> cuartil	24	27,66	17,63
Máximo	34,8	34,83	27,7
Media	15,13	16,95	12,78

En cuanto al tipo de factor: 14/23 pacientes utilizaron pdFVIII/FVW, a excepción de uno que era concentrado plasmático monoclonal. Los 9 restantes se trataron con concentrado de factor VIII de origen recombinante. Las dos marcas de pdFVIII/FVW utilizados, tienen una concentración de FVW superior a la de FVIII.

Las dosis de FVIII utilizadas se muestran en la tabla 4. Para el análisis estadístico se categorizaron tres grupos: en 17/23 pacientes se utilizó una dosis <100 UI/kg/día, en 2/23 la dosis fue de 100 UI/kg/día y en 4/23 >100 UI/kg/día.

En 6 pacientes se utilizaron corticoides al final del tratamiento con el objetivo de acelerar la consecución de la

tolerancia, cuando el inhibidor se encontraba en títulos bajos, o para conseguir la normalización de la vida media cuando el inhibidor era negativo. Sólo a un paciente se le aplicó plasmaféresis para disminuir el título de inhibidor, a semejanza del protocolo de Malmö. En dos pacientes se aplicaron inmunoglobulinas.

Dos pacientes interrumpieron el tratamiento durante un periodo superior a 2 semanas, por problemas con los accesos venosos.

En 7 pacientes se utilizó al menos un AVC; todos los AVC son port-a-cath. En 3 pacientes se colocaron 2 AVC y en 4 sólo se colocó uno. Por tanto, se colocaron 10 reservorios en estos pacientes. En todos los reservorios menos en uno, se produce infección o colonización, al menos en una ocasión. Uno de los pacientes a quien sólo se le colocó un reservorio, no se infectó, durante los 9 meses que duró el ITI. La mediana de tiempo libre de infección con el primer reservorio es de 135 días, mientras que con los segundos reservorios hay infección a los 15 y 24 días de la colocación. Los reservorios colocados en los niños de menor edad y en los primeros años de nuestra serie, se infectaron con menor tiempo de utilización. Ver tabla 10. La mayoría de las infecciones se controlaron con tratamiento antibiótico; no obstante, seis reservorios se retiraron por infección. Bien por tratarse de un germen con mayor riesgo para el paciente,

como el staphilococo aureus y bacterias gram negativas, o bien por colonización reiterada a pesar de diferentes tandas de tratamiento antibiótico. En 4/6 pacientes que se infectaron se consiguió el éxito en ITI en primera línea. El paciente que no se infectó también consiguió la inmunotolerancia. No se diagnosticó ningún proceso trombótico, aunque no se efectuaron exploraciones por imagen de despistaje de forma rutinaria.

Tabla 10. Días libres de infección desde la colocación del AVC

Paciente	Edad (años)	Fecha de colocación	Días libres de infección
8	2,2	22/06/1992	151
8	3,3	21/07/1993	24
9	4,3	03/05/2000	100
9	5,3	23/05/2001	135
10	0,2	14/08/1996	75
10	1	01/07/1997	15
14	1,2	13/04/2005	281
16	1,7	20/10/2006	No Infección
19	1,9	09/03/2011	211
20	0,2	01/03/2010	72

AVC: acceso venoso central

En los últimos 15 años se ha estado efectuando el estudio de epítomos; por tanto, no disponemos de esta determinación en todos los pacientes, sólo de los últimos pacientes tratados. En la tabla 11 podemos ver los resultados de los estudios epitópicos efectuado a 14 pacientes. Es un estudio transversal, antes de iniciar los ITI. En esta tabla se reflejan también los diferentes títulos de inhibidor y el tipo de concentrado de factor empleado, tanto antes de la aparición del inhibidor, como el utilizado en el ITI.

Tabla 11. Relación de casos con caracterización epitópica

Paciente	Tipo Mutación	CFVIII PL/R Exp Inicial	Tít máx hist de inh (a)	Tít pre- ITI(a)	Tít máx en ITI (a)	Epítomos	CFVIII PL/R en ITI	Resultado 1ª línea de tto	Resultado final
9	Gran deleción	PL	13	6	2,66	A2	PL	Éxito	Éxito
10	Inversión intrón 22	R	52	52	276	A1+A2+CL	R	Fracaso	É. parcial
12	Inversión intrón 22	PL	6,6	2,6	723	A2+CL	PL	Fracaso	Éxito
13	Inversión intrón 22	R	2	2	0,7	No señal	R	Éxito	Éxito
14	Inserción exón 14	PL	21	2	150	A2+CL	PL	Éxito	Éxito
15	Sitio corte-empalme	PL	4	2	1,7	A1+A2+CL	R	Fracaso	Éxito
16	Deleción exón 14	R	13	4	3	A2	R	Éxito	Éxito
17	Inversión intrón 22	R	11	4	209	A1+A2+CL	R	Fracaso	É. parcial
18	Inversión intrón 22	R	134	4,6	340	A2+CL	R	Fracaso	Sigue tto
19	Inversión intrón 22	R	29	1	19	A2+CL	PL	Éxito	Éxito
20	Terminadora	R	6,75	3,9	2,6	A2+CL	R	Fracaso	Fracaso
21	Inversión intrón 22	R	10,9	10,9	9	A2+CL	PL	Éxito	Éxito
22	Inversión intrón 22	R	9,5	9,5	2,5	CL	R	Fracaso	Éxito
23	Inversión intrón 22	PL	24	5,6	23,7	A2	PL	Fracaso	Sigue tto

CFVIII: concentrado de FVIII, PL: plasmático, R: recombinante, Exp Inicial: tipo de concentrado de factor utilizado antes de la aparición del inhibidor, (a): UB/mL, Tít máx hist de inh: título máximo histórico de inhibidor, Tít pre-ITI: título de inhibidor antes de iniciar el ITI, Tít máx en ITI: título máximo de inhibidor durante el ITI, tto: tratamiento, É.: éxito

Sólo uno de los 13 pacientes con éxito, recidivó a los 6 años y 8 meses de haber conseguido la tolerancia.

En la tabla 12, vemos reflejado los tiempos de seguimiento en los pacientes con éxito.

Tabla 12. Tiempo de seguimiento en los pacientes con éxito en 1ª línea de ITI (años)

Mínimo	0,83
1.º cuartil	7,75
Mediana	11,17
3.º cuartil	13,67
Máximo	32,5
Media	12,25

El paciente que recidivó, permaneció durante 25 años con presencia del inhibidor, inicialmente de bajo título y posteriormente de título alto. Se manejó con pdFVIII a dosis altas y con productos baipás. A los 41 años, se volvió a tratar con CFVIII y tras un seguimiento de 4 años, no se ha detectado presencia de inhibidor y en todo momento la vida media del factor VIII ha sido normal

## V.2. Análisis de las variables predictoras de respuesta

En la primera línea de tratamiento 13/23 pacientes consiguen la erradicación del inhibidor (56.5%). El resto se consideran fracasos.

Se ha realizado un modelo de regresión logística con penalización L1 (LASSO) para realizar la selección de variables. Aquellas variables que no han sido penalizadas a cero se consideran asociadas a la probabilidad de éxito del tratamiento. Tabla 13.

**Tabla 13. Resultados del modelo de regresión**

(Término independiente)	0,968
Alteración genética	0
Título máximo de inhibidor	0
Años al ITI	0
Demora	0
Título pre ITI	0
Log <sub>2</sub> (Título máximo en ITI)	-0,133
Concentrado Recombinante	-0,678
Concentrado Plasmático con FVW	$7 \cdot 10^{-14}$
Dosis categorizada 100	0
Dosis categorizada >100	0
Utilización de acceso venoso central	0
Infección del AVC	0

Estos resultados se pueden expresar mediante una fórmula que relaciona la probabilidad de éxito con cada una de estas variables:

$$\Pr(\text{Éxito}) = \frac{e^{0.968 - 0.133 * \text{Título.máx.en.ITT} - 0.678 * \text{Plasma.recom}}}{1 + e^{0.968 - 0.133 * \text{Título.máx.en.ITT} - 0.678 * \text{Plasma.recom}}}$$

Del análisis estadístico en nuestra serie destacan dos variables que influyen en el éxito: a) un menor título máximo de inhibidor durante el ITI y b) la utilización de concentrados de FVIII de origen plasmático para efectuar el ITI. En el análisis estadístico la utilización de pdFVIII/FVW aporta una parte prácticamente despreciable, pero como en nuestra serie todos los concentrados plasmáticos a excepción de uno contenían FVW, no podemos discriminar el poder de esta variable.

En la figura 3 se muestra la representación de la regresión logística con penalización L1 (LASSO). Con este modelo, y según los datos de nuestra serie, se podría predecir la probabilidad de éxito de un determinado paciente conociendo el título máximo en ITI y el tipo de factor utilizado (plasmático o recombinante).

En el resto de variables analizadas no se ha encontrado evidencia estadística que influya en el éxito.

En relación al título máximo histórico antes del ITI, no se ha podido establecer un punto de corte de buen

pronóstico. Se aprecian peores resultados en los pacientes con mayores títulos, sin embargo, la serie incluye 4 pacientes con título máximo <10 UB/mL, que no consiguen el éxito.

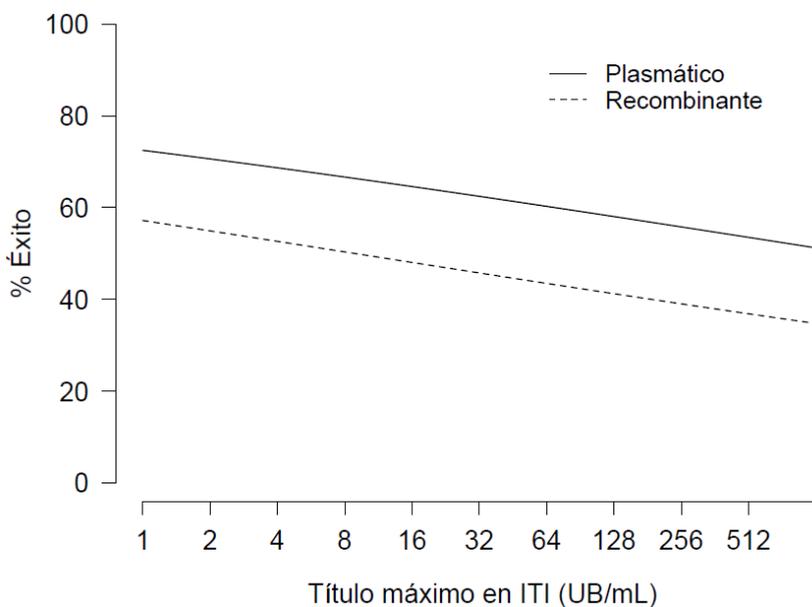


Figura 3. Representación de los resultados de la regresión logística con penalización L1 (LASSO). En el eje de Y se representa la probabilidad de éxito del tratamiento según los distintos valores de título máximo en ITI y de la utilización de concentrado plasmático o concentrado recombinante.

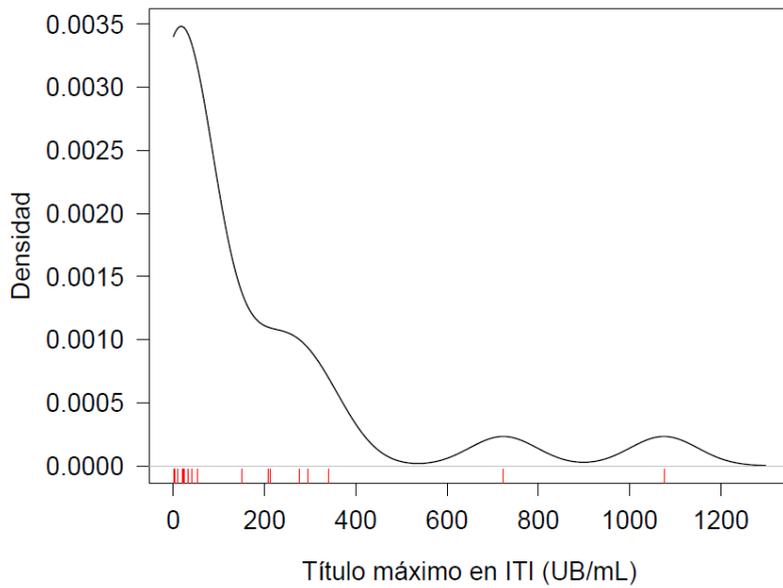


Figura 4. Distribución de los valores de título máximo en ITI. En la distribución de los valores de título máximo en ITI se observa una clara distribución log-normal, con una cola derecha muy alargada.

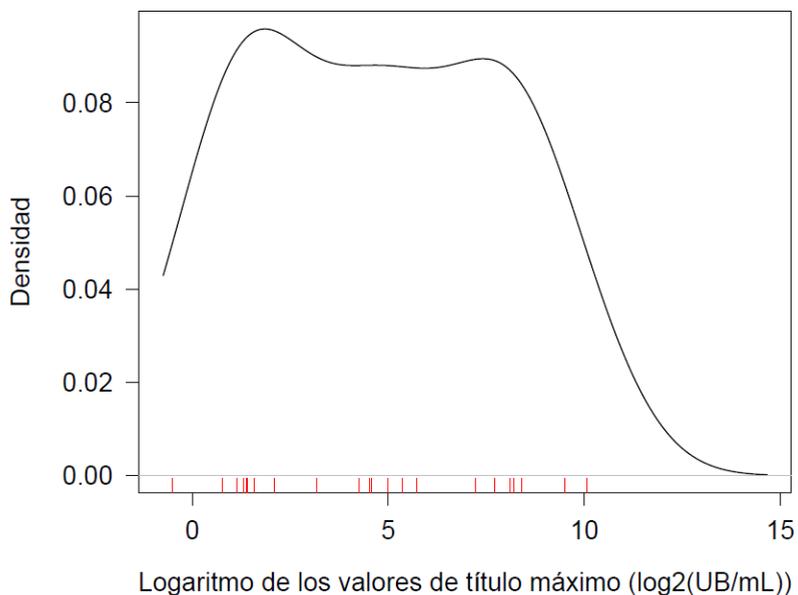


Figura 5. Distribución del logaritmo en base 2 de los valores de título máximo durante el ITI. Se observa cómo la distribución se ha normalizado sensiblemente, siendo mucho más simétrica

Al efectuar el logaritmo del título máximo de inhibidor durante el ITI, se normaliza y se hace más simétrica la distribución de valores del inhibidor durante el ITI. En esta distribución de los valores transformados, como se observa en la figura 5, se puede intuir la presencia de más de un grupo diferenciado en cuanto al valor del título máximo.

En las siguientes gráficas está representado el tiempo de respuesta a los tratamientos en curvas de Kaplan-Meier. De forma global en las figura 6-8. De forma diferenciada en

los tres grupos en los que se había categorizado la dosis del concentrado de factor empleado. Figuras 9-11.

Aplicando el test de Wilcoxon no hay diferencias significativas en el tiempo de tratamiento entre los éxitos y los fracasos.

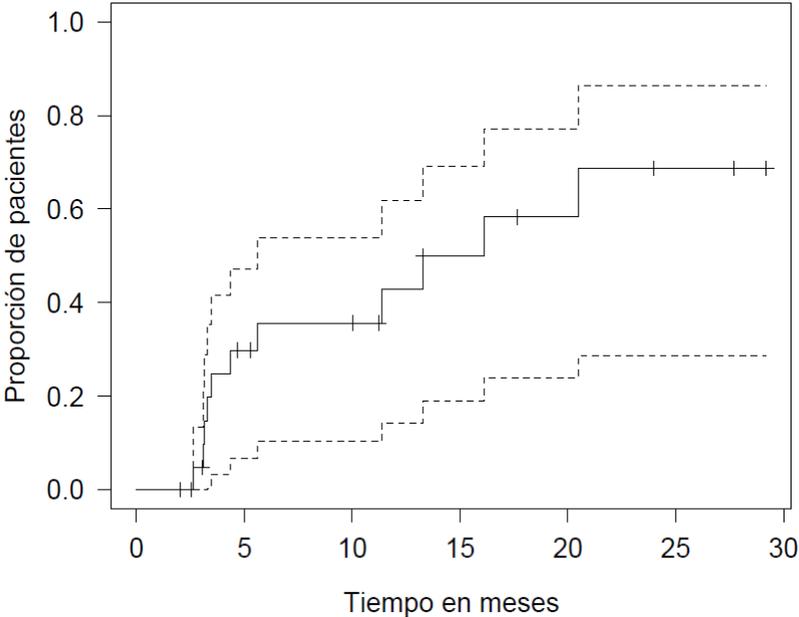


Figura 6. Tiempo hasta que el inhibidor es negativo

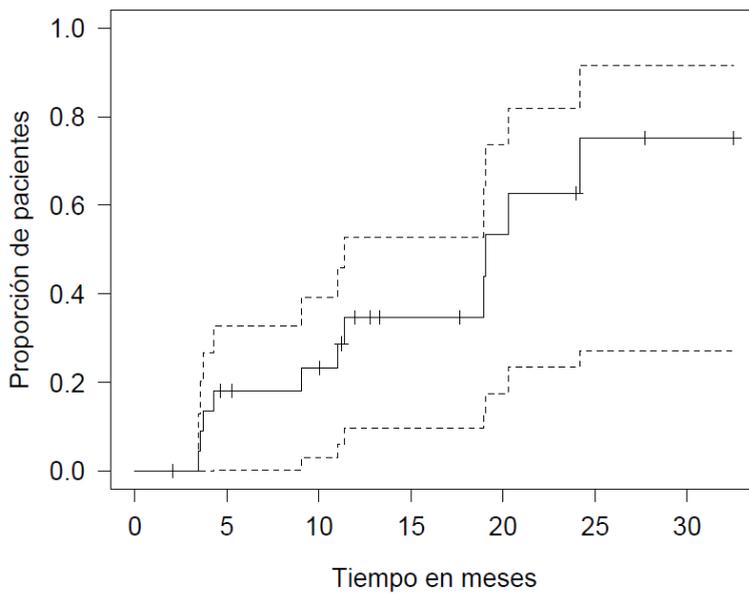


Figura 7. Tiempo hasta que la recuperación es normal

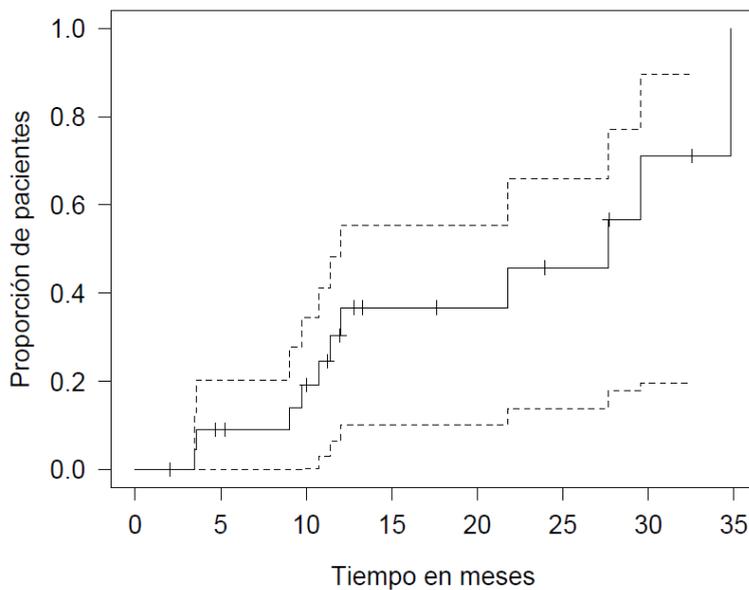


Figura 8. Tiempo hasta que la vida media es normal

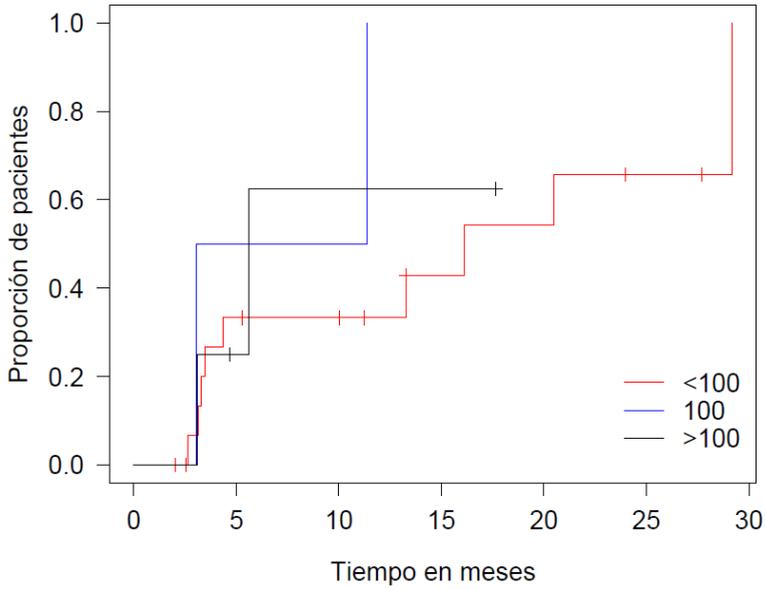


Figura 9. Tiempo hasta que el inhibidor es negativo dependiendo de la dosis empleada

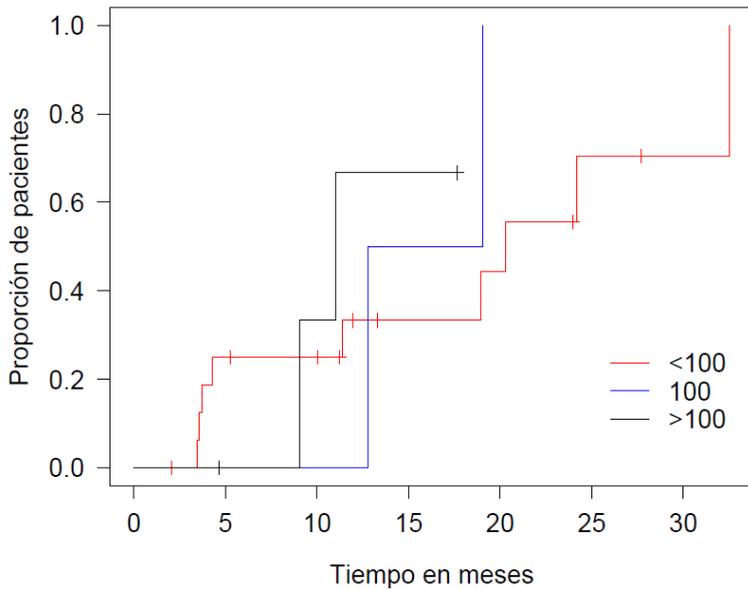


Figura 10. Tiempo hasta que la recuperación es normal dependiendo de la dosis empleada

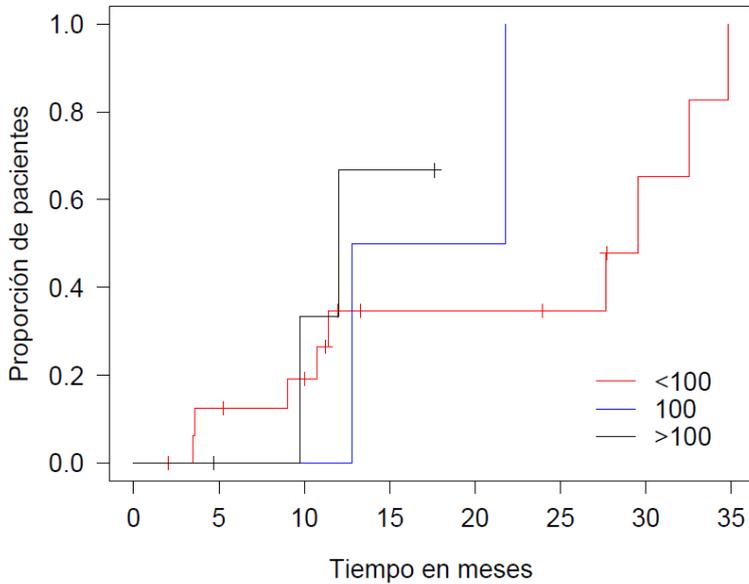


Figura 11. Tiempo hasta que la vida media es normal dependiendo de la dosis empleada

A aquellos pacientes que no consiguen la inmunotolerancia en los primeros tratamientos, se les somete a lo que se considera tratamiento de rescate, que consiste en: aumento de la dosis empleada en el ITI, cambio a un pdFVIII/VW en el caso de que no lo llevara en la primera línea e incluso, asociación de inmunosupresión. Los pacientes que recibieron corticoides al final de las primeras líneas de ITI, no los consideramos rescate porque se aplicaron cuando el paciente estaba respondiendo para acelerar la fase final del tratamiento. Los pacientes 4 y 6 son pacientes antiguos que no efectuaron rescate. El paciente 20

no continuó con el rescate por un problema de vías y las circunstancias del paciente, parálisis cerebral infantil tras haber sufrido una hemorragia cerebral neonatal. Dado que se trata de pocos pacientes con los que no se puede realizar estadísticas, hemos preferido exponerlos como casos clínicos y resumir los datos fundamentales en la tabla 14.

Tabla 14. Pacientes con más de una línea de ITI

Paciente	Fecha de nacimiento	Tipo alteración	Tít máx inh histórico <sup>(a)</sup>	Fecha de inicio de ITI	Años al ITI	Demora (meses)	Título pre ITI <sup>(a)</sup>	Tít máx Inh en ITI <sup>(a)</sup>	CFVIII PL/R	Dosis y pauta
10	11/06/1996	Inversión	52	01/07/1996	0	0	52	276	R	200 UI/Kg/día
10	11/06/1996	Inversión	276	07/05/1997	0		28,8	153	PL	200 UI/Kg/día
10	11/06/1996	Inversión	276	10/08/2006	10		3	1780	PL	190 UI/Kg/día
12	09/11/2001	Inversión	6,6	25/04/2005	3	12	2,6	723	PL	50 UI/Kg/3 x sem
12	09/11/2001	Inversión	723	20/02/2006	4		7,4	8	PL	200 UI/Kg/día
15	12/03/2004	Sitio corte-empalme	4	06/02/2008	4	0	2	1,7	R	50 UI/Kg/día
15	12/03/2004	Sitio corte-empalme	4	07/04/2008	4		0,4	0,93	R	200 UI/Kg/día
15	12/03/2004	Sitio corte-empalme	4	05/05/2008	4		1,13	1,74	PL	200 UI/Kg/día
17	14/11/2005	Inversión	11	23/07/2007	1	5	4	239	R	50 UI/Kg/3 x sem
17	14/11/2005	Inversión	239	25/08/2008	2		130	131	PL	50 UI/Kg/3 x sem
17	14/11/2005	Inversión	239	25/03/2009	4		2,2	15	PL	200 UI/Kg/3x sem
17	14/11/2005	Inversión	239	14/12/2010	5		2,5	15	PL	150 UI/Kg/día
17	14/11/2005	Inversión	239	22/02/2012	6		9,8	109,6	PL	200 UI/Kg/día
18	14/06/2008	inversión	134	25/05/2011	3	10	4,6	340	R	50 UI/Kg/3 x sem
18	14/06/2008	inversión	340	13/05/2013	4		13,5	16,2	R	190 UI/Kg/3 x sem
18	14/06/2008	inversión	340	16/09/2013	5		16,2	17,3	PL	190 UI/Kg/3 x sem
22	07/08/2010	Inversión	9,5	21/02/2012	1	1	9,5	2,5	R	200 UI/kg/3x sem
22	07/08/2010	Inversión	9,5	14/02/2013	2		2,5	0,8	PL	200 UI/Kg/3x sem
22	07/08/2010	Inversión	9,5	01/06/2014	3		0,6	0	PL	160 UI/Kg/día
23	30/06/2011	Inversión	5,6	13/12/2012	1	0	5,6	23,7	PL	100 UI/Kg/día
23	30/06/2011	Inversión	24	20/05/2013	2		14,4	14,4	PL	200 UI/Kg/día

<sup>(a)</sup>: UB/mL, Tít max inh: título máximo de inhibidor, CFVIII PL/R: concentrado de FVIII plasmáticos/recombinante, 3 x sem: tres días por semana

Tabla 14 (continuación). Pacientes con más de una línea de tratamiento

Paciente	Tto concomitante	Fármaco	Profilaxis antihemorrágica en ITI	Número de episodios hemorrágicos durante ITI	Fecha de finalización del ITI	Se produjo recidiva	Acceso venoso central	Infección AVC	Resultado	Fecha del último control
10	Si	Ig	No	1	07/05/1997		Si	Si	3	07/05/1997
10	No		No	1	12/12/1997		Si	Si	3	12/12/1997
10	Si	RITUX + Cortic	Si	38	17/02/2012		No	No	2	26/06/2015
12	No		No	17	20/02/2006		No	No	3	20/02/2006
12	Si	Ig + Cortic	Si	4	14/02/2008	Si	No	No	1	15/06/2015
15	No		No	2	07/04/2008		No	No	3	07/04/2008
15	No		No	1	05/05/2008		No	No	3	05/05/2008
15	No		No	2	08/07/2009	No	No	No	1	12/05/2015
17	No		Si	16	25/08/2008		No	No	3	18/08/2008
17	No		Si	35	25/03/2009		No	No	3	25/03/2009
17	Si	Ig + Cortic	Si	8	14/12/2010		No	No	3	14/12/2010
17	No		No	2	10/05/2011		No	No	3	10/05/2011
17	Si	RITUX + Cortic	No	12	04/11/2014		No	No	2	07/07/2015
18	No		Si	13	13/05/2013		No	No	3	13/05/2013
18	No		Si	2	16/09/2013		No	No	3	16/09/2013
18	No		Si	1			No	No	4	08/07/2015
22	No		No	2	14/02/2013		No	No	3	14/02/2013
22	No		No	6	01/06/2014	No	No	No	1	01/06/2014
22	No		No	0	01/06/2015	No	No	No	1	10/07/2015
23	No		Si	4	20/05/2013		No	No	3	20/05/2013
23	No		Si	2			Si	Si	4	19/06/2015

Tto: tratamientos, Resultado: 1: éxito, 2: cambio de inmunorrespuesta, 3: fracaso, 4: sigue en tratamiento; Ig: inmunoglobulinas, RITUX: Rituximab, Cortic: corticoides, AVC: acceso venoso central.

### **V.3 Tratamiento de inmunotolerancia de rescate**

De los 10 pacientes que fracasaron a la primera línea de ITI, se les aplicó tratamiento de rescate a 7, al menos en una ocasión. Un paciente ha efectuado 5 líneas de ITI, lo cual supone cuatro rescates. La mayoría de los rescates o bien fueron aumento de la dosis o bien cambio a un pdFVIII/FVW. Sólo en dos pacientes se utilizó rituximab con corticoides, los corticoides en estos casos se aplicaron al principio del tratamiento.

De los 7 pacientes que recibieron tratamiento de rescate, 2 todavía están en tratamiento, por tanto, aún no se sabe si conseguirán el éxito.

De los 5 pacientes que han finalizado el tratamiento, los pacientes 10 y 17 han pasado a ser bajos respondedores, estos son los tratados con rituximab.

Los pacientes 12, 15 y 22 consiguieron el éxito.

En la serie completa se incluyen un total de 12 tratamientos de rescate.

A continuación se describen los aspectos más relevantes de los diferentes ITI de rescate que han efectuado estos pacientes.

### **V.3.1. Paciente 10.**

Hemofílico A grave de origen caucásico. El paciente porta la inversión en el intrón 22 del gen *F8*.

Recibió 2 tratamientos de rescate. El primero fue a continuación de la primera línea, sin solución de continuidad, se cambió de rFVIII a pdFVIII/FVW, continuando a dosis alta. Se suspendió a los 7 meses por falta de respuesta. En total en estos dos tratamientos estuvo 17 meses.

El niño permaneció durante más de 8 años en tratamiento a demanda con rFVIIa, con múltiples episodios hemorrágicos y sin negativizar el inhibidor, permaneciendo durante años en valores de 15-20 UB/mL. En 2006 a la edad de 10 años, por su gran morbilidad hemorrágica con importante dependencia del hospital y el descenso del título de inhibidor por debajo de 5 UB/mL, nos planteamos el efectuar una segunda línea de rescate con inmunosupresión, rituximab y corticoides.

Se efectuó caracterización de los epítomos del inhibidor del paciente; el inhibidor estaba dirigido frente a A1 (débil), A2 y CL de la molécula del FVIII.

En agosto de 2006 se inició el tratamiento con un título de inhibidor de 3 UB/mL, utilizando rituximab 375 mg/m<sup>2</sup>/semanales durante 4 semanas y luego nueve dosis más administradas mensualmente; metilprednisolona 0.75 mg/kg/día durante 4 semanas con descenso paulatino posterior y pdFVIII/FVW, Fanhdi®, a dosis de 200 UI/kg/día.

Figura 12. Se produjo un pico de inhibidor de 1800 UB/mL, con un descenso progresivo de forma paulatina. El paciente empezó a experimentar reacciones cutáneas tipo urticariforme; esto nos obligó a descender la dosis de factor. En febrero/2007 se pasó a administrar igual dosis tres veces por semana, con mejoría de las reacciones. No obstante, ante la persistencia de la sintomatología, se continuó descendiendo la dosis de factor: el 25/05/07 se pasó a 100 UI/kg con igual cadencia, tres dosis semanales. Dado que las reacciones no desaparecían decidimos cambiar, el 05/05/2008, a un factor de similares características pero con menor contenido de albúmina, Octanate®. La hipótesis era, que como el primer factor lleva albúmina sobreañadida para su estabilización, el exceso de albúmina originado en plasma produjese las reacciones. Con el cambio casi llegaron a desaparecer. Desde la aparición de las reacciones cutáneas, siempre se ha expuesto al factor premedicándolo con antihistamínicos.

Desde 28/07/08 el paciente está con 50 UI/kg de Octanate® tres días por semana, el inhibidor está siempre por debajo de 2 UB/mL y en alguna determinación ha sido negativo. El número de episodios hemorrágicos ha pasado a ser menor de 3 al año y podemos controlarlos con FVIII a dosis altas, con gran independencia del hospital e importante mejora de la calidad de vida.

Por ello se considera que el paciente ha conseguido un cambio de inmunorrespuesta, pasando de alto a bajo respondedor.

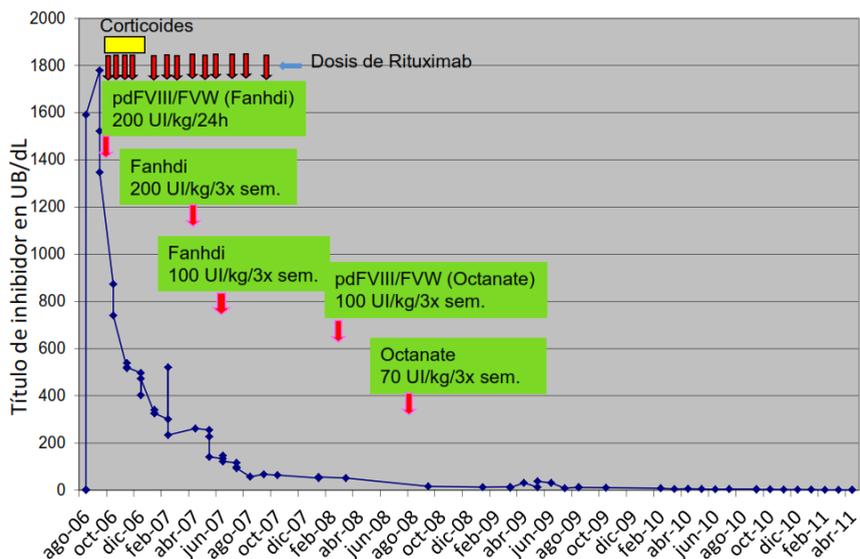


Figura 12. Paciente 10. Evolución del título de inhibidor

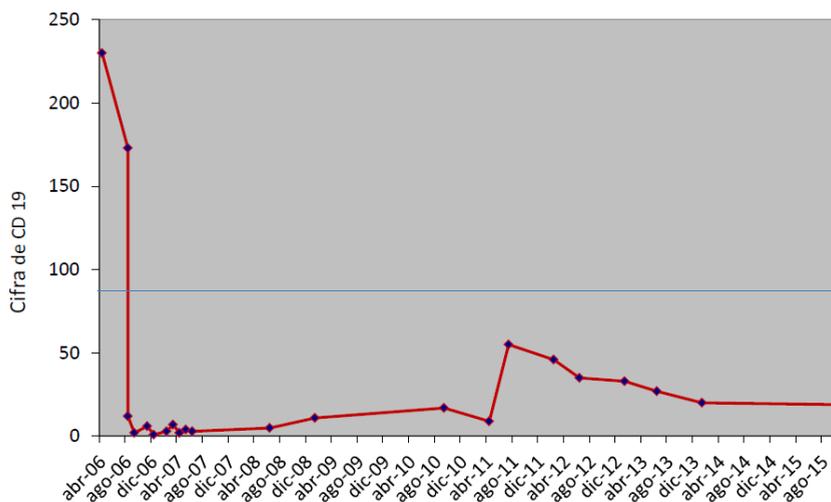


Figura 13. Paciente 10. Evolución de la cifra de CD19  
 En esta figura podemos ver la evolución de los linfocitos CD19 en este paciente; ocho años después de haber recibido el rituximab no ha recuperado unos valores normales de CD19. La línea azul marca el valor inferior de la normalidad.

### V.3.2. Paciente 12

Hemofílico A grave de origen caucásico árabe. La alteración genética causal es la inversión en el intrón 22. Desarrolló inhibidores a los 2 años tras haber recibido tratamiento sustitutivo intensivo por una cirugía inguinal con importante hematoma.

El título máximo antes de la inmunotolerancia fue de 6,6 UB/mL. La caracterización epitópica del inhibidor mostró que los anticuerpos estaban dirigidos frente al dominio A2 y la cadena ligera. Un año después de la detección y con un título de 2 UB/mL, se inició el ITI con pdFVIII/FVW, Fanhdi®, con una dosis de 50 UI/Kg, tres días por semana. No se

utilizó reservorio, el factor se infundió en todo momento por venas periféricas. A las 2 semanas del inicio llegó a un pico de inhibidor de 723 UB/mL. Durante 7 meses se produjo un descenso paulatino hasta 10 UB/mL, permaneciendo sin cambios durante los 3 meses siguientes. Por esto, junto con la persistencia de hemartros repetidos de tobillos, se aumentó la dosis a 200 UI/Kg tres días por semana. Con esta cadencia era más fácil seguir administrando el factor por vía periférica. En dos meses el título bajó a 2 UB/mL y desaparecieron los sangrados. Durante 11 meses tuvo similar título de inhibidor. Se añadió tratamiento con Inmunoglobulinas, 1g/Kg/día dos días y prednisona 1,5 mg/kg durante 3 semanas, además de la pauta de descenso. A las dos semanas del tratamiento esteroideo el inhibidor se negativizó, pero al finalizar los corticoides volvió a tener un título de 1,6 UB/mL. Con similar dosis de FVIII, en 4 meses nuevamente el inhibidor fue negativo; un mes más tarde la recuperación del FVIII fue normal y 2 meses después se normalizó la vida media. Figuras 12 y 13. Después el paciente siguió en profilaxis y un año después de finalizar el ITI, la vida media permanecía normal. El 28/05/2010, 2 años y 3 meses después de conseguir la inmunotolerancia se produjo una recidiva con un título de inhibidor de 0,9 UB/mL. Se aumentó la dosis del factor a 100 UI/kg, inicialmente diario, hasta corregir un hematoma en antebrazo izquierdo y, posteriormente, se pasó a tres días por semana, volviendo a

conseguir la tolerancia al cabo de tres meses. En mayo de 2011 se empezó el descenso de la dosis de profilaxis hasta dejarla en dosis habituales de 30-35 UI/kg tres días por semana. Actualmente, está con 26 UI/kg tres días por semana y muy buena situación clínica.

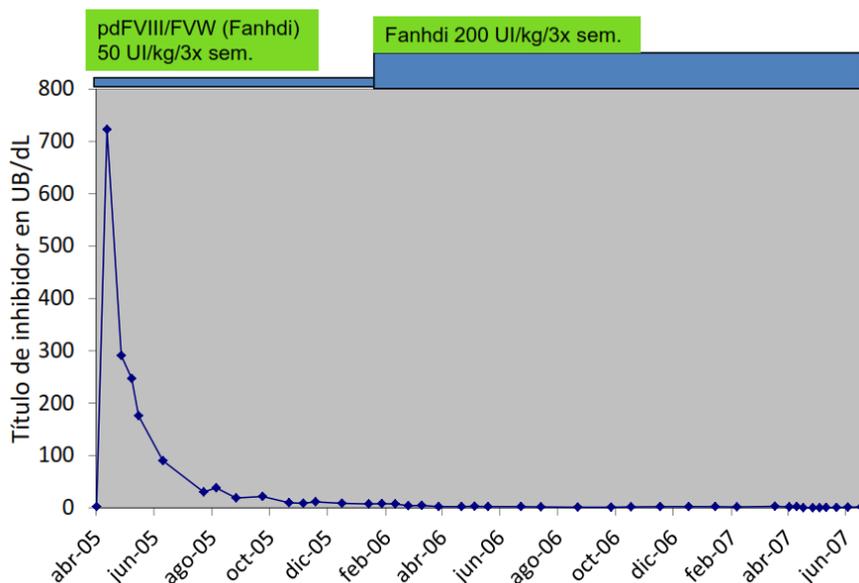


Figura 14. Paciente 12. Evolución del título de inhibidor

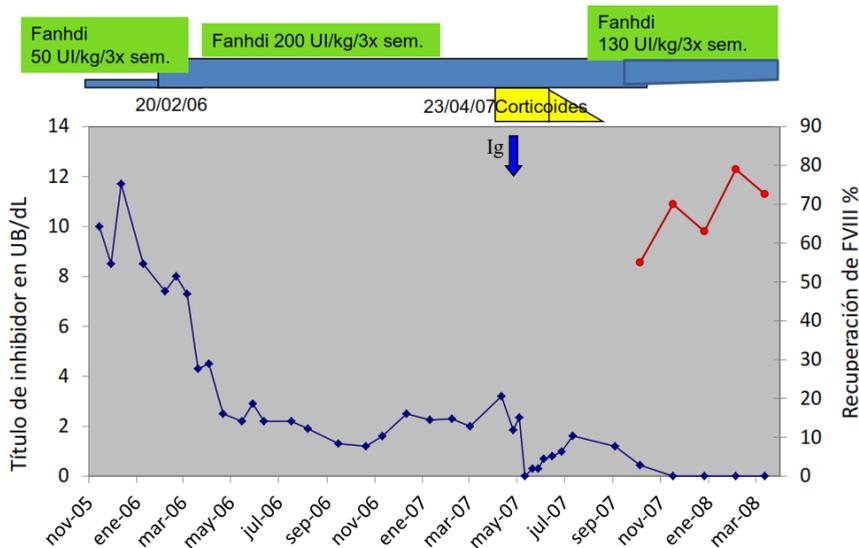


Figura 15. Paciente 12. Evolución del título de inhibidor y recuperación del FVIII

### V.3.3. Paciente 15

Hemofílico A grave de origen caucásico sudamericano. El paciente tiene una mutación en el lugar de procesamiento del mRNA, mutación sitio corte-empalme. Diagnosticado a los 3 meses en su país por un hematoma torácico. Fue tratado en pocas ocasiones en su país con producto plasmático y crioprecipitados. A la llegada a nuestra Unidad se le trató un hemartros de tobillo izquierdo por lo que recibió 7 dosis de rFVIII, Helixate®. Luego inició la profilaxis con administración de factor dos veces por semana, y tras otras 7 dosis se detectó la presencia del inhibidor. Curiosamente, el inhibidor de este paciente mostraba una cinética tipo 2, similar a lo que se ve en la hemofilia adquirida; ha sido el

único inhibidor de la serie que ha mostrado esta cinética. El título máximo de inhibidor fue de 4 UB/mL. En este paciente se inició el ITI con dosis bajas de FVIII, 50 UI/kg tres días por semana, con el mismo producto recombinante que inició el tratamiento en nuestro país. En dos meses se le aumentó la dosis a 200 UI/kg y un mes más tarde del primer cambio, se le pasó a pdFVIII/FVW, Fanhdi® a similar dosis. Figura 16. En este paciente, dada la rapidez de los cambios, se podría considerar que no hizo tratamiento de rescate; en realidad no dimos tiempo a ver la eficacia con las primeras líneas terapéuticas, pero por el incremento del título de inhibidor decidimos estos cambios. Siendo realistas, la última línea se puede considerar como su tratamiento de ITI único. En un año consiguió el éxito.

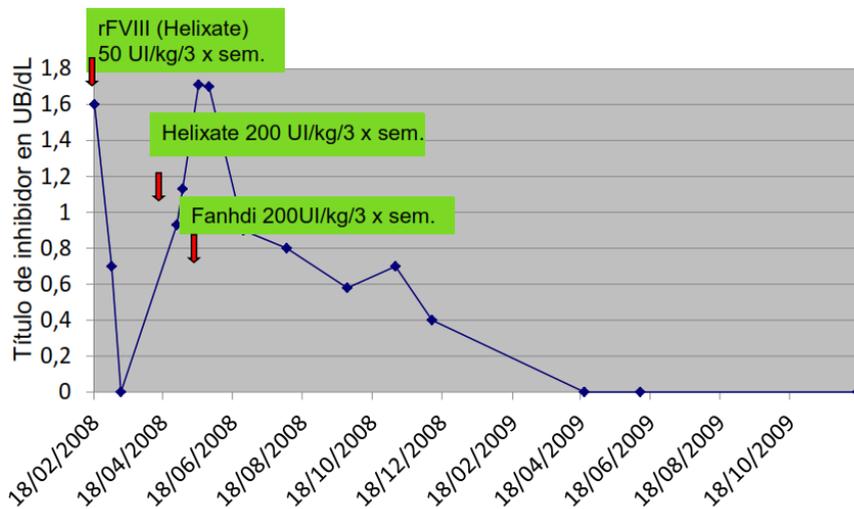


Figura 16. Paciente 15. Evolución del título de inhibidor

#### **V.3.4. Paciente 17**

Hemofílico A grave de origen caucásico y portador de la inversión del intrón 22. Recibió la primera exposición al rFVIII, Helixate® a los 12 meses de vida y se detectó el inhibidor después de tres días de exposición. El título máximo histórico antes de iniciar el ITI fue de 11 UB/mL. La caracterización epitópica indicó que los anticuerpos iban dirigidos frente a los dominios A1 (débil) + A2 + CL. Cinco meses después de la detección del inhibidor y con un título pre-ITI de 4,7 UB/mL, se inició el tratamiento con el producto recombinante que desarrolló el inhibidor a dosis bajas, 50 UI/kg tres días por semana. Este paciente fue incluido en el ensayo clínico internacional de tratamiento prospectivo de inmunotolerancia, ITI Study. Se produjo un pico de inhibidor máximo durante el ITI de 209 UB/mL y, aunque inicialmente se observó un descenso progresivo del inhibidor, después pasó a una fase plató; por este motivo, a los 13 meses de tratamiento, decidimos cambiar a un pdFVIII/FVW, Fanhdi®, con la misma dosis que con el concentrado previo. Tras el cambio se produjo un descenso progresivo del inhibidor sin llegar a negativizarse por completo, motivo por el cual, 7 meses más tarde del primer cambio, 25/03/09, decidimos aumentar la dosis de factor a 200 UI/kg tres días por semana. Durante esos meses el paciente sólo había presentado 2 hemartros. Con el aumento de dosis, se consiguió más descenso del título, pero volviendo a hacer

plató entre 7 y 23 UB/mL. Esto motivó que 11 meses después, 24/02/10, se decidiera administrar un ciclo de corticoides, (prednisona 1,3 mg/kg/día durante 3 semanas, más el descenso paulatino posterior). Tras el tratamiento de esteroides, se consiguió un valor de inhibidor de 0,7 UB/mL, pero con posterioridad aumentó ligeramente, por lo cual se decidió administrar, en mayo y septiembre de 2010, inmunoglobulinas 2g/kg repartidos en dos días y, después de la dosis de septiembre, 1g/kg/21días durante 6 meses. En diciembre de 2010, se aumentó la cadencia de las administraciones, 150 UI/kg/día, con negativización transitoria del inhibidor. Ante el incremento posterior del título y picos febriles tras la administración del factor, se suspendió esta tanda de ITI en mayo de 2011. El paciente no llevaba AVC. Toda la evolución se puede observar en las figuras 17 y 18.

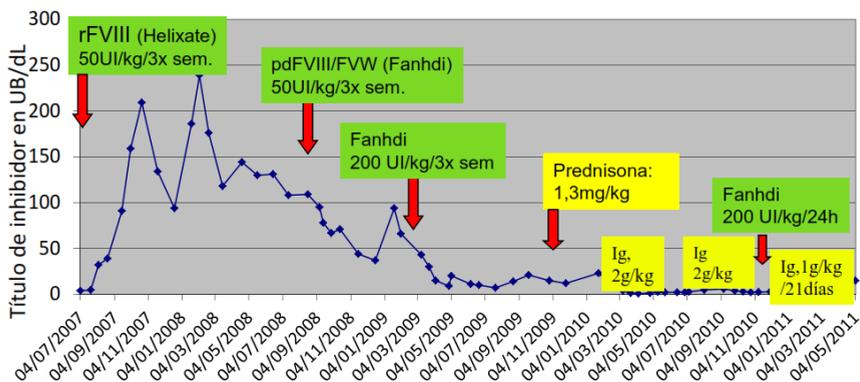


Figura 17. Paciente 17. Evolución del título de inhibidor

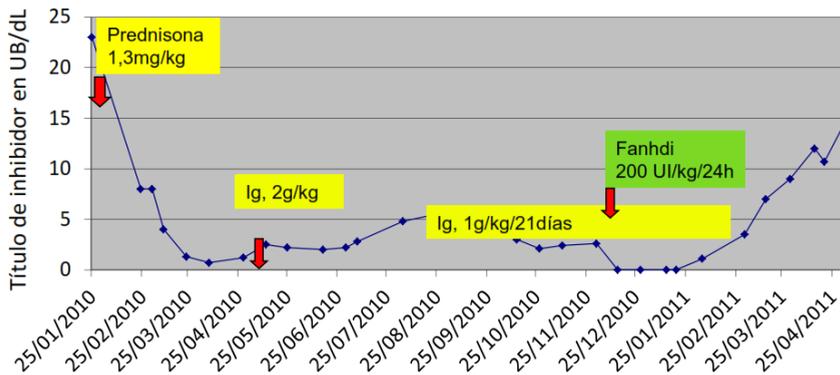


Figura 18. Paciente 17. Evolución del título de inhibidor

El 22/02/12 se inició la quinta línea de ITI utilizando rituximab. Recibió cuatro dosis semanales de rituximab, 375 mg/m<sup>2</sup> y corticoides; prednisona 1 mg/kg/día durante 5 días y FVIII, Fanhdi®, a 200 UI/kg/día. Se produjo un pico de inhibidor de 110 UB/mL con descenso posterior rápido; en 2 meses el inhibidor era negativo y los valores valle de FVIII superiores a 50 UI/dL. Se comenzó a disminuir progresivamente la dosis de FVIII, hasta 75 UI/kg/día con la que se produjo un claro descenso de los valores de FVIII, motivo por el cual se le dio una dosis adicional de rituximab el 26/11/2012. El 17/12/2012 se le pasó a 110 UI/kg/48h y desde el 17/01/2013 está con 4000 UI/48h (en ese momento 140 UI/kg y actualmente 125 UI/kg). Los valores valle en los últimos diez meses están estables entre 5-7 UI/dL, por tanto se consideró una respuesta parcial, desde noviembre de 2014. Figura 19.

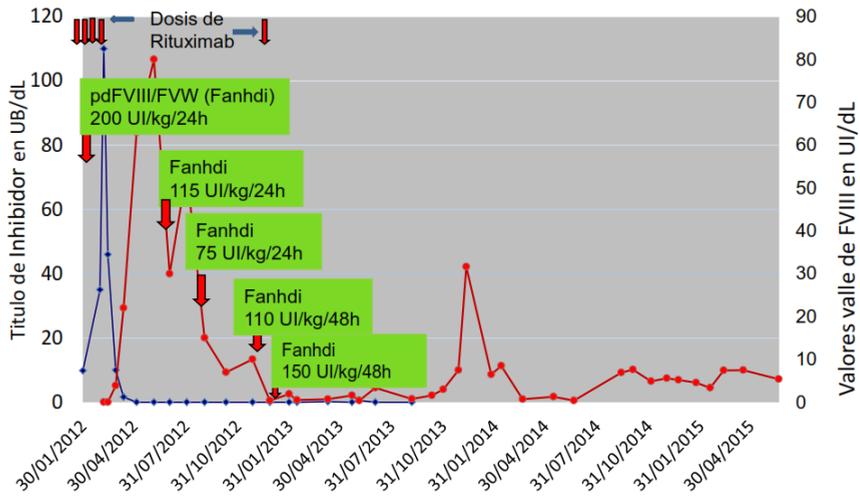


Figura 19. Paciente 17. Evolución del título de inhibidor y valores de FVIII valle

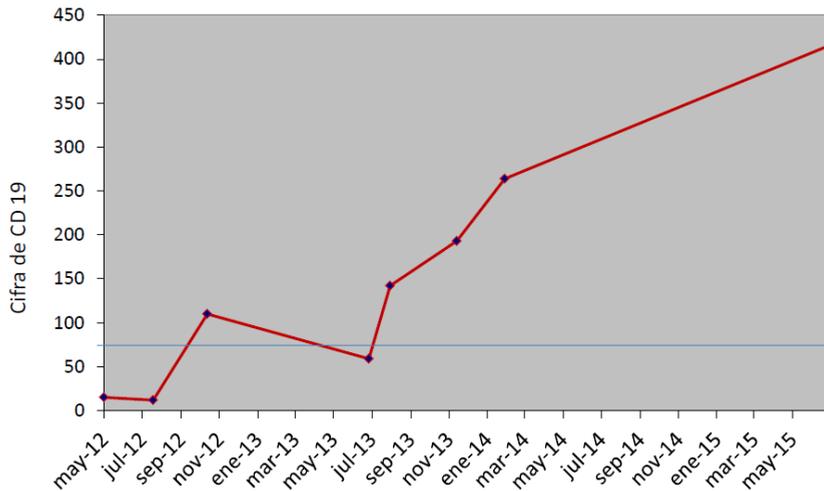


Figura 20. Paciente 17. Evolución de la cifra de linfocitos CD 19. En esta figura podemos ver la evolución de los linfocitos CD19, en la que se aprecia una recuperación de los valores normales a los 8 meses de las dosis de rituximab. La línea azul marca el valor inferior de la normalidad.

### **V.3.5. Paciente 18**

Hemofílico A grave de origen caucásico sudamericano. El paciente porta la inversión del intrón 22 en el gen *F8*. Además presenta trisomía del cromosoma 21.

El paciente inició profilaxis con FVIII, Refacto®, 30 UI/kg una vez por semana, y desarrolló el inhibidor tras 4 días de exposición. El título máximo histórico fue de 134 UB/mL. El estudio de epítomos mostró que el inhibidor tenía especificidad frente al dominio A2 y cadena ligera.

Se inició la primera línea de ITI a los 3 años, el 19/05/11, con un título pre ITI de 4,6 UB/mL. Se utilizó el mismo concentrado de factor recombinante con el que desarrolló el inhibidor y a dosis bajas, 50 UI/kg tres días por semana, con administraciones por acceso venoso periférico. Se produjo un título máximo durante el ITI de 340 UB/mL.

Dos años después y con un título de inhibidor de 13,5 UB/mL, se aumentó la dosis de factor a 190 UI/kg tres días por semana, y ante la no variación del título de inhibidor, 4 meses más tarde se cambió a pdFVIII/FVW a similar dosis. Con este cambio se produjo un descenso progresivo del título de inhibidor. En el momento actual, 20 meses más tarde del segundo cambio, el título es negativo, aunque la vida media todavía no se ha recuperado; por tanto, se considera que sigue en tratamiento y no es evaluable todavía.

Este paciente presentó pocos eventos hemorrágicos, sólo un hemartros en rodilla y sangrados gingivales; además de tres golpes en la cabeza por los que se le puso rFVIIa. Durante el ITI recibió tratamiento profiláctico con rFVIIa.

No ha recibido inmunosupresión.

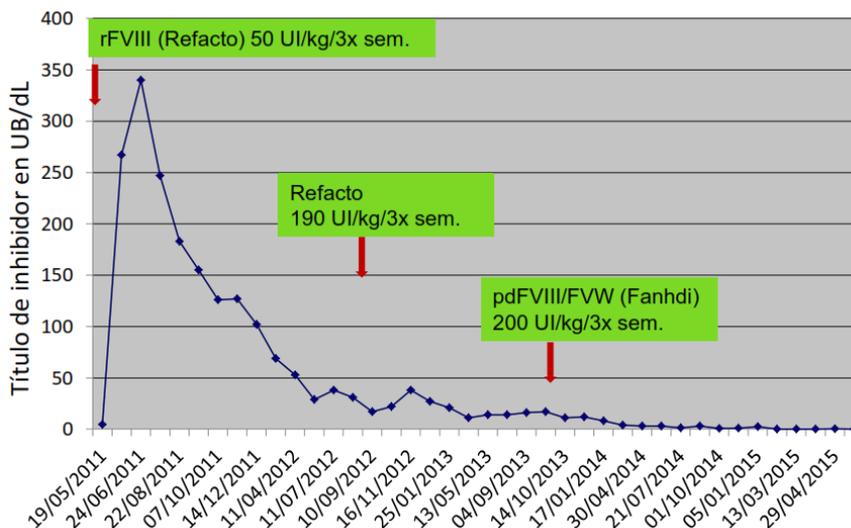


Figura 21. Paciente 18. Evolución del título de inhibidor

### V.3.6. Paciente 22

Hemofílico A grave de origen caucásico árabe, porta la inversión del intrón 22 en el gen *F8*.

El paciente fue incluido en el ensayo clínico de Refacto AF de Pfizer-4434 para pacientes previamente no tratados. Recibió una dosis inicial de 50 UI/kg para efectuar recuperación y después profilaxis con una dosis de 25 UI/kg administrada una vez por semana. Desarrolló inhibidores

tras 12 días de exposición. En el estudio epitópico presentaba especificidad frente a cadena ligera. El título máximo histórico fue de 9,5 UB/mL, por ello iniciamos el ITI, nada más detectar y confirmar la presencia del inhibidor. Se empleó una dosis de 200 UI/kg tres días por semana para no utilizar acceso venoso central. El factor utilizado fue Refacto®, el mismo producto con el que desarrolló el inhibidor. Se produjo un descenso del título sin llegar a conseguir la completa negativización; por ello, un año más tarde, decidimos pasarlo a pdFVIII/FVW, Fanhdi®, a similar dosis. Con este producto conseguimos la negativización del inhibidor, pero sin llegar a normalizar la vida media. En junio de 2014, 16 meses después del primer cambio, se pasó a régimen de administraciones diarias de 160 UI/kg, consiguiéndose la normalización de la vida media. En estos momentos, el paciente sigue tratamiento con 47 UI/kg a días alternos y presenta un FVIII valle a las 48h de 8 UI/dL; por tanto con estos valores se considera que ha conseguido la inmunotolerancia.

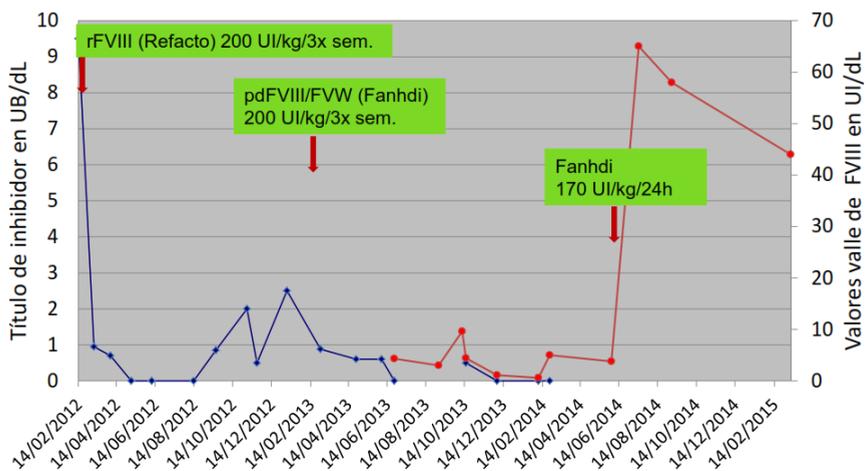


Figura 22. Paciente 22. Evolución del título de inhibidor y valores valle de FVIII

### V.3.7. Paciente 23

Hemofílico A grave de origen caucásico europeo, porta la inversión del intrón 22 en el gen *F8*.

Inició su tratamiento con pdFVIII/FVW, Fanhdi®, en profilaxis con dosis de 30 UI/kg una vez por semana. Desarrolló el inhibidor tras 11 días de exposición con un título máximo histórico de 5,6 UB/mL. El estudio epitópico mostró especificidad frente a dominio A2. Se inició el ITI el 13/12/2012 con el mismo producto, Fanhdi®, a la dosis de 100 UI/kg tres días por semana, con un pico máximo de inhibidor de 11,5 UB/mL y descenso posterior. El 25/04/2013 sufrió un hematoma subdural postraumático y fue tratado con rFVIIa. Tras este episodio el título de inhibidor subió hasta 23,7 UB/mL. Se le colocó un AVC y se le aumentó la dosis a 200 UI/kg/día. Durante los primeros meses se

mantuvo en profilaxis con rFVIIa hasta que se suspendió el 25/06/2013 al llegar el título de inhibidor a 1 UB/mL. Durante 18 meses el título de inhibidor ha estado entre 1-3 UB/mL. Ha presentado dos episodios febriles con aislamiento de staphilococcus coagulasa negativo, bien controlado con los antibióticos habituales. También se detectó colonización del catéter en dos ocasiones por staphilococcus coagulasa negativo y micrococcus luteus, que fueron eliminadas con sellados de daptomicina. Después del hematoma subdural, no ha presentado episodios hemorrágicos. En las dos últimas determinaciones, el inhibidor ha sido negativo pero la vida media todavía está acortada. Figura 24.

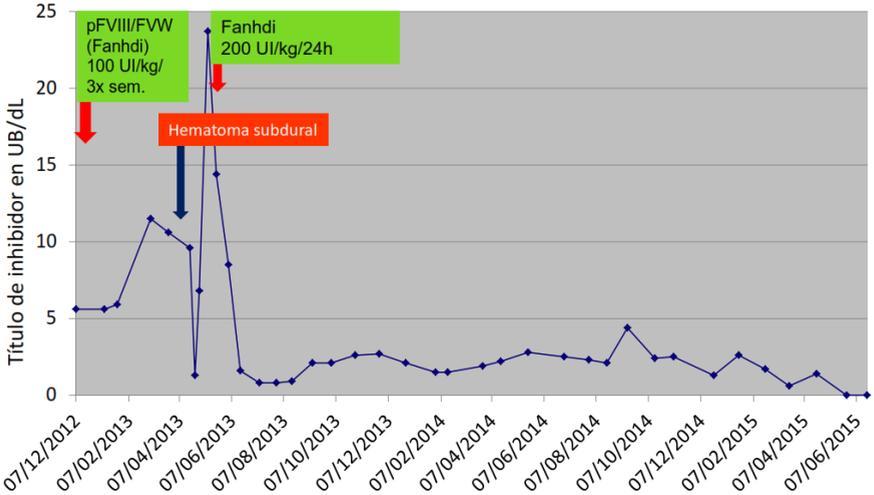


Figura 23. Paciente 23. Evolución del título de inhibidor

Se puede concluir que hay 7 pacientes que efectúan más de una línea de tratamiento, de los cuales 2 todavía están en ITI. Tres pacientes han conseguido el éxito y dos han alcanzado un éxito parcial con cambio de inmunorrespuesta.

Si tenemos en cuenta todas las líneas de ITI, dos pacientes están todavía en tratamiento, por tanto el total a considerar sería de 21 pacientes. De este conjunto 76,2% (16/21) consiguen la erradicación del inhibidor, 9,5 % (2/21) consiguen éxito parcial y 14,3% (3/21) fracasan.

En resumen, en nuestra serie se consigue éxito o éxito parcial en más del 85% de los pacientes; todos ellos siguen tratamiento profiláctico con concentrados de FVIII. Sólo tres pacientes mostraron inhibidor permanente. Uno falleció por hepatocarcinoma, otro está en tratamiento profiláctico con producto baipás y el tercero cambió de centro, actualmente sigue tratamiento con producto baipás a la demanda.

## VI. DISCUSIÓN

La aparición de los inhibidores se describió desde la época de las transfusiones de sangre total<sup>25,26</sup>; el problema se hizo más patente desde la utilización de los concentrados de FVIII. Actualmente, es la complicación más temida en la hemofilia A; condiciona el tratamiento y la calidad de vida de los hemofílicos e incluso su esperanza de vida.

La única estrategia probada hasta ahora para conseguir la tolerancia al FVIII exógeno ha sido el tratamiento de inducción de inmunotolerancia. Estos tratamientos están basados en la exposición al factor desencadenante de forma más o menos intensiva y continuada. Este tratamiento se mantiene hasta que la recuperación y la vida media del factor infundido sean normales; es entonces cuando se considera que el paciente es tolerante al producto administrado. Si esto se consigue, los tratamientos sustitutivos habituales se pueden volver a aplicar, tanto para manejar los episodios hemorrágicos como para prevenir su aparición, lo cual conlleva una gran mejoría en la calidad de vida de estos pacientes.

La gran mayoría de nuestros conocimientos actuales en relación a los ITI están basados en estudios de pequeñas cohortes y de registros retrospectivos nacionales e internacionales. Además, solo existe un ensayo clínico aleatorizado, conocido como *ITI Study*<sup>92</sup>.

En el presente trabajo se han recopilado los datos obtenidos de todos los pacientes sometidos a ITI en un único centro, la Unidad de Coagulopatías Congénitas de la Comunidad Valenciana, Unitat d'Hemostàsia i Trombosi, Servei d'Hematologia, Hospital Universitari i Politècnic La Fe de València, realizados desde 1980 hasta 2015. Los pacientes que están actualmente en primera línea de ITI no se han incluido.

Los estudios aleatorizados son los que proporcionan información más precisa; sin embargo, dado que la complicación analizada en este estudio es poco frecuente, aunque muy grave, resulta difícil llevar a cabo este tipo de estudios.

Nuestro trabajo recoge los datos de forma mixta, retrospectiva y prospectivamente. Se pueden señalar dos limitaciones principales: (i) el bajo número de pacientes dado que pertenecen a un solo centro, (ii) que casi la mitad de los datos son retrospectivos. Por el contrario, la principal ventaja es que no hay selección de pacientes, por lo tanto, todos los datos se han recogido de forma consecutiva. Además, todos ellos provienen de una unidad de referencia que ha seguido una dinámica de trabajo similar a lo largo de los años, con bases informáticas desde hace 20 años, lo cual proporciona datos más robustos y uniformes que si tuvieran diferente procedencia.

La tasa de respuesta en primera línea ha resultado ser en nuestro estudio de 57%, menor que la presentada en otras series y registros<sup>66-68;70;74;76;78;91-93;95;108;109;141-144</sup>, la cual varía entre 62,5%-100%. Una de las posibles causas es que en nuestra serie están incluido todos los pacientes de forma consecutiva, por tanto se puede considerar casi como un grupo con intención de tratamiento, en los trabajos cuando se considera la intención de tratamiento la respuesta es mucho menor<sup>92</sup>. Otra razón posible es que algunos cambios efectuados en la dosis o tipo de factor, se realizaron de forma relativamente prematura en dos pacientes, 12 y 15. En el paciente 12 se aumentó la dosis por los numerosos hemartros y por haber hecho una fase plató el descenso del inhibidor. Al paciente 15 se le efectuaron cambios de tratamiento antes de transcurrir tres meses por incremento del título de inhibidor durante más de 2 meses. De haber continuado más tiempo y si se hubiese conseguido el éxito, la tasa de respuesta en primera línea en nuestros pacientes estaría en el 65%.

También se podría ver como posible causa el que, en algunos trabajos la mayoría de los pacientes incluidos tienen un título máximo de inhibidor histórico más bajo que en nuestra serie<sup>70;107</sup>, por tanto, con más posibilidades de conseguir el éxito.

Otro factor que puede influir en las diferencias de resultados, es que algunas publicaciones contemplan un

criterio más laxo para calificar el éxito<sup>70;110;145</sup>, incluido el Registro Norteamericano<sup>76</sup>.

Si tenemos en cuenta las diferentes líneas de tratamiento que han recibido nuestros pacientes, la tasa de respuesta resulta similar e incluso mejor que en otras series; con respuesta completa y cambio de inmunorrespuesta se llega al 85,7%; sólo el 14,3% fracasan, quedando con un inhibidor permanente.

En el análisis estadístico efectuado en nuestra serie, mediante la regresión logística con penalización L1, hay dos variables que influyen significativamente en el éxito; el título máximo de inhibidor durante el ITI, como se aprecia cuando se aplica el logaritmo de esta variable (figura 5), y el tipo de concentrado de factor utilizado.

El título de inhibidor durante el ITI se relaciona de forma inversa con las tasas de éxito. Este punto es coincidente con alguna serie<sup>146</sup>, en el Registro Norteamericano, con el estudio prospectivo ITI Study y en el OBSITI Study <sup>76;92;144</sup>. Esta variable es bastante lógica, al igual que el título máximo histórico de inhibidor, ya que ambas valoran la respuesta de cada paciente al FVIII infundido en cada momento. En nuestro trabajo no se aprecia significación con el título máximo histórico, aunque los peores resultados se han obtenido en los pacientes con mayor título. Posiblemente con un mayor número de pacientes habría resultado significativo, como en la mayoría de registros y series

publicados<sup>70;76;93;107;147</sup>. En el trabajo de Mathias<sup>107</sup> se presenta una serie de 15 pacientes, y las dos variables significativas relacionadas con el éxito son el título máximo de inhibidor y el no demorar el inicio del ITI. Además, los tres pacientes que fracasan tienen un título máximo  $\geq 50$  UB/mL.

La otra variable significativa al analizar nuestros datos, es el tipo de concentrado de factor empleado. Se han obtenido mejores resultados en los pacientes que utilizaron pdFVIII para efectuar el ITI. Todos los pdFVIII a excepción de uno, eran ricos en factor von Willebrand. En el análisis estadístico, el concentrado con FVW aporta una parte prácticamente despreciable, pero como en nuestra serie todos los concentrados plasmáticos, a excepción de uno, contenían FVW, no podemos cuantificar con certeza el poder de esta variable.

El que los mejores resultados se hayan obtenido con el uso de pdFVIII coincide con lo comunicado en otras publicaciones. Este es, posiblemente, el capítulo más controvertido en la literatura.

En dos centros alemanes se apreciaron diferencias importantes desde la introducción de los rFVIII. Desde la llegada de concentrados de FVIII más puros en la década de 1990, se observó un descenso en la tasa de éxito en los ITI. Entre 1979 y 1993, se trataron 21 pacientes con el esquema de Bonn y pdFVIII con alto contenido en FVW, en el Centro de Hemofilia de Frankfurt. La tasa de éxito fue del 91 %.

Desde 1993 a 2001 se trataron 16 pacientes en el mismo centro; dos de ellos recibieron pdFVIII/FVW, consiguiendo el éxito; en los otros 14 pacientes, que recibieron productos de alta pureza sin FVW, sólo 4 (29%) consiguieron el éxito. Cuando a los 10 pacientes que no habían respondido, se les cambió a un concentrado plasmático con alto contenido en FVW, 8 de ellos lograron el éxito después de una mediana de 17 meses (5-36); esto significa un tiempo más largo que el observado en los pacientes tratados antes de 1993<sup>148</sup>. Los datos procedentes de los centros de Bonn y Bremen mostraron la misma tendencia. Antes de la introducción de los productos recombinantes, se trataron 51 pacientes, con una tasa de éxito del 87% (altos respondedores 86% y bajos respondedores 93%). Desde 1990 hasta julio de 2001 se trataron 42 pacientes tanto con productos derivados plasmáticos como con productos de origen recombinante. Los 28 pacientes tratados con productos plasmáticos consiguieron un 82% de éxito, frente al 54% de los 14 pacientes tratados con productos recombinantes<sup>97;149</sup>. La única variable que cambia en estos dos periodos, es el tipo de concentrado utilizado.

En algunas series más pequeñas de hemofílicos con inhibidores en ITI que no respondían al utilizar concentrados de alta pureza, se consiguió el éxito tras cambiar a un concentrado con alto contenido en FVW<sup>96;150;151</sup>. Otros trabajos con pequeñas series también han mostrado buenos

resultados al efectuar los ITI con pdFVIII/VW<sup>53;152</sup>. En el trabajo de Greninger<sup>53</sup>, se trataron 11 pacientes con factores de mal pronóstico; en primera línea de tratamiento, 5 de ellos consiguieron éxito y 2 éxito parcial, mientras que en los 4 pacientes restantes que se trataron en segunda línea, en todos fracasó el ITI a pesar de utilizar dosis altas de 200 UI/kg/24h; estos pacientes habían realizado largos tratamientos con productos recombinantes, media de 22,5 meses. También se apreciaron pocos casos de éxito en pacientes que recibieron tratamientos después de haber fracasado en primeras líneas de ITI<sup>151</sup>. Otras series más amplias, formadas por grupos de pacientes con factores de mal pronóstico, incluido el fracaso en primeras líneas de tratamiento, también comunicaron buenos resultados<sup>55;102;144</sup>.

Hay pruebas *in vitro* que sugieren que los pdFVIII pueden ofrecer ventaja cuando se utilizan para ITI. El factor de crecimiento transformante beta, presente en pdFVIII pero no en rFVIII, ha demostrado que inhibe la proliferación y promueve la apoptosis de linfocitos T estimulados<sup>153</sup>. En esta misma publicación, se demostró igualmente en cinco pacientes, que recibieron pdFVIII para cirugías menores, un aumento de la apoptosis en el subconjunto de las células T. Este efecto sobre las células T podría ser beneficioso en la limitación de la respuesta inmune de los pacientes con inhibidores durante ITI.

Los complejos de FVIII con VWF también pueden ser menos susceptibles a los anticuerpos dirigidos frente al dominio C2 de la molécula de FVIII; este dominio está oculto cuando el FVIII es transportado por el FVW<sup>98;154;155</sup>. Los pdFVIII/FVW serían más eficaces en los ITI, porque el FVW protegería los dominios C2 de la acción del inhibidor y se prolongaría la vida media del FVIII infundido<sup>99</sup>.

Finalmente, pdFVIII puede contener pequeñas cantidades de inmunoglobulina, incluyendo anticuerpos anti-idiotipo que pueden interferir con los anticuerpos inhibidores anti-FVIII<sup>156</sup>.

Estudios *in vivo* también demostraron que la recuperación de FVIII era mayor cuando se empleaba pdFVIII/VW en determinados pacientes, que cuando se empleaban productos de mayor pureza<sup>157</sup>.

En sentido contrario, tendríamos trabajos en los que se comunican buenos resultados con series de pacientes que han efectuado el ITI con productos recombinantes<sup>142;145;146;158</sup>. En la serie canadiense, hay 29 pacientes que terminan el ITI; la mayoría de ellos son tratados con rFVIII y presentan un 79,3% de éxito. Los criterios de éxito son diferentes dependiendo del centro; por tanto, algunos pacientes no serían considerados como éxito en nuestro trabajo.

En los cuatro registros, Internacional<sup>74</sup>, Norteamericano<sup>76</sup>, Alemán<sup>78</sup> y Español<sup>93</sup>, no hay diferencias en el éxito al considerar el tipo de factor empleado, pero en todos

ellos hay un sesgo en los pacientes incluidos, dado que la mayoría han estado tratados con productos plasmáticos. Algo similar sucede en el ITI Study<sup>92</sup>, pero en sentido contrario; en este estudio, la mayoría de los pacientes han sido tratados con productos recombinantes. En un análisis posterior del Registro Norteamericano, se consiguieron más éxitos de tolerancia en pacientes tratados con factor plasmático purificado con anticuerpos monoclonales (73%) que con factor recombinante de primera generación (51%).

En pacientes con peores factores predictores, podría suponer cierta ventaja tratarlos con productos plasmáticos<sup>55;101</sup>. No obstante, en dos revisiones más recientes, no se aprecian diferencias que soporten la ventaja de los productos ricos en FVW<sup>104;105</sup>.

En nuestro caso, los resultados obtenidos con el pdFVIII/FVW procedente de las donaciones de plasma autóctono, nos ha funcionado bien, por tanto parece lógico el seguir utilizándolo como lo hemos venido haciendo.

La dosis de factor empleada en el ITI no influye en los resultados de nuestro estudio. En los últimos años estamos aplicando una dosis personalizada, dependiendo de los factores predictores de cada paciente (fundamentalmente el título máximo de inhibidor), a semejanza de lo aplicado por otros grupos<sup>107</sup>. En este trabajo de Mathias, se aprecian mejores resultados en los pacientes que utilizan menor dosis

de factor; pero generalmente los pacientes en los que se emplea menor dosis son los que tienen menor título máximo histórico de inhibidor. En nuestro centro, esta selección de pacientes solo se ha efectuado desde el año 2000. Este hecho puede hacer que los resultados se compensen y no se decanten hacia mejores resultados con las dosis bajas, como podría haber sucedido si los tratamientos personalizados se hubiesen aplicado en todo momento.

En el Registro Español la variable que ha permanecido durante diversas actualizaciones con mayor significación estadística y con un sentido de buen pronóstico, es el empleo de dosis de factor iguales o inferiores a 100 UI/kg/día, lo cual está en concordancia con lo presentado por el Registro Norteamericano, donde con dosis altas se obtienen peores resultados. En este campo hay discrepancias con el Registro Internacional, donde se demuestran mejores resultados con dosis altas. En sentido contrario se pueden destacar los buenos resultados publicados por el grupo holandés que usaba dosis tan bajas en ITI como las que se suelen emplear en profilaxis, 25 UI/kg tres días por semana<sup>70</sup>.

El empleo de AVC es muy frecuente en los pacientes hemofílicos. La utilización de los AVC en algunas series llega a ser hasta del 43% de los hemofílicos, 32% de los que están en profilaxis y 89% de los que están en ITI<sup>159</sup>.

Es recomendable llevar a cabo los ITI sin interrupciones; el acceso venoso es fundamental en los niños que se someten a estos tratamientos, sobre todo, en el caso de las administraciones diarias.

Nuestro centro cuenta con una baja tasa de utilización de AVC, sólo en 7 de 23 pacientes (30%) se ha utilizado. En parte es una consecuencia de la alta tasa de infecciones que hemos tenido, más marcada en la década de los 90. Esto queda reflejado por unos periodos relativamente cortos desde la colocación del AVC hasta la primera infección, comparado con otras series<sup>111</sup>. Además porque hemos seguido las recomendaciones de consenso internacional que consideraban la administración por venopunción periférica como primera opción para evitar complicaciones con los AVC<sup>160</sup>. La utilización de regímenes con administración a días alternos o tres días por semana facilitarían la utilización de venas periféricas. No obstante, la utilización de AVC es con frecuencia necesario, sobre todo, cuando se han de aplicar regímenes de dosis altas en niños muy pequeños<sup>161</sup>.

Hay dos grandes tipos de AVC, los port que son subcutáneos totalmente implantados debajo de la piel y, los catéteres tunelizados externos, estos últimos tienen mayor tasa de infecciones y muchas más limitaciones en la vida diaria del paciente.

Todos AVC de nuestros pacientes han sido port-a-cath; son los catéteres preferidos en hemofilia porque tienen

menor probabilidad de infección<sup>162</sup>, mayor durabilidad, requieren menos cuidados y permiten una vida más normal del paciente<sup>111;163</sup>.

A pesar de utilizar port-a-cath, la tasa de infección en nuestros pacientes es elevada, 10 de los 11 AVC han sufrido infección durante el periodo de ITI. La mayoría de la infecciones de los AVC en nuestros pacientes ha sido causadas por gérmenes gram positivo al igual que lo comunicado en la literatura<sup>111;164-167</sup>. La mayoría de las infecciones fueron controladas con tratamiento antibiótico.

La infección es la complicación principal asociada al uso de los AVC en hemofilia<sup>168-170</sup>. Los pacientes con inhibidores tienen mayor riesgo de infección<sup>111;160;164-166;169;171-173</sup>. El meta-análisis de Valentino et al<sup>111</sup>, en relación con las infecciones de los AVC en hemofilia grave, revela un mayor riesgo de infección en pacientes menores de 6 años, la presencia de inhibidor y el uso de catéteres externos<sup>111</sup>.

Una de las posibles causas de la mayor tasa de infecciones de los AVC en el hemofílico con inhibidores es el mayor número de utilizaciones del port; no obstante, en algunos estudios este supuesto no se confirma<sup>164;167</sup>; tampoco en el ITI Study<sup>92</sup>, no se aprecian diferencias en la tasa de infecciones entre los pacientes de la rama de administración diaria de factor frente a los de tres días por semana. La otra posible causa de infecciones es la

formación de hematomas entre la piel y la membrana<sup>164</sup>. En este punto se puede especular que en los pacientes en ITI, sí que habría una mayor tasa de infecciones con el uso frecuente de los AVC; pero cuando se utilizan dosis altas de factor, la probabilidad de los sangrados en los puntos de punción sería menor y, por tanto, esto compensaría el riesgo de infección.

En nuestro caso, 4 de 6 pacientes con infección del AVC consiguieron éxito en primera línea del ITI. El paciente que no se infectó también consiguió la inmunotolerancia. La mayoría de las infecciones en nuestros pacientes fueron controladas con tratamiento antibiótico y no supusieron interrupciones prolongadas en la administración de los concentrados de factor; este hecho podría explicar por qué no se han observado diferencias en los resultados del ITI entre los pacientes con infección de los AVC y los que no utilizan AVC, como si se aprecia en otras series donde hay interrupciones del tratamientos. En una publicación del Registro Norteamericano de Inmunotolerancia, la complicación en los AVC, habitualmente infección, fue una de las razones frecuentes de fallo en los ITI<sup>76</sup>. En la misma línea, el grupo de Milan<sup>174</sup> comunica que, los pacientes con inhibidores, tienen una mayor tasa de retirada y menor durabilidad de los AVC que los pacientes sin inhibidores; la mediana del tiempo de retirada es de 0,8 años. La retirada dificultaría la continuidad del ITI; la interrupción supondría la

prolongación de la consecución de la tolerancia o incluso que no se consiga<sup>95;175</sup>. En una comunicación de los datos preliminares del ITI study<sup>94</sup> se observaba un porcentaje menor de éxito en el ITI; 38% de los pacientes que sufrían infección de los AVC frente a 77% de los que no se infectaban; además, se tardaba más en conseguir la tolerancia. Sin embargo, en la publicación final alcanzan la tolerancia con proporciones similares los pacientes que sufrieron infección del AVC a los que no se infectaron y, no había diferencias significativas en los tiempos requeridos para conseguir la tolerancia<sup>92</sup>.

En nuestra serie tampoco se han obtenido diferencias significativas al analizar el título de inhibidor en el momento de iniciar el ITI. Hasta ahora todos los registros<sup>76;93;147</sup> han coincidido al mostrar que, tener un título inferior a 10 UB/mL en el momento de iniciar el ITI es una buena variable predictora de éxito en los ITI. Similares resultados se han obtenido en diferentes series en las que se esperó a tener un título de inhibidor bajo para iniciar el ITI<sup>91;108;109</sup>

Mientras se espera a que el título de inhibidor descienda por debajo de 10 UB/mL, no se debe exponer al paciente a productos que contengan FVIII; por tanto, en el periodo de espera la práctica habitual es tratar los episodios hemorrágicos con rFVIIa, dado que el FEIBA tiene trazas de FVIII y, en 1/3 de los pacientes les produciría un estímulo

suficiente para no permitir el descenso del inhibidor<sup>176</sup>. Esta ha sido también la práctica habitual en nuestro centro en los últimos 15 años.

De una recopilación de los datos del Registro Internacional y del Norteamericano<sup>90</sup> se desprende que los pacientes que iniciaron el tratamiento con un título <10UB/mL, consiguieron éxito en el 85% de los casos, en un tiempo medio de 11 meses. Mientras que cuando el título del inhibidor era >10UB/mL, solo la tercera parte de los pacientes alcanzaron la tolerancia, y además necesitaron más tiempo (15 meses).

Una de las posibles razones para intentar explicar la mejor respuesta cuando se inicia el ITI con título bajo, es el que se afrontaría el tratamiento en una situación de menor alerta del sistema inmunitario y esto facilitaría la consecución de la tolerancia.

Existen otros trabajos donde los mejores resultados se obtienen cuando el intervalo entre la detección del inhibidor y el comienzo del ITI es corto<sup>95;107</sup>. En el Registro Internacional<sup>74</sup> los resultados fueron mejores en los pacientes cuya demora del tratamiento fue inferior a 5 años<sup>75</sup>. Recientemente dos centros norteamericanos<sup>177</sup> han concluido que si se empieza pronto el ITI, con independencia del título pre-ITI, se consiguen más éxitos. Se trata de un trabajo retrospectivo en el que se estudiaron 58 pacientes; 32 de 39 (82%) alto respondedores consiguieron el éxito. De

los 39 alto respondedores, 23 iniciaron el ITI dentro del mes después de haberse diagnosticado el inhibidor y 22 de ellos respondieron (96%); 13 de 23 iniciaron el ITI con un título pre-ITI >10 UB/mL y todos fueron éxito. Cinco pacientes empezaron el tratamiento entre 1 a 6 meses desde la detección del inhibidor, consiguiendo un 60% de respuesta, y once comenzaron el ITI con una demora mayor de 6 meses con 64% de éxito. Cuando se analiza con detalle este trabajo se ve que los pacientes que tardan más en empezar el ITI tienen un título de inhibidor máximo histórico mayor; de hecho cuando el título máximo entra en el estudio multivariable, la precocidad del tratamiento no es significativa.

Aunque, por la mayoría de lo publicado, es más ventajoso iniciar los tratamientos con un título de inhibidor <10 UB/mL, debido a la disparidad de determinados trabajos, algunos grupos siguen apostando por iniciar los ITI lo antes posible tras la detección del inhibidor<sup>106</sup>. El objetivo fundamental de estos grupos es el reducir la probabilidad de sangrado, evitando así la aparición de articulaciones dianas y el inicio de la artropatía. Además, la aplicación de los ITI a una edad temprana también supondría un ahorro económico por el menor peso del paciente.

Como podemos comprobar, en esta y otras variables es difícil comparar los resultados de las diferentes publicaciones por la heterogeneidad de las series.

La edad en el momento del inicio del ITI no influye en los resultados de nuestra serie, al igual que en la mayoría de las publicaciones. Sólo en el Registro Internacional la edad resultó significativa, apreciándose peores resultados en pacientes que realizaron los ITI con una edad superior a 20 años<sup>75</sup>.

En cuanto al tipo de mutación se han agrupado para su análisis en: a) inversiones, b) grandes deleciones, c) mutaciones terminadoras, d) pequeñas deleciones o inserciones y e) mutaciones sitio corte-empalme. No se aprecia influencia del tipo de mutación en nuestros resultados. En la literatura vemos que las mismas mutaciones que tienen mayor riesgo para el desarrollo de inhibidores<sup>86;87</sup>, aquellas que son más lesivas para la maquinaria genética, también influirían de forma negativa en la consecución de la tolerancia. Los peores resultados se tendrían en los hemofílicos portadores de grandes deleciones<sup>88;178</sup>. Sin embargo, estos datos no han sido confirmados en otras series<sup>71</sup>.

La determinación de los epítomos del FVIII frente a los que va dirigido el inhibidor, se empezó a realizar en los últimos 15 años en nuestro centro, por lo cual, este dato sólo está disponible en los pacientes más jóvenes (tabla 15).

Sólo en la muestra de un paciente, de los estudiados en nuestro centro, no se detectó señal; se trataba de un niño con un título de inhibidor muy bajo y con rápida respuesta al ITI. En la mayoría de las muestras se aprecian inhibidores frente a diferentes dominios de la molécula de FVIII, al igual que lo comunicado en la literatura. Sólo en la muestra de un paciente, se apreció reactividad exclusiva frente a cadena ligera. Este paciente había sido tratado desde el principio con rFVIII. En este punto no hay coincidencia con lo comunicado en algunos trabajos donde aprecian que los pacientes expuestos a pdFVIII son los que presentan con mayor frecuencia epítomos específicos frente a la cadena ligera<sup>179</sup>. En nuestra serie, no se aprecia relación entre los epítomos y el éxito en los ITI. En la literatura hay pocas publicaciones en las que se haya intentado correlacionar la respuesta de los ITI con la caracterización de los epítomos de los pacientes. El estudio de Greningre<sup>53</sup> es el que muestra una mayor relación entre el tipo de epítomo y la respuesta en los ITI. En este trabajo hay 11 hemofílicos con inhibidores sometidos a ITI con un único producto plasmático con FVW; se dispone de la caracterización epitópica de 10 de los 11 pacientes tratados; en 9 de ellos se tiene señal. En esos 9 hay especificidad para C2, y en 4 además para A2. La presencia del epítomo en A2 estaría asociada a mal resultado. En el trabajo publicado por un grupo holandés, donde se hace un estudio epitópico dinámico, a lo largo del

tiempo en ITI, hay predominio de inhibidores dirigidos frente a cadena ligera en los pacientes que responden al ITI. Además, aprecian que en aquellos pacientes que responden a los ITI, a lo largo del tratamiento se produce descenso en la proporción de anticuerpos dirigidos frente a A2 e incremento frente a cadena ligera<sup>54</sup>. En estos dos trabajos, en general, los pacientes con anticuerpos frente al dominio A2 son aquellos que presentan un título de inhibidor durante el ITI más alto; estos datos pueden estar sesgados, esto es, que la variable responsable de respuesta al tratamiento sea el título durante el ITI y no la especificidad al epítipo. En definitiva sería interesante efectuar estudios prospectivos con amplias series de pacientes para intentar aclarar estos puntos.

En los últimos años, en los niños que no han respondido a una primera línea de ITI hemos escalado diferentes líneas de rescate. El primer cambio ha sido aumentar la dosis de concentrado utilizado o cambiar a un pdFVIII/FWV, si no lo estábamos administrando ya.

Con el paciente 15, decidimos efectuar cambios antes de los tres meses, inicialmente de dosis y después de tipo de concentrado, pasándolo a un producto pdFVIII/FWV por el incremento del título de inhibidor durante 2 meses consecutivos en el seno del ITI.

En la mayoría de los pacientes se apreció un descenso del título de inhibidor cuando se realizaron los cambios. En dos de ellos, decidimos iniciar su última línea con inmunosupresión, corticoides y rituximab, asociados a dosis altas de pdFVIII/FVW. En estos dos pacientes se consiguió una respuesta parcial, pasando de alto respondedor a bajo respondedor.

En el caso del paciente 10 apreciamos una mejoría sustancial en su calidad de vida. Antes de iniciar el segundo rescate presentaba más de 20 eventos hemorrágicos anuales, en alguno de ellos con ingreso hospitalario, mientras que en el momento actual presenta menos de 3 hemorragias por año, sin ingreso desde hace un lustro.

En el paciente 17 la mejoría no ha sido tan espectacular, dado que nunca presentó tanta morbilidad hemorrágica, en parte por haber estado, casi toda su vida, en diferentes líneas de ITI; en el momento actual, el paciente tiene en todo momento FVIII circulante, pues sus valores de FVIII:C valle son de 5-7 UI/dL, pero para ello está recibiendo 110 UI/kg/48h. Como es de esperar, no tiene eventos hemorrágicos. En él, sería planteable el volver a aplicar concentrado de factor diariamente, para ver si se consigue normalizar la vida media.

En estos pacientes, se asociaron corticoides buscando un efecto inmunosupresor más global, pero el efecto fundamental y sostenido se debería al rituximab.

Una de las dudas con el uso de rituximab es el número de dosis a administrar. En el paciente 10 se utilizaron 13 dosis; la razón fue intentar que descendieran totalmente los linfocitos CD19, al igual que se consiguió en otros casos. El paciente 17 recibió 5 dosis de rituximab. En las figuras 13 y 20 se puede observar la evolución de las cifras de CD19 de estos pacientes. En el caso 10 no se ha recuperado la cifra de valores normales, a pesar de haber pasado más de 8 años, mientras que el paciente 17 la normalizó unos 7 meses después de la última dosis de rituximab. En la literatura el número de dosis es muy variable, entre 2-12, y suele estar relacionado con las recidivas del inhibidor<sup>117;122;180;181</sup>.

El rituximab es el inmunosupresor más utilizado en los últimos años. Cuando se emplea solo, sin administrar también FVIII, la respuesta es muy pobre, a semejanza de lo ocurrido con los otros inmunosupresores. Los resultados son más esperanzadores cuando se emplea conjuntamente con dosis altas de FVIII<sup>116-121</sup>. En una recopilación de los casos tratados en los Centros Británicos de Tratamiento de Hemofilia, se aprecia que la erradicación del inhibidor de forma sostenida es poco común; no obstante, se produce una mejoría clínica en el 50% de los pacientes. La respuesta es menor que lo publicado previamente en serie de casos más pequeñas. Una de las posibles explicaciones es el

seguimiento más prolongado en la serie británica, lo cual permitiría apreciar mejor las recidivas.

Los efectos secundarios del rituximab a corto o medio plazo son pocos, pero los efectos a largo plazo son más inciertos<sup>122</sup>. En cualquier caso y aunque no tratemos patología neoplásica, en muchas ocasiones el paciente hemofílico con inhibidor de alto título, corre riesgos vitales y tiene una pésima calidad de vida que justificaría la aplicación de este tipo de inmunosupresión

En nuestra serie sólo uno de los pacientes que responde en primera línea recidivó a los 6 años y 8 meses de haber conseguido la tolerancia. Permaneció con inhibidor durante 25 años, tratándose con FVIII y productos baipás a demanda; tras este periodo se planteó tratamiento continuado con pdFVIII/FVW. Sorprendentemente, la recuperación y vida media del FVIII en este paciente, desde el primer momento de esta exposición continuada de factor, fue normal. El otro paciente que recidiva, es el paciente 12; consiguió el éxito en tratamiento de rescate, tras aumentar la dosis inicial del pdFVIII/FVW que llevaba. Este paciente recidivó a los 2 años y 3 meses con un título de inhibidor de 0,9 UB/mL; tras haber confirmado la presencia de inhibidor, se aumentó la dosis de factor y en 3 meses volvió a normalizar la vida media. Ambos pacientes habían

continuado en tratamiento profiláctico después de terminar el ITI.

Continuar en tratamiento profiláctico después de terminar los ITI es algo formalmente recomendado y que se suele hacer, aunque no esté totalmente comprobado. La tasa de recidiva, si consideramos todos los pacientes que responden en primera línea y rescate, ha resultado ser del 11%. En lo comunicado previamente, las tasas de recidiva eran muy variadas; irían desde <1% comunicado en la primera publicación del Registro Internacinal<sup>74</sup> hasta el 22% presentado por Antun, J. et al, en un estudio multicéntrico norteamericano<sup>182</sup>, pasando por el 11% del ITI Study prospectivo<sup>92</sup>, el 12% del registro Norteamericano<sup>183</sup> y el 15% de una segunda publicación del Registro Internacional<sup>75</sup>. La variabilidad en las tasas de recidiva depende de diferentes aspectos, fundamentalmente de los criterios para considerar el éxito del ITI, así como el criterio para considerar la recidiva y el tiempo de seguimiento. En el ITI Study prospectivo, 4 de 37 pacientes pierden la tolerancia al FVIII exógeno durante el primer año de seguimiento, uno con un título de inhibidor de 1,4 UB/mL y los otros 3 con descenso de la recuperación. Este es el único trabajo prospectivo con un seguimiento muy estrecho, pero sólo durante el primer año después de considerar a los pacientes tolerantes. Las características de los pacientes que recidivaron en el ITI Study no se diferenciaban en la

recuperación y vida media con los que no recidivaron. Por el contrario, en el Registro Norteamericano cuando revisaron los pacientes que recidivaron, en 8 de 9 se había considerado éxito sólo por tener el inhibidor negativo y también, se consideró recidiva la presencia de inhibidor, sin contemplar el descenso de la recuperación o la vida media. En este sentido, en la serie de Antun aprecian como factores predictores de recidiva el tener una recuperación <85% al final del ITI y el haber recibido tratamiento inmunomodulador. La mayor tasa de recidiva en los pacientes que utilizan inmunomodulación queda patente en la serie publicada por Collins<sup>122</sup>, donde recopila los casos de ITI con rituximab correspondientes a los Centros Británicos de Tratamiento de Hemofilia. La fortaleza de los datos de recidiva de nuestra serie, radica en un seguimiento estrecho y durante un tiempo prolongado, una mediana de seguimiento de 9,7 años (Q1;Q3:7,3;16,6), no tan prolongado en las otras series.

La decisión de los segundos intentos de ITI debería estar basada en la frecuencia de las hemorragias, su gravedad y la respuesta a los tratamientos con agentes baipás. También es muy importante la edad del paciente, en todo niño con inhibidores hay que hacer todo el esfuerzo posible para eliminar el inhibidor; de no haber respuesta con la primera línea de tratamiento hay que continuar con las

siguientes. Podemos ver que en alguno de nuestros casos, se consigue respuesta tras más de 5 años de tratamiento, en dos de ellos con administración de rituximab. Como se comentaba previamente, algunos pacientes hemofílicos con inhibidor de alto título, tienen unos riesgos vitales y una calidad de vida tan pobre que justifica el empleo de diferentes líneas de tratamiento para intentar normalizar, en la medida de lo posible, la vida del paciente y la de su familia.

Esta ha sido la filosofía seguida en nuestra Unidad.

## VII. CONCLUSIONES

1. En nuestra serie hay dos variables que influyen en el éxito: a) un menor título máximo de inhibidor durante el tratamiento de inducción de inmunotolerancia y b) la utilización de concentrados de FVIII de origen plasmático para efectuar el tratamiento.
2. En el análisis estadístico la utilización de pdFVIII/FVW aporta una parte prácticamente despreciable, pero no podemos discriminar el poder de esta variable, dado que todos los concentrados plasmáticos a excepción de uno contenían FVW.
3. En nuestra serie no tienen significación estadística influyendo en el éxito: el tipo de mutación causal de la hemofilia, el título máximo histórico de inhibidor, el título de inhibidor antes de iniciar el ITI, la edad en el momento del ITI, la demora en empezar el ITI, la dosis de FVIII empleada, la utilización de AVC o la infección de éstos.
4. En los ITI de primera línea tenemos una tasa de respuesta inferior a otras series.
5. Con los tratamientos de rescate se consiguen buenos resultados; al agregar estos resultados a la primera línea se llega a una tasa de respuesta del 85,7%, sumando el éxito y los cambios de

inmunorrespuesta. Sólo dos pacientes son subsidiarios de tratamiento baipás.

6. Tenemos una baja tasa de utilización de accesos venosos centrales, condicionada por los tiempos cortos libres de infección desde la colocación de los AVC en nuestros pacientes.
7. En hemofílicos con inhibidores en edad pediátrica, es importante insistir en la erradicación del inhibidor, dada la larga expectativa de vida en este grupo poblacional.

## VIII. REFERENCIAS

- (1) Otto JC. An account of an hemorrhagic disposition existing in certain families. Clin Orthop Relat Res 1996;(328):4-6.
- (2) McKusick VA. Historical note: The earliest record of hemophilia in America? Blood 1962; 19:243-244.
- (3) Über die Hämophilie oder die erbliche Anlage zu tödtlichen Blutungen. Inaugural-Abhandlung. Würzburg: CW Becker. 1828.
- (4) Quick A, Stanley-Brown M, Bancroft FW. A study of the coagulation defect in hemophilia and in jaundice. Am J Med Sci 1935; 190:501.
- (5) Quick A. On the nature and diagnosis of hemophilia. Blood 1954; 9(3):265-272.
- (6) Quick A. Hemophilia and hemophiliacs. Bull Med Libr Assoc 1955; 43(4):451-454.
- (7) Patek AJ, Taylor FH. Hemophilia. II. Some properties of a substance obtained from normal human plasma effective in accelerating the coagulation of hemophilic blood. J Clin Invest 1937; 16(1):113-124.
- (8) Pavlovsky A. Contribution to the pathogenesis of hemophilia. Blood 1947; 2(2):185-191.
- (9) SOULIER JP, Larrieu MJ. Differentiation of hemophilia into two groups; a study of thirty-three cases. N Engl J Med 1953; 249(14):547-553.
- (10) Zimmerman TS, Edgington TS. Factor VIII coagulant activity and factor VIII-like antigen: independent molecular entities. J Exp Med 1973; 138(4):1015-1020.

- (11) White GC, Rosendaal FR, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J et al. Definitions in Hemophilia. *Thromb Haemost* 2001; 85:560.
- (12) Vehar GA, Keyt B, Eaton D, Rodriguez H, O'Brien DP, Rotblat F et al. Structure of human factor VIII. *Nature* 1984; 312(5992):337-342.
- (13) Reding MT, Wu H, Krampf M, Okita DK, DiethelmOkita BM, Key NS et al. CD4(+) T cell response to factor VIII in hemophilia A, acquired hemophilia, and healthy subjects. *Thromb Haemost* 1999; 82(2):509-515.
- (14) Saenko EL, Shima M, Sarafanov AG. Role of activation of the coagulation factor VIII in interaction with vWf, phospholipid, and functioning within the factor Xase complex. *Trends Cardiovasc Med* 1999; 9(7):185-192.
- (15) Saenko EL, Loster K, Josic D, Sarafanov AG. Effect of von Willebrand Factor and its proteolytic fragments on kinetics of interaction between the light and heavy chains of human factor VIII. *Thromb Res* 1999; 96(5):343-354.
- (16) Lane S. Haemorrhagic diathesis. Successful transfusion of blood. *Lancet* 1940; 35:185-188.
- (17) COHN EJ. Blood and blood derivatives. *Annu Rep Board Regents Smithson Inst* 1946;413-439.
- (18) POOL JG, GERSHGOLD EJ, PAPPENHAGEN AR. High-potency antihemophilic factor concentrate prepared from cryoglobulin precipitate. *Nature* 1964; 203:312.:312.
- (19) Yoshitake S, Schach BG, Foster DC, Davie EW, Kurachi K. Nucleotide sequence of the gene for

human factor IX (antihemophilic factor B).  
Biochemistry 1985; 24(14):3736-3750.

- (20) Gitschier J, Drayna D, Tuddenham EG, White RL, Lawn RM. Genetic mapping and diagnosis of haemophilia A achieved through a BclII polymorphism in the factor VIII gene. Nature 1985; 314(6013):738-740.
- (21) Darby SC, Kan SW, Spooner RJ, Giangrande PL, Hill FG, Hay CR et al. Mortality rates, life expectancy and causes of death in people with haemophilia A or B in the United Kingdom who were not infected with HIV. Blood 2007; 14(10):1328-1333.
- (22) Ikkala E, Helske T, Myllyla G, Nevanlinna HR, Pitkanen P, Rasi V. Changes in the life expectancy of patients with severe haemophilia A in Finland in 1930-79. Br J Haematol 1982; 52(1):7-12.
- (23) Plug I, van der Bom JG, Peters M, Mauser-Bunschoten EP, de Goede-Bolder A, Heijnen L et al. Mortality and causes of death in patients with hemophilia, 1992-2001: a prospective cohort study. J Thromb Haemost 2006; 4(3):510-516.
- (24) Rosendaal FR, Varekamp I, Smit C, Brocker-Vriends AH, van DH, Vandenbroucke JP et al. Mortality and causes of death in Dutch haemophiliacs, 1973-86. Br J Haematol 1989; 71(1):71-76.
- (25) Lawrence SS, Johson JB. Presence of circulating anticoagulant in a male member of hemophiliac family. Tr Am Clin and Climat A 1942; 56:223.
- (26) SOULIER JP, BURSTEIN M. Hemorrhagic diathesis associated with the presence of an anticoagulant in circulating blood; case report and laboratory studies. Blood 1948; 3(10):1188-1196.

- (27) de Biasi R, Rocino A, Papa ML, Salerno E, Mastrullo L, De Blasi D. Incidence of factor VIII inhibitor development in hemophilia A patients treated with less pure plasma derived concentrates. *Thromb Haemost* 1994; 71(5):544-547.
- (28) Lusher JM, Arkin S, Abildgaard CF, Schwartz RS. Recombinant factor VIII for the treatment of previously untreated patients with hemophilia A. Safety, efficacy, and development of inhibitors. Kogenate Previously Untreated Patient Study Group. *N Engl J Med* 1993; 328(7):453-459.
- (29) Bray GL, Gomperts ED, Courter S, Gruppo R, Gordon EM, Manco-Johnson M et al. A Multicenter Study of Recombinant Factor VIII (Recombinate): Safety, Efficacy, and inhibitor Risk in Previously Untreated Patients With Hemophilia A. *Blood* 1994; 83:2428-2435.
- (30) Capel P, Toppet M, van RE, Fondu P. Factor VIII inhibitor in mild haemophilia. *Br J Haematol* 1986; 62(4):786-787.
- (31) Hay CR, Ludlam CA, Colvin BT, Hill FG, Preston FE, Wasseem N et al. Factor VIII inhibitors in mild and moderate-severity haemophilia A. UK Haemophilia Centre Directors Organisation. *Thromb Haemost* 1998; 79(4):762-766.
- (32) Hay CR. Factor VIII inhibitors in mild and moderate-severity haemophilia A. *Haemophilia* 1998; 4(4):558-563.
- (33) Peerlinck K, Jacquemin M. Mild haemophilia: a disease with many faces and many unexpected pitfalls. *Haemophilia* 2010; 16 Suppl 5:100-6.:100-106.

- (34) Kempton CL, Soucie JM, Miller CH, Hooper C, Escobar MA, Cohen AJ et al. In non-severe hemophilia A the risk of inhibitor following intensive factor treatment is greater in older patients: a case-control study. *J Thromb Haemost* 2010; 8(10):2224-2231.
- (35) Eckhardt CL, van Velzen AS, Peters M, Astermark J, Brons PP, Castaman G et al. Factor VIII gene (F8) mutation and risk of inhibitor development in nonsevere hemophilia A. *Blood* 2013; 122(11):1954-1962.
- (36) Ehrenforth S, Kreuz W, Scharrer I, Linde R, Funk M, Gungor T et al. Incidence of development of factor VIII and factor IX inhibitors in haemophiliacs. *Lancet* 1992; 339(8793):594-598.
- (37) Bray GL, Gomperts ED, Courter S, Gruppo R, Gordon EM, Manco-Johnson M et al. A multicenter study of recombinant factor VIII (recombinate): safety, efficacy, and inhibitor risk in previously untreated patients with hemophilia A. The Recombinate Study Group. *Blood* 1994; 83(9):2428-2435.
- (38) Hay CR, Palmer B, Chalmers E, Liesner R, Maclean R, Rangarajan S et al. Incidence of factor VIII inhibitors throughout life in severe hemophilia A in the United Kingdom. *Blood* 2011; 117(23):6367-6370.
- (39) Saenko EL, Shima M, Gilbert GE, Scandella D. Slowed release of thrombin-cleaved factor VIII from von Willebrand factor by a monoclonal and a human antibody is a novel mechanism for factor VIII inhibition. *J Biol Chem* 1996; 271(44):27424-27431.
- (40) Lacroix-Desmazes S, Moreau A, Sooryanarayana, Bonnemain C, Stieltjes N, Pashov A et al. Catalytic

- activity of antibodies against factor VIII in patients with hemophilia A. *Nature Med* 1999; 5(9):1044-1047.
- (41) Lapan KA, Fay PJ. Localization of a factor X interactive site in the A1 subunit of factor VIIIa. *J Biol Chem* 1997; 272(4):2082-2088.
- (42) Fay PJ, Scandella D. Human inhibitor antibodies specific for the factor VIII A2 domain disrupt the interaction between the subunit and factor IXa. *J Biol Chem* 1999; 274(42):29826-29830.
- (43) Fijnvandraat K, Celie PHN, Turenhout EAM, tenCate JW, vanMourik JA, Mertens K et al. A human alloantibody interferes with binding of factor IXa to the factor VIII light chain. *Blood* 1998; 91(7):2347-2352.
- (44) Jacquemin M, Benhida A, Peerlinck K, Desqueper B, Elst LV, Lavendhomme R et al. A human antibody directed to the factor VIIC1 domain inhibits factor VIII cofactor activity and binding to von Willebrand factor. *Blood* 2000; 95(1):156-163.
- (45) Nogami K, Shima M, Nishiya K, Hosokawa K, Saenko EL, Giddings JC et al. Anticoagulant effects of a synthetic peptide containing residues Thr-2253-Gln-2270 within factor VIII C2 domain that selectively inhibits factor Xa-catalysed factor VIII activation. *Br J Haematol* 2002; 116(4):868-874.
- (46) Healey JF, Barrow RT, Tamim HM, Lubin IM, Shima M, Scandella D et al. Residues Glu2181-Val2243 contain a major determinant of the inhibitory epitope in the C2 domain of human factor VIII. *Blood* 1998; 92(10):3701-3709.
- (47) Scandella D, Gilbert GE, Shima M, Nakai H, Eagleson C, Felch M et al. Some factor VIII inhibitor antibodies recognize a common epitope corresponding to C2

domain amino acids 2248 through 2312, which overlap a phospholipid-binding site. *Blood* 1995; 86(5):1811-1819.

- (48) Nogami K, Shima M, Nakai H, Tanaka I, Suzuki H, Morichika S et al. Identification of a factor VIII peptide, residues 2315-2330, which neutralizes human factor VIII C2 inhibitor alloantibodies: requirement of Cys2326 and Glu2327 for maximum effect. *Br J Haematol* 1999; 107(1):196-203.
- (49) Barrow RT, Healey JF, Jacquemin MG, Saint-Remy JM, Lollar P. Antigenicity of putative phospholipid membrane-binding residues in factor VIII. *Blood* 2001; 97(1):169-174.
- (50) Gilbert GE, Kaufman RJ, Arena AA, Miao H, Pipe SW. Four hydrophobic amino acids of the factor VIII C2 domain are constituents of both the membrane-binding and von Willebrand factor-binding motifs. *J Biol Chem* 2002; 277(8):6374-6381.
- (51) Meeks SL, Healey JF, Parker ET, Barrow RT, Lollar P. Non-classical anti-C2 domain antibodies are present in patients with factor VIII inhibitors. *Blood* 2008; 112(4):1151-1153.
- (52) Dazzi F, Tison T, Vianello F, Radossi P, Zerbinati P, Carraro P et al. High incidence of anti-FVIII antibodies against non-coagulant epitopes in haemophilia A patients: a possible role for the half-life of transfused FVIII. *Br J Haematol* 1996; 93(3):688-693.
- (53) Greninger DA, Saint-Remy JM, Jacquemin M, Benhida A, DiMichele DM. The use of factor VIII/von Willebrand factor concentrate for immune tolerance induction in haemophilia A patients with high-titre inhibitors: association of clinical outcome with inhibitor epitope profile. *Haemophilia* 2007; 14(2):295-302.

- (54) van Helden PM, Kaijen PH, Mauser-Bunschoten EP, Fischer K, van den Berg HM, Voorberg J. Domain specificity of factor VIII inhibitors during immune tolerance induction in patients with haemophilia A. *Haemophilia* 2010; 16(6):892-901.
- (55) Gringeri A, Musso R, Mazzucconi MG, Piseddu G, Schiavoni M, Pignoloni P et al. Immune tolerance induction with a high purity von Willebrand factor/VIII complex concentrate in haemophilia A patients with inhibitors at high risk of a poor response. *Haemophilia* 2007; 13(4):373-379.
- (56) Ananyeva NM, Lee TK, Jain N, Shima M, Saenko EL. Inhibitors in hemophilia A: advances in elucidation of inhibitory mechanisms and in inhibitor management with bypassing agents. *Semin Thromb Hemost* 2009; 35(8):735-751.
- (57) Ruggeri ZM, Mannucci PM, Allain JP, Frommel D. Preliminary trial of cyclophosphamide in the management of hemophiliacs with factor VIII inhibitors. *Ann N Y Acad Sci* 1975; 240:412-418.
- (58) Nilsson IM, Hedner U, Holmberg L. Suppression of factor VIII antibody by combined factor VIII and cyclophosphamide. *Acta Med Scand* 1974; 195(1-2):64-72.
- (59) Stein RS. Letter: Hemophilia: cyclophosphamide and factor VIII concentrate. *Ann Intern Med* 1974; 81(5):706-707.
- (60) Stein RS, Colman RW. Hemophilia with factor VIII inhibitor. Elimination of anamnestic response. *Ann Intern Med* 1973; 79(1):84-87.
- (61) Hultin MB, Shapiro SS, Bowman HS, Gill FM, Andrews AT, Martinez J et al. Immunosuppressive

- therapy of Factor VIII inhibitors. *Blood* 1976; 48(1):95-108.
- (62) Hedner U, Tengborn L. Management of haemophilia A with antibodies--the effect of combined treatment with factor VIII, hydrocortisone and cyclophosphamide. *Thromb Haemost* 1985; 54(4):776-779.
- (63) Hruby MA, Schulman I. Failure of combined factor VIII and cyclophosphamide to suppress antibody to factor VIII in hemophilia. *Blood* 1973; 42(6):919-923.
- (64) Povlsen JV, Moller B, Jacobsen SE, Wallevik K, Zachariae E, Laursen B et al. Failure to induce immune tolerance in a hemophilia A patient with high titre VIII:C inhibitor. *Thromb Res* 1989; 53(1):79-84.
- (65) Brackmann HH, Gormsen J. Massive factor-VIII infusion in haemophiliac with factor-VIII inhibitor, high responder [letter]. *Lancet* 1977; 2(8044):933.
- (66) Brackmann HH, Oldenburg J, Schwaab R. Immune tolerance for the treatment of factor VIII inhibitors--twenty years' 'bonn protocol'. *Vox Sang* 1996; 70 Suppl 1:30-5:30-35.
- (67) Aznar JA, Jorquera JI, Peiro A, Garcia I. The importance of corticoids added to continued treatment with Factor VIII concentrates in the suppression of inhibitors in haemophilia A. *Thromb Haemost* 1984; 51(2):217-221.
- (68) Ewing NP, Sanders NL, Dietrich SL, Kasper CK. Induction of immune tolerance to factor VIII in hemophiliacs with inhibitors. *JAMA* 1988; 259(1):65-68.
- (69) van Leeuwen EF, Mauser-Bunschoten EP, van Dijken PJ, Kok AJ, Sjamsoedin-Visser EJM, and Sixma JJ.

- Disappearance of factor VIII:C antibodies in patients with haemophilia A upon frequent administration of factor VIII in intermediate or low dose. *Br J Haematol* 1986; 64:291-297.
- (70) Mauser-Bunschoten EP, Nieuwenhuis HK, Roosendaal G, van den Berg HM. Low-dose immune tolerance induction in hemophilia A patients with inhibitors. *Blood* 1995; 86(3):983-988.
- (71) Ter Avest PC, Fischer K, Gouw SC, Van DK, Mauser-Bunschoten EP. Successful low dose immune tolerance induction in severe haemophilia A with inhibitors below 40 Bethesda Units. *Haemophilia* 2010; 16(102):71-79.
- (72) Nilsson IM. Immune Tolerance. *Semin Hematol* 1994; 31(2 Suppl 4):44-48.
- (73) Berntorp E, Astermark J, Carlborg E. Immune tolerance induction and the treatment of hemophilia. Malmo protocol update. *Haematologica* 2000; 85(10 Suppl):48-50.
- (74) Mariani G, Ghirardini A, Bellocco R. Immune tolerance in hemophilia-principal results from the International Registry. Report of the factor VIII and IX Subcommittee. *Thromb Haemost* 1994; 72(1):155-158.
- (75) Mariani G, Kroner B. Immuno tolerance in hemophilia with factor VIII inhibitors: predictors of success. *Haematologica* 2001; 86(11):1186-1193.
- (76) DiMichele DM, Kroner BL. The North American Immune Tolerance Registry: practices, outcomes, outcome predictors. *Thromb Haemost* 2002; 87(1):52-57.

- (77) DiMichele D. The North American immune tolerance registry: contributions to the thirty-year experience with immune tolerance therapy. *Haemophilia* 2009; 15(1):320-328.
- (78) Lenk H. The German Registry of immune tolerance treatment in hemophilia--1999 update. *Haematologica* 2000; 85(10 Suppl):45-47.
- (79) Haya S, Quintana M, Aznar J, Jiménez V, López M, Altisent C et al. Registro Español de Inmunotolerancia en hemofílicos con inhibidores. Actualización a 2005. *Haematologica* 2006; 91 (Spanish Edition, Supl.4) :1-5.
- (80) Hausl C, Ahmad RU, Sasgary M, Doering CB, Lollar P, Richter G et al. High-dose factor VIII inhibits factor VIII-specific memory B cells in hemophilia A with factor VIII inhibitors. *Blood* 2005; 106(10):3415-3422.
- (81) Waters B, Lillicrap D. The Molecular Mechanisms of Immunomodulation and Tolerance Induction to Factor VIII. *J Thromb Haemost* 2009; 7(9):1446-1454.
- (82) van Helden PM, Kaijen PH, Fijnvandraat K, van den Berg HM, Voorberg J. Factor VIII-specific memory B cells in patients with hemophilia A. *J Thromb Haemost* 2007; 5(11):2306-2308.
- (83) Pautard B, d'Oiron R, Li TT, V, Lavend'homme R, Saint-Remy JM, Peerlinck K et al. Successful immune tolerance induction by FVIII in hemophilia A patients with inhibitor may occur without deletion of FVIII-specific T cells. *J Thromb Haemost* 2011; 9(6):1163-1170.
- (84) Gilles JG, Desqueper B, Lenk H, Vermylen J, Saint-Remy JM. Neutralizing antiidiotypic antibodies to factor VIII inhibitors after desensitization in patients

- with hemophilia A. *J Clin Invest* 1996; 97(6):1382-1388.
- (85) Gilles JG. Role of anti-idiotypic antibodies in immune tolerance induction. *Haemophilia* 2010; 16(102):80-83.
- (86) Oldenburg J, El-Maarri O, Schwaab R. Inhibitor development in correlation to factor VIII genotypes. *Haemophilia* 2002; 8 Suppl 2:23-9.:23-29.
- (87) Oldenburg J, Pavlova A. Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. *Haemophilia* 2006; 12 Suppl 6:15-22.:15-22.
- (88) Coppola A, Margaglione M, Santagostino E, Rocino A, Grandone E, Mannucci PM et al. Factor VIII gene (F8) mutations as predictors of outcome in immune tolerance induction (ITI) of hemophilia A patients with high-responding inhibitors. *J Thromb Haemost* 2009; 7:1809-1815.
- (89) Callaghan MU, Rajpurkar M, Chitlur M, Warriar I, Lusher J. Immune tolerance induction in 31 children with haemophilia A: is ITI less successful in African Americans? *Haemophilia* 2010;10-2516.
- (90) Kroner BL. Comparison of the international immune tolerance registry and the North American immune tolerance registry. *Vox Sang* 1999; 77 Suppl 1:33-7:33-37.
- (91) Smith MP, Spence KJ, Waters EL, Beresford-Webb R, Mitchell MJ, Cuttler J et al. Immune tolerance therapy for haemophilia A patients with acquired factor VIII alloantibodies: comprehensive analysis of experience at a single institution. *Thromb Haemost* 1999; 81(1):35-38.

- (92) Hay CR, DiMichele DM. The principal results of the International Immune Tolerance Study: a randomized dose comparison. *Blood* 2012; 119(6):1335-1344.
- (93) Haya S, López MF, Aznar JA, Batlle J, and the Spanish Immune Tolerance Group. Immune tolerance treatment in haemophilia patients with inhibitors: the Spanish Registry. *Haemophilia* 2001; 7(2):154-159.
- (94) DiMichele DM, Hay CR. The international immune tolerance study: a multicenter prospective randomized trial in progress. *J Thromb Haemost* 2006; 4(10):2271-2273.
- (95) Kreuz W, Ehrenforth S, Funk M, Auerswald G, Mentzer D, Joseph-Steiner J et al. Immune tolerance therapy in pediatric haemophiliacs with factor VIII inhibitors: 14 years follow-up. *Haemophilia* 1995; 1(1):24-32.
- (96) Kreuz W, Mentzer D, Auerswald G, Becker S, Joseph-Steiner J. Successful immunetolerance therapy of FVIII inhibitor in children after changing from high to intermediate purity FVIII concentrate. *Haemophilia* 1996; 2(Suppl 1):19.
- (97) Auerswald G, Spranger T, Brackmann HH. The role of plasma-derived factor VIII/von Willebrand factor concentrates in the treatment of hemophilia A patients. *Haematologica* 2003; 88(6):EREPO5.
- (98) Suzuki T, Arai M, Amano K, Kagawa K, Fukutake K. Factor VIII inhibitor antibodies with C2 domain specificity are less inhibitory to factor VIII complexed with von Willebrand factor. *Thromb Haemost* 1996; 76(5):749-754.
- (99) Astermark J, Voorberg J, Lenk H, DiMichele D, Shapiro A, Tjonnfjord G et al. Impact of inhibitor

- epitope profile on the neutralizing effect against plasma-derived and recombinant factor VIII concentrates in vitro. *Haemophilia* 2003; 9(5):567-572.
- (100) Behrmann M, Pasi J, Saint-Remy JM, Kotitschke R, Kloft M. Von Willebrand factor modulates factor VIII immunogenicity: comparative study of different factor VIII concentrates in a haemophilia A mouse model. *Thromb Haemost* 2002; 88(2):221-229.
- (101) Bidlingmaier C, Kurnik K, Escuriola-Ettingshausen C, Jager R, Klamroth R, Male C et al. Immune tolerance induction with a factor VIII concentrate containing von Willebrand factor (Haemoctin SDH((R)) ) in 14 patients with severe haemophilia A. *Haemophilia* 2011;10-2516.
- (102) Oldenburg J, Jimenez-Yuste V, Peiro-Jordan R, Aledort LM, Santagostino E. Primary and rescue immune tolerance induction in children and adults: a multicentre international study with a VWF-containing plasma-derived FVIII concentrate. *Haemophilia* 2014; 20(1):83-91.
- (103) Kurth M, Puetz J, Kouides P, Sanders J, Sexauer C, Bernstein J et al. The use of a single von Willebrand factor-containing, plasma-derived FVIII product in hemophilia A immune tolerance induction: the US experience. *J Thromb Haemost* 2011; 9(11):2229-2234.
- (104) Franchini M, Lippi G. Von Willebrand factor-containing factor VIII concentrates and inhibitors in haemophilia A. A critical literature review. *Thromb Haemost* 2010; 104(5).
- (105) van Velzen AS, Peters M, van der Bom JG, Fijnvandraat K. Effect of von Willebrand factor on inhibitor eradication in patients with severe

haemophilia A: a systematic review. *Br J Haematol* 2014; 166(4):485-495.

- (106) Astermark J, Morado M, Rocino A, van den Berg HM, Von Depka M, Gringeri A et al. Current European practice in immune tolerance induction therapy in patients with haemophilia and inhibitors. *Haemophilia* 2006; 12(4):363-371.
- (107) Mathias M, Liesner R, Hann I, Khair K. Immune tolerance in children with factors VIII and IX inhibitors: a single centre experience. *Haemophilia* 2005; 11(4):340-345.
- (108) Freiburghaus C, Berntorp E, Ekman M, Gunnarsson M, Kjellberg B, Nilsson IM. Tolerance induction using the Malmo treatment model 1982-1995. *Haemophilia* 1999; 5(1):32-39.
- (109) Rocino A, Papa ML, Salerno E, Capasso F, Miraglia E, de Biasi R. Immune tolerance induction in haemophilia A patients with high-responding inhibitors to factor VIII: experience at a single institution. *Haemophilia* 2001; 7(1):33-38.
- (110) Damiano ML, Hutter JJ. Immune tolerance for haemophilia patients with inhibitors: analysis of the western United States experience. The Tri-Regional Nursing Group. *Haemophilia* 2000; 6(5):526-532.
- (111) Valentino LA, Ewenstein B, Navickis RJ, Wilkes MM. Central venous access devices in haemophilia. *Haemophilia* 2004; 10(2):134-146.
- (112) Crary SE, Buchanan GR, Journeycake JM. Fatal central venous catheter-related infection in haemophilia. *Haemophilia* 2006; 12(2):183-186.
- (113) Lian EC, Larcada AF, Chiu AY. Combination immunosuppressive therapy after factor VIII infusion

for acquired factor VIII inhibitor. *Ann Intern Med* 1989; 110(10):774-778.

- (114) Nilsson IM, Berntorp E, Zettervall O. Induction of immune tolerance in patients with hemophilia and antibodies to factor VIII by combined treatment with intravenous IgG, cyclophosphamide, and factor VIII. *N Engl J Med* 1988; 318(15):947-950.
- (115) Aleem A, Saidu A, Abdulkarim H, Al-Diab AR, Al-Sagheer A, Qayum A et al. Rituximab as a single agent in the management of adult patients with haemophilia A and inhibitors: marked reduction in inhibitor level and clinical improvement in bleeding but failure to eradicate the inhibitor. *Haemophilia* 2009; 15(1):210-216.
- (116) Mathias M, Khair K, Hann I, Liesner R. Rituximab in the treatment of alloimmune factor VIII and IX antibodies in two children with severe haemophilia. *Br J Haematol* 2004; 125(3):366-368.
- (117) Carcao M, St Louis J, Poon MC, Grunebaum E, Lacroix S, Stain AM et al. Rituximab for congenital haemophiliacs with inhibitors: a Canadian experience. *Haemophilia* 2006; 12(1):7-18.
- (118) Mateo J, Badell I, Forner R, Tizzano E, Foncuberta J. Rituximab en el tratamiento de un niño afecto de hemofilia A severa con anticuerpos aloinmunes contra el factor VIII. *Haematologica* 89[Extraordinario 2], 153. 2004.  
Ref Type: Abstract
- (119) Curry N, Stanworth S, Keeling D. The use of rituximab in two children with allo-antibodies towards factor VIII. *Br J Haematol* 2006; 133(2):214-216.

- (120) Franchini M, Mengoli C, Lippi G, Targher G, Montagnana M, Salvagno GL et al. Immune tolerance with rituximab in congenital haemophilia with inhibitors: a systematic literature review based on individual patients' analysis. *Haemophilia* 2008; 14(5):903-912.
- (121) Streif W, Escuriola EC, Linde R, Kropshofer G, Zimmerhackl LB, Kreuz W. Inhibitor treatment by rituximab in congenital haemophilia A. *Hamostaseologie* 2009; 29(2):151-154.
- (122) Collins PW, Mathias M, Hanley J, Keeling D, Keenan R, Laffan M et al. Rituximab and immune tolerance in severe haemophilia A: a consecutive national cohort. *J Thromb Haemost* 2009; 7(5):787-794.
- (123) Hay CRM, Ludlam CA, Colvin BT, Hill FGH, Preston FE, Wasseem N et al. Factor VIII inhibitors in mild and moderate-severity haemophilia A. *Thromb Haemost* 1998; 79(4):762-766.
- (124) Sharathkumar A, Lillicrap D, Blanchette VS, Kern M, Leggo J, Stain AM et al. Intensive exposure to factor VIII is a risk factor for inhibitor development in mild hemophilia A. *J Thromb Haemost* 2003; 1(6):1228-1236.
- (125) Fijnvandraat K, Turenhout EAM, vandenBrink EN, tenCate JW, vanMourik JA, Peters M et al. The missense mutation Arg(593)->Cys is related to antibody formation in a patient with mild hemophilia A. *Blood* 1997; 89(12):4371-4377.
- (126) Thompson AR, Murphy ME, Liu M, Saenko EL, Healey JF, Lollar P et al. Loss of tolerance to exogenous and endogenous factor VIII in a mild hemophilia A patient with an Arg593 to Cys mutation. *Blood* 1997; 90(5):1902-1910.

- (127) Knobe KE, Villoutreix BO, Tengborn LI, Petrini P, Ljung RC. Factor viii inhibitors in two families with mild haemophilia a: structural analysis of the mutations. *Haemostasis* 2000; 30(5):268-279.
- (128) Santagostino E, Gringeri A, Tagliavacca L, Mannucci PM. Inhibitors to factor VIII in a family with mild hemophilia: molecular characterization and response to factor VIII and desmopressin. *Thromb Haemost* 1995; 74(2):619-621.
- (129) Peerlinck K, Jacquemin MG, Arnout J, Hoylaerts MF, Gilles JGG, Lavendhomme R et al. Antifactor VIII antibody inhibiting allogeneic but not autologous factor VIII in patients with mild hemophilia A. *Blood* 1999; 93(7):2267-2273.
- (130) Fernandez-Lopez O, Garcia-Lozano JR, Nunez-Vazquez R, Perez-Garrido R, Nunez-Roldan A. The spectrum of mutations in Southern Spanish patients with hemophilia A and identification of 28 novel mutations. *Haematologica* 2005; 90(5):707-710.
- (131) White B, Cotter M, Byrne M, O'Shea E, Smith OP. High responding factor VIII inhibitors in mild haemophilia - is there a link with recent changes in clinical practice? *Haemophilia* 2000; 6(2):113-115.
- (132) Koestenberger M, Leschnik B, Muntean W. More on: mild hemophilia A and inhibitor development. *J Thromb Haemost* 2004; 2(4):676.
- (133) Bovill EG, Burns SL, Golden EA. Factor VIII antibody in a patient with mild haemophilia. *Br J Haematol* 1985; 61(2):323-328.
- (134) Kesteven PJ, Holland LJ, Lawrie AS, Savidge GF. Inhibitor to factor VIII in mild haemophilia. *Thromb Haemost* 1984; 52(1):50-52.

- (135) Cid AR, Casana P, Cabrera N, Haya S, Cortina V, Aznar JA. Inhibitor development in one patient and laboratory discrepancies in several families with both mild haemophilia and Arg531Cys mutation. *Haemophilia* 2007; 13(2):206-208.
- (136) Robbins D, Kulkarni R, Gera R, Scott-Emuakpor AB, Bosma K, Penner JA. Successful treatment of high titer inhibitors in mild hemophilia A with avoidance of factor VIII and immunosuppressive therapy. *Am J Hematol* 2001; 68(3):184-188.
- (137) Vlot AJ, Wittebol S, Strengers PF, Turenhout EA, Voorberg J, van den Berg HM et al. Factor VIII inhibitor in a patient with mild haemophilia A and an Asn618--&gt;Ser mutation responsive to immune tolerance induction and cyclophosphamide. *Br J Haematol* 2002; 117(1):136-140.
- (138) Dunkley S, Kershaw G, Young G, Warburton P, Lindeman R, Matthews S et al. Rituximab treatment of mild haemophilia A with inhibitors: a proposed treatment protocol. *Haemophilia* 2006; 12(6):663-667.
- (139) van Velzen AS, Eckhardt CL, Hart DP, Peters M, Rangarajan S, Mancuso ME et al. Inhibitors in nonsevere haemophilia A: outcome and eradication strategies. *Thromb Haemost* 2015; 114(1):46-55.
- (140) Tibshirani R. Regression shrinkage and selection via the lasso. *J Royal Statist Soc B* 1996; 58(1):267-288.
- (141) Lilleyman JS. Domiciliary desensitization therapy for young boys with haemophilia and factor VIII inhibitors. *Br J Haematol* 1994; 86(2):433-435.
- (142) Batlle J, Lopez MF, Brackmann HH, Gaillard S, Goudemand J, Humbert J et al. Induction of immune tolerance with recombinant factor VIII in haemophilia

A patients with inhibitors [In Process Citation].  
Haemophilia 1999; 5(6):431-435.

- (143) Gruppo RA, Valdez LP, Stout RD. Induction of immune tolerance in patients with hemophilia A and inhibitors. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1992; 14(1):82-87.
- (144) Kreuz W, Escuriola EC, Vdovin V, Zozulya N, Plyushch O, Svirin P et al. First prospective report on immune tolerance in poor risk haemophilia A inhibitor patients with a single factor VIII/von Willebrand factor concentrate in an observational immune tolerance induction study. *Haemophilia* 2015;10.
- (145) Rivard GE, Rothschild C, Toll T, Achilles K. Immune tolerance induction in haemophilia A patients with inhibitors by treatment with recombinant factor VIII: a retrospective non-interventional study. *Haemophilia* 2013; 19(3):449-455.
- (146) Barnes C, Rivard GE, Poon MC, Teitel J, Pai M, Kern M et al. Canadian multi-institutional survey of immune tolerance therapy (ITT) -- experience with the use of recombinant factor VIII for ITT. *Haemophilia* 2006; 12(1):1-6.
- (147) Lenk H. The German National Immune Tolerance Registry, 1997 Update. *Vox Sanguinis* 1999; 77(S1):28-30.
- (148) Kreuz W, Escuriola-Ettinghausen C, Auerswald G, Heidemann P, Kemkes-Matthes B, Schneppenheim R. Immune tolerance induction (ITI) in haemophilia A patients with inhibitors: the choice of concentrate affecting success. *Haematologica* 2001; 86(suppl 4):16-20.

- (149) Ettingshausen CE, Kreuz W. Role of von Willebrand factor in immune tolerance induction. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2005; 16 Suppl 1:S27-31.:S27-S31.
- (150) Kreuz W, Joseph-Steiner J, Mentzer D, Auerswald G, Beeg T, Becker S. Successful immunetolerance therapy of FVIII-inhibitor in children after changing from high to intermediate purity FVIII concentrate. 40th Annual Meeting of the GTH (Gesellschaft für Thrombose- und Hämostasenforschung), Interlaken 1996. *Annals of Hematology* 72[suppl 1], 339. 1996. Ref Type: Abstract
- (151) Rothschild C, d'Oiron R, Borel-Derlon A, Gruel Y, Navarro R, Negrier C. Use of Haemate((R)) P as immune tolerance induction in patients with severe haemophilia A who failed previous induction attempts: a multicentre observational study. *Haemophilia* 2013; 19(2):281-286.
- (152) Orsini F, Rotschild C, Beurrier P, Faradji A, Goudemand J, Polack B. Immune tolerance induction with highly purified plasma-derived factor VIII containing von Willebrand factor in hemophilia A patients with high-responding inhibitors. *Haematologica* 2005; 90(9):1288-1290.
- (153) Hodge G, Han P. Effect of intermediate-purity factor VIII (FVIII) concentrate on lymphocyte proliferation and apoptosis: transforming growth factor-beta is a significant immunomodulatory component of FVIII. *Br J Haematol* 2001; 115(2):376-381.
- (154) Gensana M, Altisent C, Aznar JA, Casana P, Hernandez F, Jorquera JI et al. Influence of von Willebrand factor on the reactivity of human factor VIII inhibitors with factor VIII. *Haemophilia* 2001; 7(4):369-374.

- (155) Berntorp E, Ekman M, Gunnarsson M, Nilsson IM. Variation in factor VIII inhibitor reactivity with different commercial factor VIII preparations. *Haemophilia* 1996; 2(2):95-99.
- (156) Sultan Y, Kazatchkine MD, Maisonneuve P, Nydegger UE. Anti-idiotypic suppression of autoantibodies to factor VIII (antihæmophilic factor) by high-dose intravenous gammaglobulin. *Lancet* 1984; 2(8406):765-768.
- (157) Berntorp E. Immune tolerance induction: recombinant vs. human-derived product. *Haemophilia* 2001; 7(1):109-113.
- (158) Rocino A, Santagostino E, Mancuso ME, Mannucci PM. Immune tolerance induction with recombinant factor VIII in hemophilia A patients with high responding inhibitors. *Haematologica* 2006; 91(4):558-561.
- (159) Ragni MV, Hord JD, Blatt J. Central venous catheter infection in hæmophiliacs undergoing prophylaxis or immune tolerance with clotting factor concentrate. *Haemophilia* 1997; 3(2):90-95.
- (160) Ewenstein BM, Valentino LA, Journeycake JM, Tarantino MD, Shapiro AD, Blanchette VS et al. Consensus recommendations for use of central venous access devices in hæmophilia. *Haemophilia* 2004; 10(5):629-648.
- (161) van den Berg HM, Fischer K, Roosendaal G, Mauser-Bunschoten EP. The use of the Port-A-Cath in children with hæmophilia--a review. *Haemophilia* 1998; 4(4):418-420.
- (162) Warriar I, Baird-Cox K, Lusher JM. Use of central venous catheters in children with hæmophilia: one

haemophilia treatment centre experience.  
Haemophilia 1997; 3(3):194-198.

- (163) Komvilaisak P, Connolly B, Naqvi A, Blanchette V. Overview of the use of implantable venous access devices in the management of children with inherited bleeding disorders. Haemophilia 2006; 12 Suppl 6:87-93.:87-93.
- (164) Ljung R, van den BM, Petrini P, Tengborn L, Scheibel E, Kekomaki R et al. Port-A-Cath usage in children with haemophilia: experience of 53 cases. Acta Paediatr 1998; 87(10):1051-1054.
- (165) McMahon C, Smith J, Khair K, Liesner R, Hann IM, Smith OP. Central venous access devices in children with congenital coagulation disorders: complications and long-term outcome. Br J Haematol 2000; 110(2):461-468.
- (166) Collins PW, Khair KS, Liesner R, Hann IM. Complications experienced with central venous catheters in children with congenital bleeding disorders. Br J Haematol 1997; 99(1):206-208.
- (167) Hacker MR, Page JH, Shapiro AD, Rich-Edwards JW, Manco-Johnson MJ. Central venous access device infections in children with hemophilia: a comparison of prophylaxis and episodic therapy. J Pediatr Hematol Oncol 2007; 29(7):458-464.
- (168) Tarantino MD, Lail A, Donfield SM, Lynn H, Peddle L, Hunsberger S et al. Surveillance of infectious complications associated with central venous access devices in children with haemophilia. Haemophilia 2003; 9(5):588-592.
- (169) Bollard CM, Teague LR, Berry EW, Ockelford PA. The use of central venous catheters (portacaths) in

- children with haemophilia. *Haemophilia* 2000; 6(2):66-70.
- (170) Domm JA, Hudson MG, Janco RL. Complications of central venous access devices in paediatric haemophilia patients. *Haemophilia* 2003; 9(1):50-56.
- (171) McCarthy WJ, Valentino LA, Bonilla AS, Goncharova I, Taylor A, Pooley TA et al. Arteriovenous fistula for long-term venous access for boys with hemophilia. *J Vasc Surg* 2007; 45(5):986-991.
- (172) Mancuso ME, Berardinelli L, Beretta C, Raiteri M, Pozzoli E, Santagostino E. Improved treatment feasibility in children with hemophilia using arteriovenous fistulae: the results after seven years of follow-up. *Haematologica* 2009; 94(5):687-692.
- (173) Van Dijk K, van der Bom JG, Bax KN, Van DZ, Van Den Berg MH. Use of implantable venous access devices in children with severe hemophilia: benefits and burden. *Haematologica* 2004; 89(2):189-194.
- (174) Santagostino E, Gringeri A, Muca-Perja M, Mannucci PM. A prospective clinical trial of implantable central venous access in children with haemophilia. *Br J Haematol* 1998; 102(5):1224-1228.
- (175) DiMichele D, Rivard G, Hay C, Antunes S. Inhibitors in haemophilia: clinical aspects. *Haemophilia* 2004; 10 Suppl 4:140-5.:140-145.
- (176) DiMichele D. Inhibitors: resolving diagnostic and therapeutic dilemmas. *Haemophilia* 2002; 8(3):280-287.
- (177) Nakar C, Manco-Johnson MJ, Lail A, Donfield S, Maahs J, Chong Y et al. Prompt immune tolerance induction at inhibitor diagnosis regardless of titre may increase overall success in haemophilia A

complicated by inhibitors: experience of two US centres. *Haemophilia* 2015; 21(3):635-373.

- (178) Salviato R, Belvini D, Radossi P, Sartori R, Pierobon F, Zanotto D et al. F8 gene mutation profile and ITT response in a cohort of Italian haemophilia A patients with inhibitors. *Haemophilia* 2007; 13(4):361-372.
- (179) Prescott R, Nakai H, Saenko EL, Scharrer I, Nilsson IM, Humphries JE et al. The inhibitor antibody response is more complex in hemophilia A patients than in most nonhemophiliacs with factor VIII autoantibodies. *Recombinant and Kogenate Study Groups. Blood* 1997; 89(10):3663-3671.
- (180) Mateo J, Badell I, Forner R, Borrell M, Tizzano E, Fontcuberta J. Successful suppression using Rituximab of a factor VIII inhibitor in a boy with severe congenital haemophilia: an example of a significant decrease of treatment costs. *Thromb Haemost* 2006; 95(2):386-387.
- (181) Fox RA, Neufeld EJ, Bennett CM. Rituximab for adolescents with haemophilia and high titre inhibitors. *Haemophilia* 2006; 12(3):218-222.
- (182) Antun A, Monahan PE, Manco-Johnson MJ, Callaghan MU, Kanin M, Knoll C et al. Inhibitor Recurrence Following Immune Tolerance Induction: A Multicenter Retrospective Cohort Study. *J Thromb Haemost* 2015;10.
- (183) DiMichele D, Kroner B. The maintenance of tolerance after successful immune tolerance induction in hemophilia A and B: the North American Registry. Factor VIII/IX Subcommittee of the International Society for Thrombosis and Hemostasis. *Haematologica* 2000; 85(10 Suppl):40-42.

- (184) Ewing NP, Kasper CK. In vitro detection of mild inhibitors to factor VIII in hemophilia. *Am J Clin Pathol* 1982; 77(6):749-752.
- (185) Kasper CK, Aledort L, Aronson D, Counts R, Edson JR, van Eys J et al. Proceedings: A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb Diath Haemorrh* 1975; 34(2):612.
- (186) Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, Boezeman J, van den BM, Mauser-Bunschoten E. The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability. *Thromb Haemost* 1995; 73(2):247-251.
- (187) Verbruggen B, van Heerde W, Novakova I, Lillicrap D, Giles A. A 4% solution of bovine serum albumin may be used in place of factor VIII:C deficient plasma in the control sample in the Nijmegen modification of the Bethesda factor VIII:C inhibitor assay. *Thromb Haemost* 2002; 88:362-364.

## Anexo 1

# TÉCNICAS Y MÉTODOS DE LABORATORIO EMPLEADOS

## **1. Medición del FVIII por técnica coagulativa en un tiempo (FVIII:C)**

La determinación del factor VIII:C de la coagulación está basada en el tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT), mediante el método de coagulación en un tiempo. Mide el tiempo de recalcificación de un plasma pobre en plaquetas con una cantidad óptima de suspensión de fosfolípidos.

Se prepara una mezcla con un volumen de plasma problema (50  $\mu$ L), un volumen de plasma deficiente en FVIII, más un volumen de reactivo compuesto por diferentes fosfolípidos y un activador. Se deja incubar tres minutos a 37°C y después se añade un volumen de cloruro cálcico 0,025 M. El coagulómetro registra el tiempo de formación del coágulo, el cual se interpola en la curva de calibración (lin-log) que se ha realizado previamente con distintas diluciones, en tampón D'Owren (barbital), de un plasma estándar calibrado. La muestra de plasma se puede diluir con tampón (1:4) o (1:9) para que entre en la curva,

El plasma deficiente empleado en el desarrollo de la técnica contiene el resto de los factores de la coagulación en cantidades suficientes, de forma que el tiempo de

coagulación depende únicamente de la actividad del factor a determinar.

La curva de calibración se prepara cada día. Para verificar que está midiendo adecuadamente, se valoran un control normal y un control patológico y si están dentro del rango esperado, se ensayan las muestras.

Los resultados se informan en UI/dL.

## **2. Técnica de detección de los inhibidores**

Se ha utilizado la técnica de Kasper o la técnica Bethesda; esta última es la utilizada también para la cuantificación del inhibidor.

### **2.1. Técnica de Kasper**

Los inhibidores de grado bajo de factor VIII pueden resultar difíciles de detectar. Los exámenes “new Oxford” y “Bethesda” no son muy sensibles a los inhibidores de grado bajo. Lossing y colegas hallaron inhibidores de grado muy bajo, que podían ser detectados en un sistema de APTT donde el plasma del paciente mezclado con plasma normal (razón 4:1) era posteriormente incubado con caolín y cefalina durante dos horas antes de su recalcificación.

Modificación de Ewing y Kasper, 1982<sup>184</sup>.

Reactivos utilizados: Cefalina L, cloruro cálcico ( $\text{CaCl}_2$ ) 0,025M y plasma humano estándar (PHS). Como control Positivo y Negativo se usan los que suministra el kit Bethesda.

Hay que incubar durante 2 horas a  $37^\circ\text{C}$  una mezcla de 200  $\mu\text{L}$  de plasma de paciente y 50  $\mu\text{L}$  de plasma normal (PRE); 200  $\mu\text{L}$  de plasma de paciente y suficiente cantidad de plasma normal para realizar las mezclas post-incubación, las cuales se realizan con los 200  $\mu\text{L}$  de plasma del paciente y 50  $\mu\text{L}$  de plasma normal ya incubados previamente (POST).

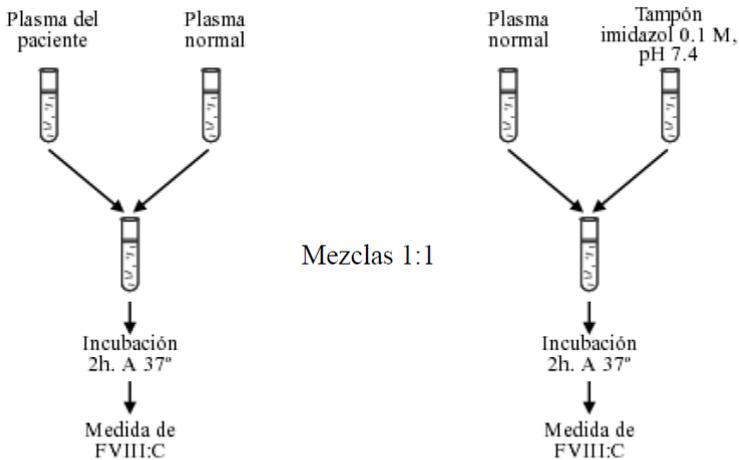
Después hay que realizar un TTPA convencional a las siguientes muestras: plasma normal incubado 2 horas a  $37^\circ\text{C}$ , mezcla PRE y mezcla POST.

Cuando la diferencia entre el tiempo de coagulación de la mezcla PRE y la POST es superior a 11 segundos, indica la presencia de un inhibidor. Esta diferencia de 11 segundos se estandarizó en nuestro laboratorio tras efectuar la prueba a 20 muestras de pacientes con inhibidor y 40 controles, pacientes sin inhibidor.

En algunos casos pueden darse falsos negativos, por ejemplo en el caso de inhibidores muy potentes y de acción inmediata. Esta prueba no es apropiada para detectar anticoagulante lúpico, pero este puede interferir y dar falsos positivos.

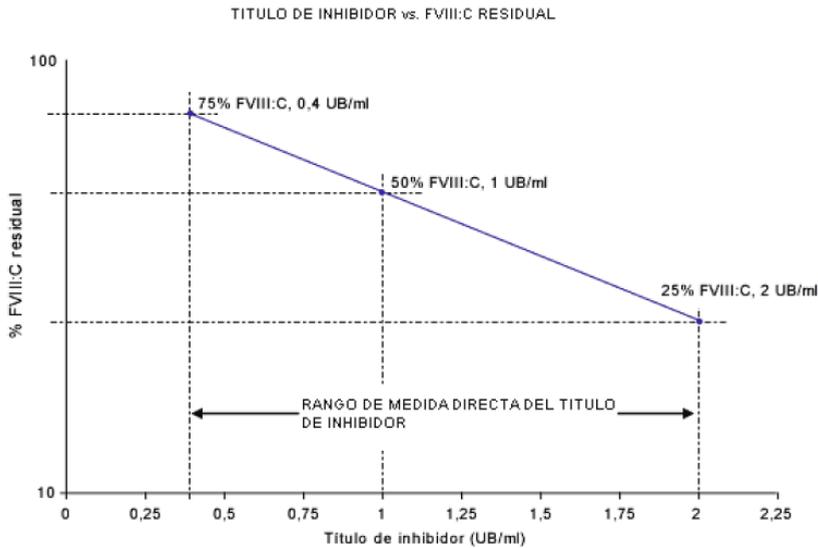
## 2.2. Técnica Bethesda

Publicada en 1975<sup>185</sup> e ideada por Kasper y cols., el test Bethesda se plasma en el esquema siguiente:

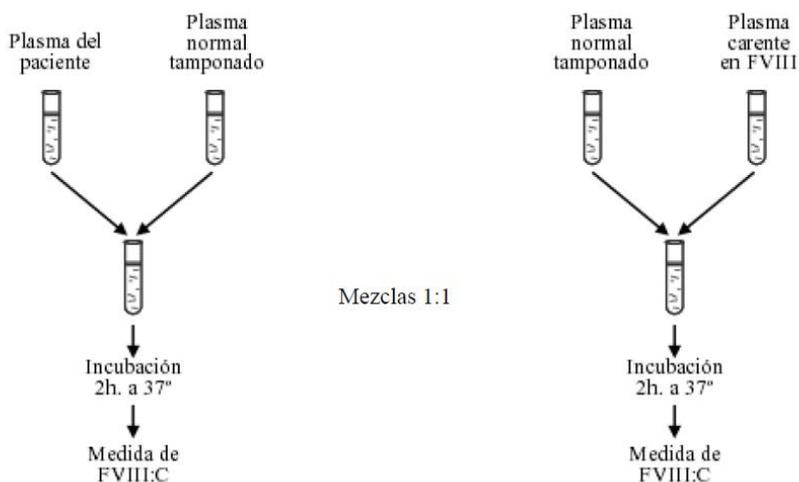


Obviamente, el valor del FVIII:C en la mezcla plasma normal/tampón imidazol (mezcla de referencia) será la mitad del plasma normal, esto es cercano al 50%, y el valor del FVIII:C en la mezcla plasma de paciente/plasma normal dependerá de la actividad del inhibidor en el plasma del paciente. Para cuantificar el inhibidor se debe obtener un valor de FVIII:C en la muestra problema situado porcentualmente entre el 25 y el 75 % del obtenido en la mezcla de referencia (FVIII:C residual); es conveniente realizar mezclas 1:1, haciendo diluciones en serie del plasma del paciente con tampón imidazol (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, y así sucesivamente) cuando se sospeche la presencia de un título alto de inhibidor. La dilución tendrá que ser tanto

más alta cuanto mayor sea el título de inhibidor que se espere. Estas diluciones se mezclan luego 1:1 con el plasma normal, se incuban 2 h a 37° C y se mide finalmente el valor de FVIII:C en cada muestra, de forma que se obtiene un FVIII:C residual entre el 25 y el 75%. En una gráfica semilogarítmica se representan los valores de FVIII:C residual frente al título de inhibidor (gráfica adjunta), de forma que al 25% de FVIII:C residual corresponde un título de inhibidor de 2 unidades Bethesda por mililitro (UB/ml), y al 75% un título de 0.4 UB/ml. El título Bethesda se calcula multiplicando simplemente el título correspondiente a la muestra cuyo porcentaje de FVIII:C residual está en el rango de medida (entre el 25 y el 75%) por su factor de dilución. Si hay más de una muestra de plasma de paciente que tenga un valor de FVIII:C residual comprendido en el rango de medida, lo habitual es promediar estas.



La modificación Nijmegen de la técnica Bethesda. Aparecida en 1995<sup>186</sup> (Verbruggen *et al*, 1995) esta modificación de la técnica Bethesda introduce solamente dos variaciones: el uso de un plasma normal tamponado con imidazol sólido hasta 0,1 M, pH 7,4 (con HCl 1 N), y la utilización de plasma carente de FVIII en lugar del tampón imidazol para diluir el plasma normal del paciente. Nada cambia en lo que respecta al resto del procedimiento. Los autores de esta variante sostienen que su adopción se traduce en una mayor especificidad, fundamentalmente en la discriminación de falsos positivos (títulos de inhibidor esencialmente por debajo de 1 UB/mL), y mayor reproducibilidad en los resultados. La técnica consiste en lo siguiente:



Recomendada por el Subcomité Científico de Estandarización del factor VIII y IX, la variante Nijmegen ha tenido en contra de su implantación generalizada la dependencia de plasma carente en FVIII, algo que encarece notablemente su realización. Al considerar ventajas frente a inconvenientes de la técnica Bethesda tradicional en comparación con la modalidad Nijmegen, la balanza está a favor de la primera. Una comunicación posterior (Verbruggen *et al*, 2002)<sup>187</sup> puede contribuir a cambiar esta situación, al afirmarse en ella que, la sustitución de plasma carente de FVIII por una solución de albúmina bovina al 4% aporta resultados tan válidos como los obtenidos con aquél, siendo también innecesario suplementar la albúmina con FVW.

### **3. Mapeo de epítomos en inhibidores del factor VIII**

El factor VIII maduro está compuesto por los dominios A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2, donde A1-a1-A2-a2-B conforman la cadena pesada y a3-A3-C1-C2 la cadena ligera. La digestión con trombina corta el FVIII en las regiones ácidas a1, a2 y a3, permitiendo obtener, mediante electroforesis, bandas discretas para A1, A2 y A3-C1-C2. Se puede determinar la especificidad de los inhibidores de un paciente frente a alguna de estas bandas realizando ensayos de western blot. Estos ensayos consisten, básicamente, en la transferencia de las bandas del gel a una membrana, de PVDF, membranas de "difluoruro de polivinilo". Immobilon, Millipore o similar. Esta membrana se incubará con el plasma del paciente de modo que los anticuerpos del paciente se unirán a los dominios contra los que vayan dirigidos. Un segundo anticuerpo marcado capaz de reconocer el primer anticuerpo permite delatar las bandas donde hay unión anticuerpo-dominio, revelando la especificidad de los anticuerpos del paciente.

#### **3.1. Digestión**

El factor VIII utilizado en esta técnica, de origen plasmático, se obtuvo antes de su estabilización mediante albúmina o cualquier otra proteína que pueda interferir en los resultados. La digestión del factor VIII se realizó con trombina humana (Enzyme Research Laboratories) con una razón de corte

FVIII:trombina de 30:1 en tampón Owren-veronal-CaCl<sub>2</sub> durante 2 horas a 37°C. La concentración final del factor VIII es de 100UI/mL

### 3.2. Electroforesis y western blot

La separación se realizó mediante electroforesis convencional SDS-PAGE en geles de acrilamida-bisacrilamida al 7,5% y *stacking* al 4%. Posteriormente, el resultado de la electroforesis se transfirió a una membrana de PDVF.

### 3.3. Incubaciones

Las membranas se bloquearon con leche en polvo desnatada al 5% durante 40 minutos y a temperatura ambiente.

En el caso problema la membrana se incubó con plasma del paciente diluido en tampón TBS-Tween-BSA hasta una concentración de 3 UB/mL siempre que fuese posible. Como control se realizó una incubación con anticuerpo policlonal anti-FVIII humano (Affinity Biologicals) diluido también en TBS-Tween-BSA. Ambas incubaciones se realizaron overnight a temperatura ambiente

### 3.4. Revelado

El control se incubó con un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa (Southern Biotechnology Associates, SBA). Los casos problema se incubaron con un anticuerpo secundario policlonal anti-IgG humano marcado con peroxidasa (Dako). Ambas incubaciones se realizaron 1h a oscuras y a temperatura ambiente.

El revelado se realizó en placa fotográfica mediante quimioluminiscencia. Los tiempos de exposición fueron 12, 10, 7 y 5 minutos.

## Anexo 2 RECUPERACIÓN Y VIDA MEDIA DEL FVIII

Para efectuar la recuperación del FVIII infundido el paciente debe seguir un periodo de lavado, esto es, sin administración de FVIII en los tres días previos. Se extrae una muestra de hemostasia para medir el título de inhibidor y determinar el FVIII:C (pre), así como un hemograma para conocer el hematocrito del paciente y poder calcular el volumen plasmático. Se administran 50 UI/kg de concentrado de factor y tras 15-20 minutos se extrae otra muestra y se vuelve a valorar el FVIII:C (post).

Cálculo del volumen plasmático en mL:  $\text{Peso en kg} \times 41 \frac{100 - \text{Hto}}{53}$

Recuperación en %:  $\frac{\text{V plasmático} \times (\text{FVIII post} - \text{FVIII pre})}{\text{UI de FVIII infundidas}}$

Para efectuar la vida media se extraen muestras a diferentes tiempos: 15', 1h, 2h, 4h, 6h, 24h y 48h y se valora el FVIII:C. Luego se calcula la vida media.