



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Importancia del Factor XI de la Coagulación
en Pacientes con Anticuerpos Antifosfolípidos
Positivos

D. Javier Pagán Escribano

2021

UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
FACULTAD DE MEDICINA

**Importancia del Factor XI de la coagulación en pacientes con anticuerpos
antifosfolípidos positivos**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Medicina por la
Universidad de Murcia.

PRESENTADA POR:

D. Javier Pagán Escribano

DIRIGIDA POR:

Dr. D. Javier Corral de la Calle

Dra. Dña. María Teresa Herranz Marín

MURCIA - 2021



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. JAVIER CORRAL DE LA CALLE, Profesor Titular de
Universidad del Área de MEDICINA en el Departamento de MEDICINA,
AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Importancia del Factor
XI de la coagulación en pacientes con anticuerpos antifosfolípidos positivos",
realizada por D. Javier Pagán Escribano, bajo mi inmediata dirección y
supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por
la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 23 de AGOSTO de 2021

CORRAL DE LA
CALLE, JAVIER
(AUTENTICACIÓN)

Digitally signed by CORRAL DE LA
CALLE, JAVIER (AUTENTICACIÓN)
DN: c=ES,
serialNumber=06560211J,
sn=CORRAL, givenName=JAVIER,
cn=CORRAL DE LA CALLE, JAVIER
(AUTENTICACIÓN)
Date: 2021.08.23 10:01:28 +02'00'

Mod:T-20



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

Dña. MARIA TERESA HERRANZ MARÍN, Profesora Asociada de Universidad del Área de MEDICINA en el Departamento de MEDICINA, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "**Importancia del Factor XI de la coagulación en pacientes con anticuerpos antifosfolípidos positivos**", realizada por D. JAVIER PAGÁN ESCRIBANO, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 5 de Septiembre de 2021

Mod:T-20

**A mi familia,
a Sombra y Tom, por estar siempre.
Para ti, papá.**

AGRADECIMIENTOS

Creo que es importante que todo comienzo de un buen manuscrito, científico y/o literario, empiece con el agradecimiento a todos aquellos que lo han hecho posible. El camino hasta llegar aquí ha sido a la vez arduo y satisfactorio, un increíble viaje a través del conocimiento, profesional y personal, en el que me he rodeado de grandes e increíbles compañeros y compañeras.

Javier, otorgarte adjetivos como estupendo, carismático, generoso, trabajador, emprendedor, entusiasta, y un largo etcétera, no albergarían todo lo que has significado para mí. Eres magnánimo, y por siempre te estaré agradecido por tu apoyo, tu constancia y tu amabilidad. Como investigador eres extraordinario, pero como persona y compañero eres formidable y admirable. Gracias.

Uge, has sido y eres pieza indispensable de este engranaje; esta “hija”, esta tesis doctoral, fruto de un duro trabajo, es nuestra, y siempre uniré a este “poker de ases” que somos. Eres una científica con una inteligencia, un conocimiento, entereza, sabiduría y tesón envidiables. Espero que llegues a lo más alto, y quien trabaje a tu lado tendrá la suerte de estar con una de las mejores profesionales que he conocido. Yo doy gracias desde que te conocí por formar parte de este equipo. Gracias.

Toñi, mil gracias. Siempre afable, siempre al quite de todo. Tengo el bonito recuerdo de ti, siempre dispuesta a recibir las muestras para este estudio, que llegaban de manos de un muchacho algo desgarbado e incluso, en ocasiones, a horas intempestivas, y siempre lo hiciste con amabilidad, con una dulce sonrisa y una gran profesionalidad. Has sido un soplo de aire fresco y dulzura en momentos duros. Gracias.

Vanesa, muchas gracias por todo tu apoyo como tutora, por rescatarme de la burocracia y la administración; y por estar siempre dispuesta a descolgar el teléfono para ayudarme, tanto en lo profesional, como en lo personal. Gracias.

Maite, siempre te he admirado. Hemos compartido muchos años juntos durante mi formación como médico internista y has sido para mi un ejemplo de profesionalidad, de buena médico y también de médico buena. En medicina clínica, en investigación, como una gran líder, siempre te he considerado una mujer digna de admiración. Siempre defenderé que para mí eres un referente. Me he sentido apoyado, ayudado, querido y protegido, y en momentos muy duros Maite, y siempre te estaré agradecido. Eres ejemplo, eres guía, eres maestra. Gracias

Jesús y Mari Juli. Cuando un niño comienza a dar sus primeros pasos, necesita ayuda, para que no tropiece, para que no se caída, y sobre todo, para que pueda empezar a andar solo. Sin vosotros probablemente no hubiera comenzado a andar en este fascinante mundo de la investigación, y sois quien me ayudasteis a emprender este camino y a hacerlo posible. Muchas gracias.

A mi familia, a toda ella, pero sobre todo, mi madre y mis hermanas, Ana y María, mis tres gracias, mis tres guardianas, habéis sido más que indispensables en este sendero, y en mi vida. Vosotras me habéis brindado el imprescindible apoyo en los momentos difíciles, y algunos muy difíciles. Me habéis rescatado y ayudado a salir a flote, y dado el empujón necesario para continuar. Y nunca me olvidaré de ti, papá, Antonio Pagán López, que desde lo más alto del cielo espero que estés orgulloso, a ti te dedico todo este trabajo y todo mi esfuerzo. Mi guía desde lo invisible, mi protector desde las sombras y mi ángel de la guarda, te quiero.

Y tú, Gabriel, llegaste a mi vida para darme el amor, el entusiasmo, la inspiración y la vitalidad que necesitaba, gracias.

A mis amigos, que tanto habéis soportado y a los que tanto he “taladrado”. Habéis sabido comprenderme, quererme y sostenerme cuando yo flaqueaba. Gracias por animarme a continuar, por alentarme a no decaer y a llegar a este final que disfrutaremos juntos.

Y no hubiera llegado a donde estoy si no es por mi siempre querido servicio de Medicina Interna del Hospital General Universitario Morales Meseguer. A mis compañeros, y algunos más que compañeros, amigos: Miguel, Ana, Alicia, esas “personas pluripatológicas” que por una u otras mil razones necesito y son indispensables en mi vida. Josemi, siempre ahí, siempre dispuesto, siempre un apoyo, un amigo. Muchas gracias.

También tengo que agradecer su gran apoyo a mi actual familia profesional, el servicio de Medicina Interna del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, que me acogió con los brazos abiertos, y me agarraron tan fuerte que nunca me dejaron caer. Con ellos he sido capaz de llegar hasta el final. A mis ya no compañeros, sino amigos, Kike, Miguel, Anto, Juanan, Clara y Mario, gracias. A todos, os agradezco de corazón vuestro incalculable apoyo.

A todos los pacientes que han participado, de una manera más o menos directa, en este trabajo, porque sin ellos nunca hubiera sido posible; porque sin ellos la ciencia no avanzaría.

Y para finalizar, no solo importa quien te ayuda a levantarte y a dar tus primeros pasos. A lo largo de todo el camino te vas a encontrar con personas, y algún que otro personaje, que te harán el camino a veces más fácil, y en ocasiones más duro, pero si estás dispuesto a aprender siempre saldrás fortalecido de cada experiencia. Luego están aquellas personas que aparecen al final, cuando flaqueas y no quedan fuerzas para continuar; estos nuevos acompañantes se convierten en un apoyo indispensable que te ayudan a conseguir llegar a la meta, ángeles al final del túnel. Y por supuesto están estas personas que siempre estuvieron contigo, durante todo el camino, ayudándote a vencer y a sortear obstáculos.

Gracias a todos y a todas, esta tesis no es mía, esta tesis es nuestra.

ABREVIATURAS

aA5: anticuerpos anti-anexina 5
AAF: portador asintomático de anticuerpos antifosfolípidos
a β 2GP1: anticuerpos anti- β 2GP1
a β 2GP1-D1: a β 2GP1 contra el dominio 1 de la β 2GP1
aCL: anticuerpos anti-cardiolipinas
ACHOs: anticonceptivos orales
ACO: anticoagulación oral
ACOD: anticoagulantes orales de acción directa
ADB: aspirina a dosis bajas
ADN: ácido desoxirribonucleico
ADP: adenosina difosfato
aFL: anticuerpos antifosfolípidos
AIT: ataque isquémico transitorio
AL: anticoagulante lúpico
AMM: asociación médica mundial
ANA: anticuerpos antinucleares
aPA: anticuerpos contra el ácido fosfático
aPE: anticuerpos anti-fosfatidiletanolamina
aPG anticuerpos anti-fosfatidilglicerol
aPI: anticuerpos anti-fosfatidilinositol
aPS: anticuerpos anti-fosfatidilserina
aPS/PT: anticuerpos contra el complejo fosfatidilserina/protrombina
aPT: anticuerpos anti-protrombina
ARN: ácido ribonucleico
ARNm: ARN mensajero
ASO: oligonucleótido antisentido
AT: antitrombina
AUC: *area under curve*
AVK: anti-vitamina K
 β 2GP1: beta 2 glicoproteína 1
C4BP: proteína transportadora de la fracción C4b del complemento
CIA: *chemiluminescence immuniassay*
CLSI: *Clinical & Laboratory Standards Institute*
CRM-: *Cross Reactive Material negative*
CRM+: *Cross Reactive Material positive*
CU: unidades de quimioluminiscencia
DE: desviación estándar
DLP: dislipemia
DM: diabetes mellitus
ECV: enfermedad cardiovascular
ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EMTC: enfermedad mixta del tejido conectivo
ENA: anticuerpos contra antígenos extraíbles del núcleo
EP: embolismo pulmonar

ETEV: enfermedad tromboembólica venosa
ES: esclerosis sistémica
FG: filtrado glomerular
FIX: factor IX de la coagulación
FRCV: factores de riesgo cardiovascular
FT: factor tisular
FX: factor X de la coagulación
FXI: factor XI de la coagulación
FXIa: factor XI de la coagulación activo
FXI:C: actividad coagulante del FXI
FXII: factor XII de la coagulación
FXIIa: FXII de la coagulación activo
GAPSS: *the Global Anti-Phospholipid Syndrome Score*
GPL: unidades de antifosfolípidos IgG/mL
HBPM: heparina de bajo peso molecular
HCQ: hidroxicloroquina
HELLP: *Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelets count*
HGUMM: Hospital General Universitario José María Morales Meseguer
HGURS: Hospital General Universitario Reina Sofía
HK: quinínogeno de alto peso molecular
HLA: antígeno leucocitario humano
HNF: heparina no fraccionada
HNF-4 α : factor de transcripción nuclear de hepatocitos-4 α
HR: *hazard ratio*
HTA: hipertensión arterial
IAM: infarto agudo de miocardio
IC: intervalo de confianza
ICAM-1: molécula de adhesión intracelular 1
IFI: inmunofluorescencia indirecta
IL: interleuquinas
INR: *International Normalized Ratio*
ISTH: Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia
KDa: Kilodalton
KO: *knockout*
LDLox: lipoproteínas de baja densidad oxidadas
LES: lupus eritematoso sistémico
LPS: lipopolisacárido
LR: livedo reticularis
MLPA: Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification
MPL: unidades de antifosfolípidos IgM/mL
NEJM: *New England Journal of Medicine*
NGS: *Next Generation Sequencing*
OR: Odds Ratio
PCA: proteína C activada
PC: proteína C
PK: precalicreína
PM: polimiositis

PS: proteína S
RCV: riesgo cardiovascular
RIC: rango intercuartílico
RMA: rango de medición analítica
RN: *ratio* normalizada
RPR: *Rapid Plasma Reagin*
RR: riesgo relativo
SAF: síndrome antifosfolípido
SAFc: síndrome antifosfolípido catastrófico
SAFo: síndrome antifosfolípido obstétrico
SAFp: síndrome antifosfolípido primario
SAFt: síndrome antifosfolípido trombótico
SAFs: síndrome antifosfolípido secundario
SAFSN: síndrome antifosfolípido seronegativo
SBH: Sociedad Británica de Hematología
SCT: *Silica Clotting Time*
SFX: SynthAFax
SNC: sistema nervioso central
SS: SynthASil
SSC: *Scientific Standardisation Subcommittee*
TAFI: inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina
TFPI: inhibidor de la vía del factor tisular
TNFa: factor de necrosis tumoral alfa
TP: tiempo de protrombina
TS: tiempo de sangrado
TT: tiempo de trombina
TTPa: tiempo parcial de tromboplastina activado
TV: trombosis venosa
TVP: trombosis venosa profunda
URL: unidades relativas de luz
VCAM-1: molécula de adhesión vascular 1
VDRL: *Veneral Disease Research Laboratories*
VVRd: Veneno de la Víbora de Russell diluido

ÍNDICE

1. RESUMEN	35
2. ABSTRACT	41
3. INTRODUCCIÓN	45
3.1. EL SÍNDROME ANTIFOSFOLÍPIDO	47
3.1.1. Características generales	47
3.1.2. Breve reseña histórica	49
3.1.3. Epidemiología del síndrome antifosfolípido	52
3.1.4. Patogénesis del Síndrome Antifosfolípido	54
3.1.5. Manifestaciones clínicas del Síndrome Antifosfolípido	60
3.1.6. Criterios clasificatorios del Síndrome Antifosfolípido	67
3.1.7. Perfil de Anticuerpos Antifosfolípido y otros factores de riesgo trombótico	71
3.1.8. Últimas recomendaciones en el manejo terapéutico del Síndrome Antifosfolípido	74
3.2. ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS	81
3.2.1. Características generales	81
3.2.2. Anticuerpos Antifosfolípidos “no criterio” de Síndrome Antifosfolípido	87
3.2.3. β -2-glicoproteína-1	89
3.3. EL FACTOR XI DE LA COAGULACIÓN	93
3.3.1. Bioquímica del FXI	93
3.3.2. Función del factor XI de la coagulación	95
3.3.3. Déficit de factor XI	101
3.3.4. El factor XI de la coagulación como nueva diana terapéutica antitrombótica	106
4. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	117
5. HIPÓTESIS	121

6. OBJETIVOS	125
6.1. OBJETIVO PRINCIPAL	125
6.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS	125
7. MATERIAL Y MÉTODOS	129
7.1. DISEÑO DEL ESTUDIO	129
7.2. POBLACIÓN DEL ESTUDIO	129
7.3. CONSIDERACIONES ÉTICAS	129
7.4. SUJETOS DEL ESTUDIO	130
7.4.1. Pacientes con anticuerpos antifosfolípidos	130
7.4.2. Estudios familiares	131
7.4.3. Cohorte de pacientes con déficit congénito	132
7.5. TOMA DE MUESTRAS	132
7.6. VARIABLES DEL ESTUDIO	133
7.6.1. Variables principales o dependientes	133
7.6.2. Variables generales o independientes	151
7.7. SEGUIMIENTO PROSPECTIVO DE LA COHORTE	158
7.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	158
7.8.1. Análisis estadístico bivariado	158
7.8.2. Análisis estadístico multivariado	159
7.8.3. <i>Antiphospholipid Syndrome-FXI score (APS-FXI Score)</i>	159
8. RESULTADOS	163
8.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y ANALÍTICAS GENERALES DE PACIENTES Y CONTROLES	163
8.1.1. Perfil de riesgo cardiovascular de nuestra muestra	164
8.2. DESCRIPCIÓN Y ANÁLISIS DE EVENTOS TROMBÓTICOS EN NUESTRA POBLACIÓN	167
8.2.1. Recurrencia trombótica	167

8.3. ANÁLISIS DEL PERFIL DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN PACIENTES CON ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS POSITIVOS	172
8.3.1. Estratificación del riesgo cardiovascular según el modelo predictivo SCORE	172
8.4. PERFIL DE ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS	175
8.5. DETERMINACIÓN DE FXI DE LA COAGULACIÓN	178
8.5.2. Análisis de la relación entre el perfil de aFL y el nivel de FXI:C	184
8.6. ANÁLISIS DEL FXI PLASMÁTICO MEDIANTE WESTERN BLOT	185
8.7. ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN <i>F11</i> EN PACIENTES Y CONTROLES CON DÉFICIT DE FXI	187
8.7.1. Secuenciación del gen <i>F11</i> en pacientes con déficit de FXI y aFL positivos	187
8.7.2. Secuenciación del gen <i>F11</i> en casos con déficit de FXI sin aFL positivos	196
8.7.3. Análisis de grandes deleciones y/o inserciones en el gen <i>F11</i> mediante “ <i>Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification</i> ” (MLPA)	200
8.8. POTENCIAL INTERFERENCIA DE LA DEFICIENCIA DE FXI EN LA DETERMINACIÓN DE ANTICOAGULANTE LUPICO	201
8.9. DEFICIENCIA ADQUIRIDA DEL FACTOR XI DE LA COAGULACIÓN	203
8.10. FXI COMO MARCADOR PRONÓSTICO EN PACIENTES CON aFL POSITIVOS: ANÁLISIS ESTADÍSTICO MULTIVARIADO	205
8.10.1. Modelo estadístico multivariable de predicción del riesgo de evento clínico en pacientes con aFL	205
8.10.2. Modelo estadístico multivariable de predicción del riesgo de evento clínico en pacientes con aFL	206
8.10.3. Modelo estadístico multivariable de predicción del riesgo de evento clínico en pacientes con aFL	207
8.10.4. Modelo estadístico multivariable de predicción del riesgo de evento clínico en pacientes con aFL	208
8.11. ESCALA aGAPSS	210

8.11.1. Determinación de la escala aGAPSS en nuestra cohorte	210
8.12. ESCALA APS-FXI	214
8.12.1. Evaluación del poder predictivo de la escala APS-FXI	216
8.13. ANÁLISIS COMPARATIVO DEL PODER PREDICTIVO DE EVENTO CLÍNICO EN NUESTRA MUESTRA ENTRE LA ESCALA AGAPSS Y DE LA ESCALA APS-FXI	220
9. DISCUSIÓN	225
9.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y ANALÍTICAS DE NUESTRA POBLACIÓN	225
9.1.1. Características generales de los pacientes del grupo SAF	226
9.1.2. Prevalencia de factores de riesgo cardiovascular clásicos	227
9.1.3. Factores de riesgo asociados con trombosis venosa	228
9.1.4. Tipo y localización de los eventos trombóticos	228
9.1.5. Supervivencia libre de trombosis	229
9.1.6. Recurrencia trombótica	229
9.2. PERFIL DE ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS DE NUESTRA POBLACIÓN	230
9.2.1. Papel de los aFL en el SAF	230
9.2.2. aFL y trombosis	231
9.3. FXI DE LA COAGULACIÓN	234
9.3.1. Métodos de determinación de los niveles de FXI y diagnóstico de la deficiencia de FXI	235
9.3.2. FXI de la coagulación y la patología trombótica	235
9.3.3. FXI de la coagulación y trombosis en aFL	237
9.4. NUEVO MODELO DE ESTRATIFICACIÓN DE RIESGO TROMBÓTICO EN PACIENTES CON aFL POSITIVOS: ESCALA APS_FXI	239
9.4.1. Modelos de predicción para el diagnóstico de SAF y estimación del riesgo trombótico	239
9.4.2. Modelo de estimación de riesgo trombótico: APS-FXI	242

9.5. DÉFICIT CONGÉNITO DE FXI: UN DESORDEN SUBESTIMADO	243
9.6. DÉFICIT DE FXI Y DETERMINACIÓN DE ANTICOAGULANTE LÚPICO: TEST DE MEZCLAS	247
9.6.1. Interferencia entre la deficiencia de FXI y la determinación del AL	249
10. CONCLUSIONES	253
11. BIBLIOGRAFÍA	257

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fenotipos clínicos del Síndrome Antifosfolípido

Figura 2. Mecanismos patogénicos de la trombosis y la comorbilidad obstétrica en el SAF

Figura 3. Acción de los aFL sobre dianas celulares y humorales implicadas en el desarrollo de eventos trombóticos en el SAF

Figura 4. Representación esquemática de las tres conformaciones de la β 2GP1 y la relativa disposición del dominio 1 con el epítipo inmunodominante

Figura 5. Estructura dimérica del FXI

Figura 6. Subunidad del FXI de la coagulación humano

Figura 7. Esquema del funcionamiento de la cascada de la coagulación

Figura 8. Perfil de riesgo cardiovascular en los grupos de nuestra cohorte

Figura 9. Supervivencia en años libre de trombosis hasta la aparición del primer evento trombótico

Figura 10. Tipo de recurrencia trombótica (arterial o venosa) en grupo SAF según el lecho vascular del primer evento trombótico

Figura 11. Tipo de recurrencia trombótica (arterial o venosa) en grupo TROM según el lecho vascular del primer evento trombótico

Figura 12. Clasificación de los pacientes del grupo AAF en función del riesgo cardiovascular según el modelo predictivo SCORE

Figura 13. Clasificación de los pacientes del grupo SAF en función del riesgo cardiovascular según el modelo predictivo SCORE

Figura 14. Análisis univariante de la prevalencia de los aFL en nuestra muestra

Figura 15. Prevalencia de exceso de FXI:C (FXI:C >150%) en los grupos de nuestra cohorte de acuerdo con los diferentes sistemas diagnósticos

Figura 16. Prevalencia del déficit de FXI:C (FXI:C <70%) en los grupos de nuestra cohorte de acuerdo con los diferentes sistemas diagnósticos

Figura 17. Comparación de medias de FXI:C entre pacientes del grupo SAF y el grupo AAF, empleando SynthAFax[®] y SynthASil[®]

Figura 18. Western blot representativo del FXI detectado en el plasma de casos de nuestra cohorte

Figura 19. Electroferograma (secuencia reversa y complementaria) del exón 5 del *F11* en un paciente (F101) con deficiencia de FXI en el que se identifica la mutación c.403G>T en heterocigosis

Figura 20. Consecuencia del cambio c.403G>T en la secuencia aminoacídica del FXI

Figura 21. Patrón de restricción de la PCR del exón 5 del gen *F11* tras digestión con la endonucleasa Hpy188III

Figura 22. Árbol genealógico de los dos probandos portadores de la mutación del gen *F11* c.403G>T (p.Glu135Ter) en heterocigosis

Figura 23. Niveles de FXI evaluados mediante Western blot en los miembros de las dos familias portadoras de la mutación c.403G>T

Figura 24. Mutación p.Arg268Cys

Figura 25. Niveles de FXI evaluados mediante Western blot en el sujeto portador de AAF con deficiencia de FXI causado por la mutación p.Arg268Cys en heterocigosis

Figura 26. Electroferograma del exón 12 del gen *F11* en el control sano con deficiencia de FXI con c.1327C>T en heterocigosis

Figura 27. Resumen de la información relativa a la mutación c.1327C>T del gen *F11* contenido en la base de datos de mutaciones identificadas en pacientes con deficiencia de FXI de la UCL

Figura 28. Niveles de FXI evaluados mediante Western blot en el sujeto sano portador de la mutación c.1327C>T (p.Arg443Cys)

Figura 29. Resultado del estudio mediante MLPA del gen *F11* en un caso representativo de los 11 casos con deficiencia de FXI que no presentaban alteración molecular en el gen tras su secuenciación

Figura 30. Evolución de los niveles de FXI:C determinados mediante SyntASil en plasma sin y con dilución con plasma deficiente en FXI

Figura 31. Comparación de medias de la escala aGAPPS entre los pacientes con antecedente de evento clínico y pacientes sin antecedentes de evento tromboembólico ni de comorbilidad obstétrica de nuestra cohorte

Figura 32. Curva ROC que muestra la capacidad discriminativa de la escala aGAPPS para evento clínico en nuestra muestra

Figura 33. Comparación de medias de la escala aGAPPS entre los pacientes del grupo SAF y los portadores asintomáticos de aFL

Figura 34. Análisis de la capacidad discriminativa de evento clínico de la escala aGAPPS en nuestros pacientes con anticuerpos antifosfolípidos positivos

Figura 35. Curvas ROC de los modelos propuestos en la escala APS-FXI para determinar la capacidad predictiva de evento clínico en pacientes con aFL

Figura 36. Análisis de los puntos de corte de la escala APS-FXI para determinar el de mayor precisión predictiva de evento clínico en pacientes con aFL

Figura 37. Análisis por curvas ROC. Escala APS-FXI *versus* aGAPSS en la predicción de evento clínico en nuestros pacientes con aFL

Figura 38. Localización del residuo Arg443 afectado por la mutación p.Arg443Cys en la estructura cristalográfica del FXI

Figura 39. Localización del residuo Arg268 afectado por la mutación p.Arg268Cys en la estructura cristalográfica del FXI

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios de clasificación para el SAFc

Tabla 2. Criterios de Sapporo 1999

Tabla 3. Criterios de clasificación para el SAF

Tabla 4. Principales estrategias terapéuticas antitrombóticas inhibidoras del FXI

Tabla 5. Ensayos clínicos realizados hasta la fecha empleando agentes que tienen como diana al FXI

Tabla 6. Características analíticas de los ensayos de aCL utilizados en este estudio

Tabla 7. Características analíticas de los ensayos de a β 2GP1 utilizados en este estudio.

Tabla 8. Lista de cebadores utilizados para la amplificación del gen del FXI

Tabla 9. Características del procedimiento de la reacción de secuenciación

Tabla 10. Cebadores utilizados para la generación de los 93 amplicones que cubren el gen *F11*

Tabla 11. Variaciones genéticas de *F11* genotipadas mediante RT-PCR

Tabla 12. Características de los ensayos de ENA utilizados en este estudio

Tabla 13. Características clínicas y analíticas de los grupos que forman nuestra cohorte

Tabla 14. Descripción y análisis de eventos trombóticos en los grupos que presentaban esta clínica

Tabla 15. Análisis univariante de variables sociodemográficas y variables de riesgo cardiovascular entre los grupos con aFL: SAF y AAF

Tabla 16. Análisis univariante de la prevalencia de aFL y el perfil de riesgo trombótico asociado a los aFL en los grupos de estudio con aFL

Tabla 17. Niveles de FXI:C determinados con dos activadores diferentes de la ruta de contacto, sílica, ácido elágico, o mediante el resultado global, en cada grupo de sujetos de nuestra cohorte

Tabla 18. Análisis univariante de los niveles de FXI:C entre pacientes con SAF y portadores asintomáticos de aFL

Tabla 19. Sujetos con deficiencia congénita de FXI con alguna determinación positiva de AL por SCT y/o VVRd

Tabla 20. Modelo multivariable de regresión logística binaria con los factores predictores independientes de evento clínico

Tabla 21. Modelo multivariable de regresión logística binaria con los factores predictores independientes de evento clínico

Tabla 22. Modelo multivariable de regresión logística binaria con los factores predictores independientes de evento clínico

Tabla 23. Modelo multivariable de regresión logística binaria con los factores predictores independientes de evento clínico

Tabla 24. Puntuación asignada a cada variable según su coeficiente B obtenido en el análisis multivariado

Tabla 25. Modelos evaluados para determinar la capacidad predictiva de la escala APS-FXI

Tabla 26. Escala APS-FXI, escala para estimar el riesgo de evento clínico en pacientes con aFL positivo

1. RESUMEN

1. RESUMEN

Antecedentes y objetivos: el diagnóstico del síndrome antifosfolípido (SAF) se basa en la combinación de eventos clínicos (trombosis venosa y/o arterial y/o complicaciones obstétricas como abortos espontáneos y/o recurrentes e insuficiencia placentaria) y la detección de anticuerpos antifosfolípidos (aFL) circulantes. Es una de las causas más comunes de trombofilia adquirida en la población general y causa importante de morbilidad en el embarazo. Actualmente, el tratamiento del SAF es la anticoagulación oral (ACO) indefinida con fármacos antivitamina K (AVK). Aunque los factores de riesgo cardiovascular incrementan el riesgo de trombosis en pacientes con aFL, desgraciadamente no se disponen de biomarcadores con claro valor pronóstico. El factor XI (FXI) de la coagulación podría ser un excelente candidato ya que se ha relacionado estrechamente con la patología trombotica: niveles elevados de FXI en sangre se asocia con mayor riesgo trombotico, mientras que la deficiencia de FXI tiene un potente efecto antitrombotico, y se ha demostrado que el FXI puede ser una diana de los aFL. Por ello, nuestra hipótesis fue que los niveles de FXI podrían tener valor pronóstico en pacientes con aFL. Los objetivos de este estudio fueron: identificar elementos implicados en el riesgo trombotico en pacientes con aFL positivos, evaluando especialmente el papel del FXI; describir las características funcionales, biológicas y moleculares de los casos con deficiencia de FXI; estudiar la posible interferencia del déficit del FXI en la determinación de los aFL; y elaborar una escala predictiva que ayude a estimar el riesgo trombotico en pacientes con aFL positivos.

Material y métodos: estudio multicéntrico, transversal y observacional, con componente analítico, sobre una base de datos prospectiva, en el que se incluyeron pacientes mayores de 18 años, portadores asintomáticos de aFL y pacientes diagnosticados de SAFp trombotico y/u obstétrico, atendidos en la Unidad de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas (UEAS) del hospital general universitario Morales Meseguer (HGUMM) y los detectados en la base de datos del laboratorio y del Servicio de Documentación del mismo hospital. Se

analizaron variables clínicas, analíticas y epidemiológicas y se llevó a cabo un estudio bioquímico (Western blot) y funcional (FXI:C con dos activadores diferentes) en todos los pacientes completando un estudio molecular del gen *F11* mediante secuenciación y MLPA en los casos con deficiencia de FXI. Realizamos un análisis de regresión logística binaria y en base a sus resultados se diseñó una escala de estimación de riesgo trombótico. La capacidad predictiva de los modelos se analizó mediante curvas ROC. Los cálculos se realizaron con el paquete estadístico SPSS Statistics v23.

Resultados: se analizaron 347 pacientes que cumplieron los criterios de selección. La media de FXI:C con SynthAFax (SFX) fue de 114,3% (DE 31,4); mientras que la mediana de FXI:C determinada con SynthASil (SS) fue de 105,3% (RIC 36,8). Los valores de FXI:C fueron significativamente más altos en pacientes con SAF que en los portadores asintomáticos de aFL (AAF). Los casos con niveles protrombóticos de FXI (> 150%) fueron 14 veces más altos en el grupo SAF (OR= 14,95; IC95%:1,95–114,83; p= 0,009), mientras que los casos con deficiencia de FXI (<70%) fueron 4 veces más altos en el grupo AAF (OR= 4,93; IC95%:1,31–18,54; p= 0,018). En tres casos la deficiencia de FXI se justificaba por causas genética, dos portadores de la variante Ashkenazí p.Glu135Ter; mientras que los análisis de dilución confirmaron la presencia de inhibidores en los 11 pacientes restantes con deficiencia de FXI. En el análisis multivariado se confirmaron como factores de riesgo independientes para evento clínico en pacientes con aFL positivos variables anteriormente implicadas en SAF como la dislipemia, el isotipo IgG de los aB2GP1 y el AL; pero nuestro estudio es el primero que muestra el importante valor pronóstico de los niveles de FXI, tanto en exceso (OR= 11,57; IC95%:1,47–90,96; p= 0,020); como en déficit (OR= 0,29; IC95%:0,05–0,85; p= 0,029). Siguiendo el modelo estadístico de Sciascia, realizamos una escala predictiva de evento clínico para pacientes con aFL positivos basada en coeficientes β , incluyendo por primera vez el FXI entre los ítems, la escala APS-FXI. Mediante curva ROC demostramos que el APS-FXI tenía un mejor ajuste y capacidad de predicción en nuestra cohorte de pacientes con aFL positivos que la escala aGAPSS.

Conclusiones: en nuestra población de pacientes con aFL positivos, los niveles elevados de FXI (FXI:C > 150%) se asociaron con un riesgo 14 veces mayor de padecer un evento trombótico, mientras que en los casos de deficiencia de FXI (FXI:C < 70%) el riesgo de sufrir eventos clínicos disminuye casi 5 veces. En la mayoría de nuestros casos con FXI:C < 70%, la deficiencia era adquirida. Sólo en 3 de los casos con déficit se identificó una base congénita, identificando en dos de ellos, por primera vez en España, una mutación característica de la población judía Ashkenazí. En nuestro estudio se confirmó la asociación del AL con los eventos trombóticos en el SAF. El AL fue el único de los aFL que se mantuvo en el análisis multivariante como factor de riesgo independiente de evento clínico en los pacientes con SAF; además la prevalencia de factores de riesgo cardiovascular (FRCV) como HTA, DLP y IMC > 30 Kg/m² fue significativamente mayor en el grupo SAF en comparación con el grupo AAF. La buena correlación de los niveles de FXI con la patología trombótica en paciente con aFL positivos, apoyaría el empleo de escalas pronósticas que incluyeran la determinación de los niveles de FXI en la estimación del riesgo trombótico.

Palabras clave: factor XI, coagulación, síndrome antifosfolípido, anticuerpos antifosfolípidos, fenómeno tromboembólico.

2. ABSTRACT

2. ABSTRACT

Background and objectives: the diagnosis of antiphospholipid syndrome (APS) is based on the combination of clinical events (venous and / or arterial thrombosis and / or obstetric complications such as spontaneous and / or recurrent abortions and placental insufficiency) and the detection of circulating antiphospholipid antibodies (aPL). It is one of the most common causes of acquired thrombophilia in the general population and a major cause of morbidity in pregnancy. Currently, the treatment of APS is indefinite oral anticoagulation (OAC) with antivitamin K (VKA) drugs. Although cardiovascular risk factors increase the risk of thrombosis in patients with aPL, unfortunately there are no biomarkers with a clear prognostic value. The factor XI of coagulation cascade (FXI) could be an excellent candidate since it has been closely related to thrombotic pathology: elevated levels of FXI in the blood are associated with increased thrombotic risk, whereas FXI deficiency has a potent antithrombotic effect, and FXI has been shown to be a target of aPL. Therefore, our hypothesis was that FXI levels could have prognostic value in patients with aPL. The objectives of this study were: to identify elements involved in thrombotic risk in patients with positive aPL, especially evaluating the role of FXI; describe the functional, biological, and molecular characteristics of cases with FXI deficiency; study the possible interference of the FXI deficit in the determination of aPL; and develop a predictive scale to help estimate thrombotic risk in patients with positive aPL.

Material and methods: multicenter, cross-sectional and observational study, with an analytical component, on a prospective database, which included patients older than 18 years, asymptomatic carriers of aPL and patients diagnosed with thrombotic and/or obstetric APS, treated in the Systemic Autoimmune Diseases Unit of the Morales Meseguer general university hospital and those detected in the database of the laboratory and the Documentation Service of the same hospital. Clinical, analytical and epidemiological variables were analyzed, and a biochemical (Western blot) and functional study of FXI

(FXI:C with two different activators) was carried out in all patients, completing a molecular study of the *F11* gene by sequencing and MLPA in cases with FXI deficiency. We performed a binary logistic regression analysis and based on its results, a thrombotic risk estimation scale was designed. The predictive capacity of the models was analyzed using ROC curves. The calculations were carried out with the statistical package SPSS Statistics v23.

Results: 347 patients who met the selection criteria were analyzed. The mean FXI:C with SynthAFax (SFX) was 114.3% (SD 31.4); while the median FXI:C determined with SynthASil (SS) was 105.3% (IQR 36.8). FXI:C values were significantly higher in patients with APS than in asymptomatic carriers of aPL (AAF). Cases with prothrombotic levels of FXI (> 150%) were 14 times higher in the APS group (OR= 14,95; 95% CI: 1.95-114.83; p= 0.009), while the cases with FXI deficiency (<70%) were 4 times higher in the AAF group (OR= 4.93; 95% CI: 1.31-18.54; p= 0.018). In three cases FXI deficiency was caused by genetic defects in *F11*, two carrying the Ashkenazy p.Glu135Ter variant; while dilution analyzes confirmed the presence of inhibitors in the remaining 11 patients with FXI deficiency. Multivariate analysis confirmed dyslipidemia, the IgG isotype of aB2GP1 and AL as independent risk factors for clinical events in patients with positive aPL, variables previously involved in APS; but our study is the first one to show the prognostic role of FXI levels, so much in excess (OR= 11.57; 95% CI: 1.47-90.96; p= 0.020); as in deficit (OR= 0.29; 95% CI: 0.05-0.85; p= 0.029). Following the statistical model of Sciascia, we carried out a predictive scale of clinical event for patients with positive aPL based on β coefficients, including for the first time FXI among the items, the APS-FXI scale. Through ROC curve we demonstrated that the APS-FXI scale had a better fit and predictability in our cohort of patients with positive aPL than the aGAPSS scale.

Conclusions: in our population of patients with positive aPL, elevated levels of FXI (FXI: C>150%) were associated with a 14 times greater risk of suffering a thrombotic event, while in cases of FXI deficiency (FXI: C<70 %) the risk of suffering clinical events decreases almost 5 times. Most of our cases with FXI:C<70%, had an acquired cause. Only in 3 cases with FXI deficiency had, a

congenital base, identifying in two of them, for the first time in Spain, a characteristic mutation of the Ashkenazy Jewish population. In our study, the association of LA with thrombotic events in APS was confirmed. LA was the only one of the aPL that remained in the multivariate analysis as an independent risk factor for a clinical event in patients with APS. Also the prevalence of cardiovascular risk factors such as hypertension, DLP and BMI > 30 Kg / m² was significantly higher in the APS group compared to the AAF group. The good correlation of FXI levels with thrombotic pathology in patients with positive aPL would support the use of prognostic scales that include the determination of FXI levels in the estimation of thrombotic risk.

Keywords: factor XI, coagulation, antiphospholipid syndrome, antiphospholipid antibodies, thromboembolic phenomenon.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. EL SÍNDROME ANTIFOSFOLÍPIDO

3.1.1. Características generales

El síndrome antifosfolípido (SAF) es una enfermedad autoinmune sistémica en la que interactúan múltiples y diferentes factores, procoagulantes y proinflamatorios, que inducen la aparición de eventos tromboembólicos y/o complicaciones obstétricas, en presencia de títulos elevados y persistentes de anticuerpos antifosfolípidos (aFL) (1). Los avances en las técnicas de laboratorio desarrolladas para la detección e identificación de anticuerpos, junto con una mayor y mejor comprensión de la patogénesis del síndrome, han hecho que el estudio del SAF sea un campo en continua evolución.

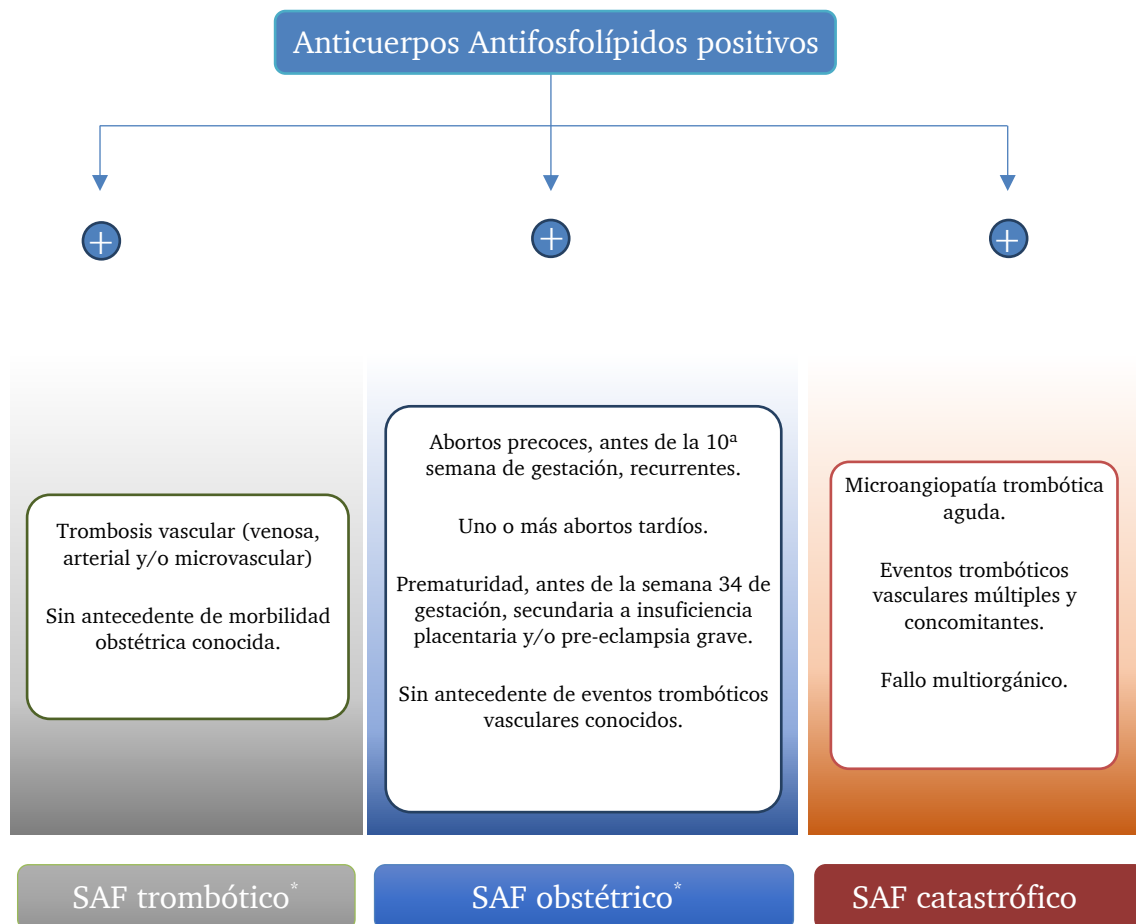
El SAF es considerado una de las causas más comunes de trombofilia adquirida y de morbilidad obstétrica (1), especialmente en población joven (2). A diferencia de lo que suele ocurrir con otros estados trombofílicos, los eventos trombóticos en el SAF pueden ocurrir en cualquier localización del lecho vascular: venas, arterias y/o sistema microvascular, lo que determina el cuadro clínico característico del síndrome. (3,4).

En función de su asociación con otras enfermedades autoinmunes sistémicas el SAF puede ser primario (SAFp), cuando aparece aislado en ausencia de otra enfermedad relacionada, o secundario (SAFs). Los pacientes con LES o artritis reumatoide son los que presentan una mayor prevalencia de SAFs con respecto a otras conectivopatías (5).

El SAF se describió por primera vez en pacientes con LES y en pacientes diagnosticados de síndromes *lupus-like* (3,6). Sin embargo *The Euro-Phospholipid Project* demostró que el SAFp es más prevalente (53%) que los SAFs asociados a LES o a síndromes *lupus-like* (42%) (7). Ambos grupos tienen un perfil clínico muy parecido, con algunas excepciones: los pacientes con SAF asociado a LES tienen más episodios de artritis y de *livedo reticularis* (LR); y los pacientes con LES suelen presentar con mayor frecuencia trombocitopenia y leucopenia (7).

El SAF es clínicamente heterogéneo, con episodios que varían desde trombosis leve a cuadros trombóticos potencialmente mortales, incluso con un tratamiento anticoagulante adecuado. Aunque se han descrito una gran variedad de manifestaciones clínicas relacionadas con la presencia de aFL, la prevalencia real de la mayoría de ellas se desconoce, siendo la trombosis venosa (TV) la presentación más frecuente (2,8). Dependiendo del fenotipo clínico, podemos diferenciar entre el denominado SAF trombótico (SAFt) (9), en el caso de pacientes con antecedentes de uno o más eventos trombóticos sin comorbilidad obstétrica en el momento del diagnóstico; y el SAF obstétrico (SAFo), cuando la clínica se circunscribe a la morbilidad obstétrica sin antecedentes de eventos trombóticos (9–11). Ambos fenotipos son considerados por algunos autores como entidades clínicas diferenciadas (12), y con distintos mecanismos patogénicos (9,12–14). Sin embargo, el estudio sobre la implicación de otros anticuerpos, o diferentes especificidades en los epítomos de los aFL, no han logrado encontrar ninguna diferencia entre el SAFt y el SAFo, lo que sugiere que los mismos autoanticuerpos pueden inducir ambos fenotipos clínicos (9) (Figura 1). De momento, los posibles mecanismos patogénicos subyacentes a la existencia de variantes vasculares u obstétricas puras de SAF son desconocidos (15,16).

Dentro del espectro clínico del SAF existe una tercera variante, mucho menos frecuente (aproximadamente un 1% de todos los casos de SAF), con un cuadro clínico caracterizado por microangiopatía trombótica aguda, eventos trombóticos múltiples concomitantes, fallo multiorgánico y elevada mortalidad, denominado SAF catastrófico (SAFc) (Figura 1) (2,8,17–19)



* En la actualidad el SAFt y el SAFo se consideran una misma entidad con diferentes manifestaciones clínicas. En un 5% de las mujeres con SAF coexisten la patología obstétrica y trombótica.

Figura 1. Fenotipos clínicos del Síndrome Antifosfolípido.

3.1.2. Breve reseña histórica

El SAF fue descrito por primera vez por Graham Hughes en 1983 (3) en una serie de pacientes diagnosticados de LES con antecedentes de trombosis vascular, abortos de repetición y anticoagulante lúpico (AL) positivo (3,6). Las manifestaciones más características de estos pacientes fueron la presencia de

trombocitopenia, LR, eventos tromboembólicos, abortos espontáneos recurrentes y afectación neurológica (3,6,20).

La primera descripción de los aFL se produjo en 1906 cuando August Paul von Wassermann, patólogo y bacteriólogo alemán, puso de manifiesto la existencia de aFL en su estudio sobre el Sistema del Complemento (21). Junto con Albert Neisser y Carl Bruck desarrollaron la primera prueba para la determinación de anticuerpos en pacientes con sífilis, a la que denominaron reagina (21), empleando como antígeno un extracto de lípidos, que contenía fosfolípidos, procedente de muestras hepáticas de recién nacidos fallecidos de sífilis congénita. Esta prueba ha sido modificada con el paso de los años, con el fin de mejorar su sensibilidad y especificidad, obteniéndose las técnicas empleadas en la actualidad como *Venereal Disease Research Laboratories* (VDRL) y *Rapid Plasma Reagin* (RPR).

Fue K. Landsteiner quien descubriría que el antígeno empleado en la reacción de Wasserman podría obtenerse de diferentes tejidos, humanos y animales (21,22). Los hallazgos de Landsteiner y los avances serológicos que siguieron a la reagina de Wasserman, permitieron a Mary Pangborn, en 1942, demostrar la presencia de este antígeno en el corazón de buey, al que denominaron cardiolipina (22,23). Una década después, se describieron los primeros falsos positivos en la serología de sífilis: pacientes con determinaciones positivas de VDRL y RPR que no habían estado en contacto con el *Treponema pallidum*, microorganismo causante de la enfermedad. Los casos con serología falsamente positiva se dividieron en dos grupos: i) un primer grupo denominado de “reactividad aguda”, en el que se incluyeron pacientes con infecciones agudas por virus, mycoplasma y plasmodium; ii) y un segundo grupo denominado de “reactividad crónica”, que incluían a usuarios de drogas por vía parenteral, pacientes con enfermedades autoinmunes sistémicas y pacientes ancianos (24,25).

En 1952, los investigadores Conley y Hartmann hicieron la primera referencia al término AL (26). En su trabajo de investigación describieron un

inhibidor de la coagulación con la capacidad de prolongar el tiempo de protrombina a pesar de diluir el plasma de los pacientes con plasma de sujetos sanos. Como este efecto anticoagulante fue más frecuente en pacientes con lupus, lo denominaron anticoagulante lúpico por su comportamiento "*in vitro*", aunque su presencia se asociaba a un aumento de trombosis "*in vivo*", como demostró Bowie en 1963 (27). Unos años más tarde, Nilsson y colaboradores, relacionaron los abortos de repetición con la presencia de AL (28). Desde ese momento encontramos en la literatura científica numerosos estudios que asocian la presencia de AL positivo con la aparición de eventos trombóticos (29–32).

La proliferación científica que acompañó al descubrimiento de los aCL y el AL, con evidencias crecientes sobre la asociación entre pruebas serológicas, coagulométricas, eventos trombóticos y el LES, ayudó a G. Hughes a formular la hipótesis de una nueva entidad a la que denominó inicialmente Síndrome Anticardiolipina (33). En su artículo publicado en *The Lancet*, en 1983, Harris y Hughes emplearon por primera vez el término aFL (20) e introdujeron el concepto de SAF al observar que los sueros de los pacientes con Síndrome Anticardiolipina reaccionaban también contra otros fosfolípidos. Fue en la conferencia de la *Prosser White Oration* de la Sociedad Británica de Dermatología donde Hughes describió por primera vez lo que hoy conocemos como SAFp y SAFs (34).

En 1990, tres grupos de investigadores de manera casi simultánea demostraron que el principal blanco antigénico de los aFL era la β 2-glicoproteína-I (β 2GP1) (35–37). Este suceso cambió el rumbo de las investigaciones y el estudio de los anticuerpos anti- β 2GP1 (a β 2GP1) despertó en los años siguientes un gran interés por el entendimiento de la patogenia del SAF.

El conocimiento creciente sobre la fisiopatogenia y las manifestaciones clínicas del SAF, unido a la aparición de múltiples series de casos en los años siguientes a su definición (38–40), llevó a la necesidad de establecer criterios diagnósticos de la enfermedad. Los criterios preliminares nacieron durante la

celebración del Octavo Simposio Internacional sobre aFL, en Japón (Sapporo, 1999) (41), y posteriormente fueron actualizados en 2006, durante la conferencia de consenso realizada en Sídney, en el Undécimo Congreso Internacional sobre aFL (1). Estos criterios clasificatorios de SAF se mantienen vigentes en la actualidad (ver apartado “1.4 Criterios diagnósticos-clasificadorio).

3.1.3. Epidemiología del síndrome antifosfolípido

Se desconoce la prevalencia e incidencia exactas de del SAF en la población general, debido en parte a la heterogeneidad metodológica entre los estudios publicados con respecto a las técnicas de análisis, la definición de positividad de los aFL y las manifestaciones clínicas que forman parte del síndrome. No obstante, las estimaciones actuales establecen una incidencia en torno a 2-5 casos nuevos de SAF por cada 100.000 personas/año, con una prevalencia aproximada de 40-50 casos/100.000 personas (42–44).

La prevalencia de aFL en la población general varía entre los estudios publicados. García y Erkan, en su revisión publicada en *The New England Journal of Medicine*, describen una prevalencia entre donantes de sangre sanos del 10% de aCL y del 1% en el caso del AL (5). Por otro lado, Andreoli y colaboradores determinaron la prevalencia de aFL en pacientes con diferentes entidades tromboembólicas, observando una positividad para aFL del 13.5% en ictus; 11% en IAM; 9,5% en TVP y 6% en mujeres con morbilidad obstétrica (45,46). En un sub-análisis basado en 81 estudios, teniendo en cuenta todos los casos en conjunto, mostró que la frecuencia de positividad de aFL fue tres veces mayor en este grupo en comparación con los controles (10% frente a 3%) (45–47). Y en un estudio muy reciente, realizado con 491 pacientes jóvenes que presentaban un primer evento tromboembólico venoso idiopático, la prevalencia de SAF fue del 9% (48).

En un estudio realizado en población estadounidense, tanto la prevalencia como la incidencia de SAF aumentaron con la edad, alcanzando su punto máximo en los pacientes con 75 años o más (44), pero no está claro si la

presencia de estos anticuerpos en pacientes mayores tiene un papel patogénico, o por el contrario, se trata de un epifenómeno asociado a un proceso subyacente, neoplásico o de otra etiología (49). En algunos estudios los valores más altos de aFL se informaron en pacientes sanos centenarios, pero sin una asociación clara con las manifestaciones clínicas de SAF (50).

Se ha demostrado que algunas enfermedades infecciosas (víricas, bacterianas y producidas por parásitos) se asocian con la presencia de aFL. Algunos ejemplos son el parvovirus B19, el virus de la hepatitis C y las infecciones por *Mycobacterium leprae* y *Treponema pallidum* (51,52). Los aFL asociados con infecciones suelen ser transitorios y sólo en casos excepcionales se acompañan de manifestaciones clínicas de SAF (53,54). También en algunas entidades neoplásicas, sólidas y/o hematológicas, como por ejemplo el linfoma, se ha demostrado una mayor tasa de incidencia de aFL positivos (55).

Los pacientes con antecedentes de enfermedades autoinmunes sistémicas tienen una mayor prevalencia de aFL con respecto a la población general. La prevalencia de aFL en pacientes con LES varía del 12 al 44% para los aCL, del 15 al 34% para el AL y del 10 al 19% para los anticuerpos anti β 2GP1 (a β 2GP1). Aproximadamente entre el 30 y el 40% de los pacientes con LES presentan aFL positivos (43,56), y entre un 10 y un 20% tienen manifestaciones clínicas propias del SAF, especialmente trombosis venosa y/o arterial (53,57,58). En la *Hopkins Lupus Cohort* la prevalencia de aCL y de AL fue del 46 y del 26%, respectivamente (59). En algunos estudios se ha planteado que la fluctuación de los títulos de anticuerpos asociada a la actividad de la enfermedad de base y/o al tratamiento recibido pueden subestimar la verdadera frecuencia de aFL en LES (60).

Existen factores genéticos que influyen en la variación étnica del SAF (51,61). La predisposición genética está determinada en parte por los genes del sistema antígeno leucocitario humano (HLA, acrónimo inglés de *Human Leukocyte Antigen*) (62). Estudios poblacionales sugieren que determinados haplotipos HLA confieren mayor susceptibilidad para desarrollar SAFp, y ciertos

genotipos HLA se asocian con la presencia de AL y aCL (61,63,64). Además se han estudiado otros genes fuera del sistema HLA que pueden predisponer al desarrollo de SAF (62).

3.1.4. Patogénesis del Síndrome Antifosfolípido

El conocimiento sobre la patogénesis del SAF ha aumentado enormemente desde la descripción inicial de la enfermedad. Actualmente, el SAF se considera una entidad protrombótica e inflamatoria, mediada por anticuerpos aFL (5,65,66) 96,97). Sin embargo, la heterogeneidad de las manifestaciones clínicas y el hecho de que no todos los pacientes con aFL positivos, incluso con títulos elevados, presenten eventos trombóticos, sugiere que otros factores juegan un papel fisiopatológico importante en el desarrollo de la enfermedad (69,70).

Algunos grupos de investigación postulan que los distintos fenotipos del SAF se deben, al menos en parte, a las diferentes vías de señalización intracelular activadas por los aFL (67,71,72). Los estudios en modelos animales han demostrado que los aFL actúan sobre multitud de dianas celulares y antigénicas: células endoteliales, monocitos, plaquetas, células endometriales, células deciduales, factores de la coagulación y sus proteínas reguladoras, células inflamatorias y mediadores inflamatorios, y sobre el sistema del complemento (53,73) (Figura 2).

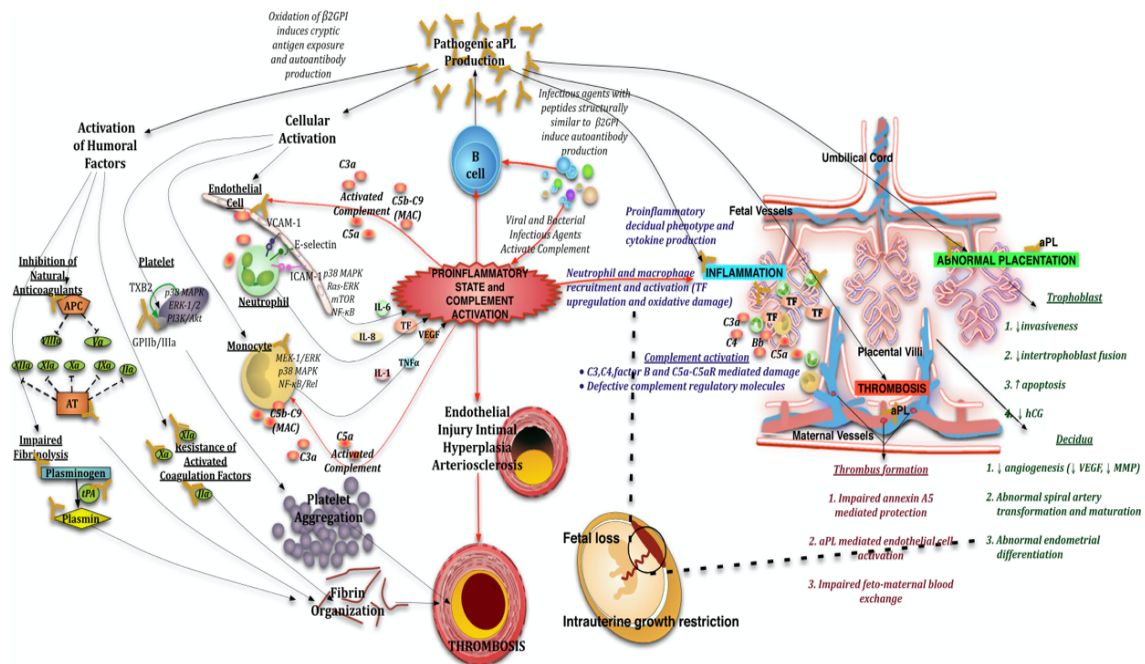


Figura 2. Mecanismos patogénicos de la trombosis y la comorbilidad obstétrica en el SAF, figura tomada de Willis R, Gonzalez EB, Brasier AR. *The Journey of Antiphospholipid Antibodies From Cellular Activation to Antiphospholipid Syndrome. Curr Rheumatol Rep. 2015;17 (3) (73).*

Esta compleja interacción entre los aPL con elementos celulares y humorales produce un estado proinflamatorio y protrombótico, que reduce el umbral para la precipitación de fenómenos tromboembólicos por un factor desencadenante secundario. Entre los distintos factores desencadenantes encontramos factores ambientales (como infecciones), factores inflamatorios (por ejemplo, enfermedades del tejido conectivo) u otros factores procoagulantes no inmunológicos (como los anticonceptivos que contienen estrógenos, un antecedente quirúrgico reciente o la inmovilización prolongada) (69,72). Esta teoría se conoce como la hipótesis del “*Second Hit*”. La primera

condición necesaria, o “*first hit*”, sería el estado protrombótico y proinflamatorio inducido por los aFL, y la segunda, o “*second hit*”, el evento o factor desencadenante de la trombosis (53,65,70). El mecanismo fisiopatológico que contribuye a esta situación protrombótica latente, denominada “*first hit*”, incluye la activación mediada por aFL de elementos celulares (plaquetas, monocitos y células endoteliales), componentes humorales que regulan la hemostasia (factores de la coagulación, anticoagulantes naturales y el sistema fibrinolítico), mecanismos inflamatorios (células inflamatorias y mediadores inflamatorios como las citoquinas) y activación del sistema del complemento (5,68,72).

3.1.4.1. Elementos celulares y humorales implicados en la patogénesis del SAF

Debido al hallazgo frecuente de trombocitopenia en pacientes con SAF, la implicación plaquetaria fue uno de los primeros aspectos estudiados en la patogénesis de la enfermedad (74). Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que los aFL incrementan la activación plaquetaria (104,105,21,96).

Entre otros mecanismos mediados por los aFL, se ha descrito que la unión de los a β 2GP1 a la proteína plasmática β 2GP1 provoca la activación de plaquetas, monocitos, células endoteliales, fibroblastos, neutrófilos y trofoblastos, así como la expresión y liberación de diferentes mediadores proinflamatorios (67,70,72,77) (Figura 3).

Cuando las células endoteliales son incubadas *in vitro* con aFL se produce un aumento significativo de la expresión de moléculas de adhesión como la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1), la molécula de adhesión vascular 1 (VACM-1) y la E-selectina. Todas ellas juegan un papel principal en la adhesión leucocitaria y en la formación del trombo (53,70). Se postula que los aFL con carácter patogénico reconocen la β 2GP1 unida a las células endoteliales y ponen en marcha distintas vías de señalización intracelular (78). Estas vías de señalización inducen un aumento significativo de la transcripción, función y expresión de factores procoagulantes como el factor tisular (FT), lo que supone un importante mecanismo para explicar los efectos protrombóticos de los aFL (70,79).

También se ha demostrado que la activación de los neutrófilos puede inducir respuestas procoagulantes y proinflamatorias en el SAF, mediadas por la expresión de FT y la liberación de trampas extracelulares de neutrófilos, fenómeno conocido como NETosis, (70,71,80).

Por otro lado, hay evidencias de que los aFL actúan sobre diferentes mecanismos humorales, como la cascada de la coagulación (5,71), provocando la formación descontrolada de fibrina y una alteración en la resolución del trombo (78,81,82). Entre otros mecanismos, la unión de los aFL a la β 2GP1 suprime la actividad del inhibidor de la vía del FT o TFPI (del acrónimo en inglés *Tissue Factor Pathway Inhibitor*) (83). También se ha demostrado la interacción directa de los aFL con la trombina y los factores IX y X activados (FIXa y FXa, respectivamente), evitando su inhibición por los anticoagulantes naturales (84).

Además, los aFL pueden unirse directamente a los anticoagulantes naturales, como la antitrombina (AT) y la proteína C activada (PCA), alterando su funcionalidad. Se ha demostrado que la unión de los aFL a la β 2GP1 reduce la actividad de la PCA (85). La resistencia de los factores de la coagulación a su inactivación, junto con el detrimento de la función de los anticoagulantes naturales y de los agentes fibrinolíticos, por acción de los aFL, ocasionará un estado protrombótico que disminuye el umbral para la precipitación de fenómenos tromboembólicos en los pacientes con aFL positivos.

3.1.4.2. Inflamación y Sistema del Complemento en la patogénesis del SAF

De entre todos los factores implicados en la patogénesis del SAF para el desarrollo de trombosis, la inflamación juega quizás el papel más importante. Los aFL pueden inducir un aumento significativo de factores proinflamatorios, como las interleuquinas IL-6 e IL-8 (72,86) y provocar la activación del complemento (5,72,79) (Figura 3).

El sistema del complemento está formado por más de una treintena de proteínas plasmáticas y de la superficie celular, y funciona como un componente de la inmunidad innata (87). La unión de los aFL a la β 2GP1 aumenta la

actividad del sistema del complemento (88,89), y conduce a la producción de potentes moléculas proinflamatorias (87,90). Además, el sistema del complemento participa en la activación mediada por aFL de células endoteliales, plaquetas, monocitos, macrófagos (fuente fundamental de factor de necrosis tumoral alfa (TNF α)) y también en la activación de neutrófilos, para inducir el estado proinflamatorio y protrombótico implicado en la génesis de la trombosis (73) y la morbilidad obstétrica (10,88). La capacidad del sistema del complemento para la propagación exponencial de la inflamación podría proporcionar el mecanismo por el cual un evento adicional (el “*second hit*”) podría desencadenar la trombosis.

Aún quedan por resolver grandes incógnitas sobre la interacción de los aFL con las diferentes dianas antigénicas, y su contribución en la gran heterogeneidad de los eventos clínicos relacionados con el SAF. El conocimiento de las moléculas y mediadores implicados en la patogénesis del SAF mejorará la predicción del riesgo trombótico en los pacientes con aFL. Y lo más importante, ayudará en la selección y diseño de estrategias terapéuticas más apropiadas.

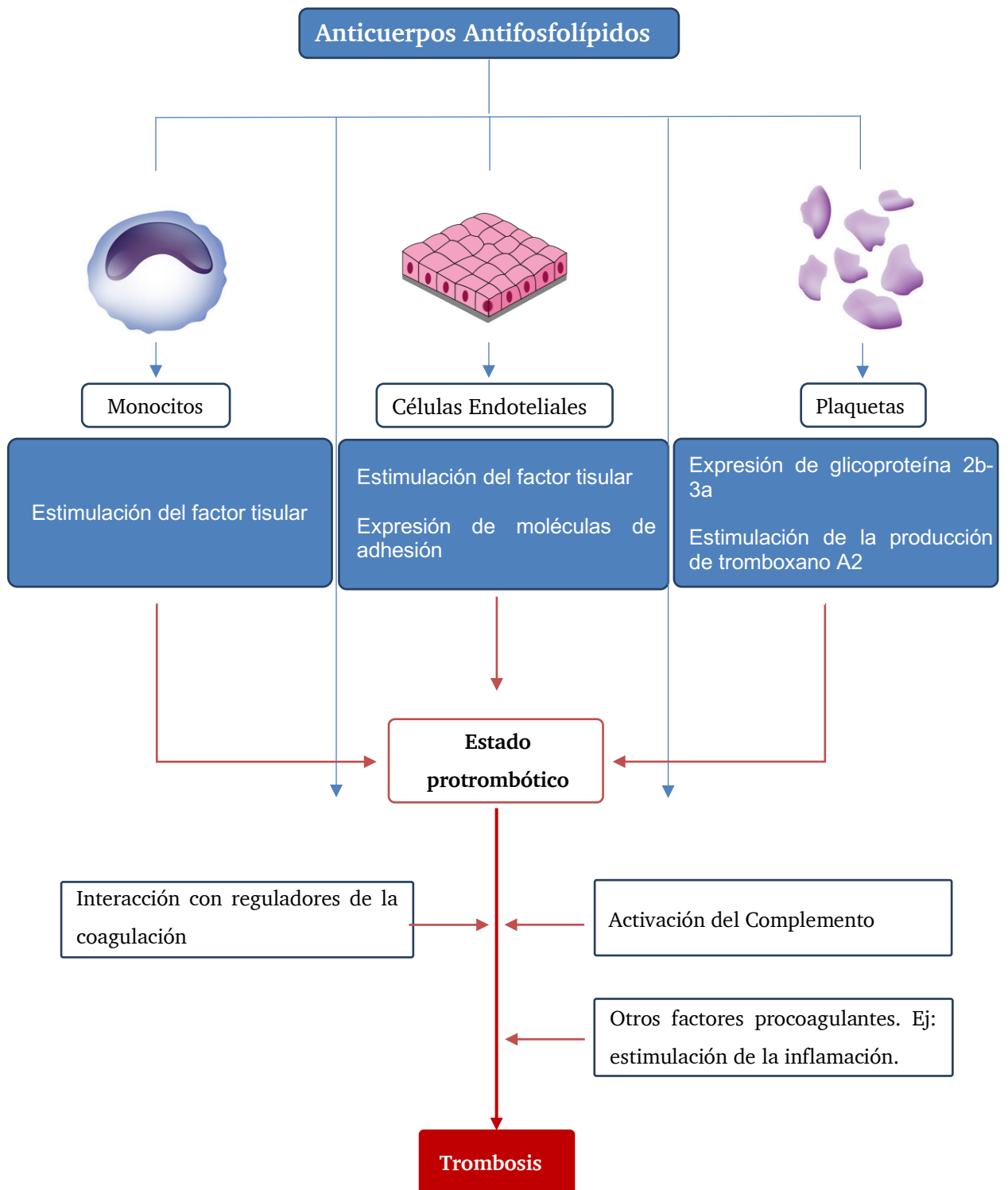


Figura 3. Acción de los aFL sobre dianas celulares y humorales implicadas en el desarrollo de eventos trombóticos en el SAF.

3.1.5. Manifestaciones clínicas del Síndrome Antifosfolípido

3.1.5.1. Síndrome Antifosfolípido y Trombosis Venosa

La TV es la manifestación clínica más frecuente del SAF, en particular la trombosis venosa profunda (TVP) que se produce en más del 30% de los pacientes (2,44,91,92). Las trombosis en territorio venoso son hasta dos veces más frecuentes que las trombosis arteriales como forma de presentación del SAF (93).

En los pacientes con TV la prevalencia de aFL varía del 5.2% al 30% para cualquier aFL, del 0.6 al 16% para el AL y del 4 al 24% para los aCL (51,56,60,94). En un trabajo reciente en pacientes jóvenes con un primer episodio de TV idiopática encontraron que el 9% tenían criterios de SAF (48).

Estudios prospectivos realizados en la población general han demostrado que la presencia de aFL es un factor predictivo de una primera TVP, de recurrencia trombótica y de mortalidad (51). AL y a β 2GP1 son factores de riesgo independiente consolidados para la aparición de TV (95–97). AL es el predictor más potente de TV (OR 3,6; IC 95%: 1,2-10,9) (98,99). También se ha descrito un elevado riesgo de enfermedad tromboembólica venosa (ETEV) asociado al isotipo IgG de los a β 2GP1 a títulos altos (OR 5,2; IC 95%: 1,5-18,0) (99,100). En el caso de los aCL la asociación con la TV es más débil, tanto para el isotipo IgG (OR 2,2; IC 95%: 0,7-6,9), como para el isotipo IgM (OR 0,5; IC 95%: 0,2-1,5) (96,100,101). La falta de asociación entre eventos trombóticos venosos y los aCL, informada en algunos estudios, puede estar relacionada con la falta de estandarización en la técnica para la determinación de los aFL, y en la discrepancia en cuanto a la aplicación de los criterios de laboratorio de SAF entre los distintos estudios.

3.1.5.2. Síndrome Antifosfolípido y Trombosis Arterial

En el lecho arterial es el sistema nervioso central (SNC) el que muestra mayor relación con la presencia de aFL, siendo la manifestación más común el

ictus isquémico y el ataque isquémico transitorio (AIT) (2,8,102), especialmente en pacientes menores de 50 años (60). También son frecuentes las úlceras vasculares en miembros inferiores, el infarto agudo de miocardio (IAM) y los episodios de *amaurosis fugax* por trombosis de la arteria central de la retina (60,79). Entre los distintos aFL, también el AL y los a β 2GP1 son los que se asocian de manera significativa con la aparición de eventos trombóticos en territorio arterial (103,104). La asociación con los aCL es mucho más débil. Al igual que en el caso de la TV, sólo el isotipo IgG de los aCL, y a títulos altos (>40 GPL, o >99th percentil), presenta una asociación significativa con los eventos trombóticos arteriales (96).

En el *Euro-Phospholipid Study* los pacientes de más edad, en su mayoría hombres, presentaron eventos arteriales con mayor frecuencia en comparación con el resto de la cohorte (30% Vs 18%, $p < 0.005$, en el caso del ictus; y 9% Vs 2% , $p < 0.001$, para la angina de pecho) (91,92). Estos resultados se han relacionado con una mayor frecuencia de factores de riesgo cardiovascular (FRCV) concomitantes en este grupo específico de pacientes (1).

3.1.5.3. Síndrome Antifosfolípido Obstétrico

Aproximadamente entre el 1 y el 5% de las mujeres de la población general son portadoras de aFL (45). Esta prevalencia aumenta hasta un 10-15% en las mujeres con antecedentes de abortos recurrentes (46,105,106). La presencia de aFL es el factor de riesgo adquirido más frecuente relacionado con morbilidad obstétrica (107). Esta asociación está respaldada por varios estudios epidemiológicos y por modelos experimentales en animales (60,108). Los eventos adversos durante el embarazo que forman parte de las manifestaciones clínicas del SAF incluyen: abortos espontáneos en fases tempranas de la gestación, con frecuencia recurrentes, muerte fetal, eclampsia y pre-eclampsia grave, insuficiencia placentaria y prematuridad con <34 semanas de gestación (1,10,109). Además de los abortos precoces recurrentes y el resto de manifestaciones incluidas en los criterios clasificatorios de SAF, se han observado otras complicaciones obstétricas relacionadas con los aFL que no

forman parte de los criterios diagnósticos actuales, como por ejemplo: el retraso en el crecimiento intrauterino, oligohidramnios y el síndrome HELLP (del acrónimo en inglés *Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelets count*), que se caracteriza por anemia hemolítica, elevación de enzimas hepáticas y trombopenia (51,91).

El AL se ha descrito como el mejor predictor de morbilidad obstétrica en comparación con el resto de aFL (96,110,111). El estudio PROMISSE demostró que el AL es el principal predictor de comorbilidad en el embarazo tras 12 semanas de gestación (110,112). En este estudio, los aCL y los a β 2GP1, en ausencia de AL positivo, no predijeron resultados adversos durante el embarazo (112). La presencia del isotipo IgG de los aCL también se ha asociado con pérdidas fetales recurrentes, siendo esta asociación más fuerte cuanto mayor es el título de anticuerpos (111). En cuanto a los a β 2GP1, su prevalencia y asociación con complicaciones obstétricas es más discutida, existiendo informaciones contradictorias al respecto (43,44,53,54,113). Los datos obtenidos del registro europeo de SAFo estima que el 22% de los casos presentan positividad aislada de a β 2GP1 de manera recurrente (11). Aunque la positividad aislada de aCL o a β 2GP1 parece estar asociada con un menor riesgo de resultados adversos durante el embarazo (114), es necesaria la determinación de todos los aFL para una correcta clasificación de las pacientes ante la sospecha de SAFo (112,115). Las mujeres con un perfil de aFL triple positivo (aCL, a β 2GP1 y AL positivos) tienen un mayor riesgo de pérdidas fetales y de morbilidad obstétrica, en comparación con las gestantes con sólo uno o dos aFL positivos (116,117).

En cuanto a la prevalencia de las manifestaciones obstétricas relacionadas con aFL, el *Euro-Phospholipid Project* mostró que las complicaciones más frecuentes fueron la pérdida fetal precoz (con <10 semanas de gestación) (35,4%), las pérdidas fetales tardías (>10 semanas de gestación) (16,9%) y la prematuridad (10,6%). En cuanto a las complicaciones maternas más comunes destacaron la pre-eclampsia (9,5%), la eclampsia (4,4%) y el desprendimiento

prematuro de placenta (2%) (7). Se ha estimado que hasta en un 5% de los casos de mujeres con SAF pueden coexistir la patología obstétrica y trombótica (106)

El manejo terapéutico del SAFo se centra en la prevención de la trombosis placentaria y en mejorar el flujo sanguíneo placentario. El uso de tratamiento antiagregante y/o heparina (heparina de bajo peso molecular (HBPM) o heparina no fraccionada (HNF)), ha incrementado el número de nacimientos en las gestantes con aFL (10,16,118).

3.1.5.4. Síndrome Antifosfolípido Catastrófico

Dentro del amplio espectro clínico del SAF existe una variante muy poco frecuente (1%) (19) que se caracteriza por eventos trombóticos vasculares múltiples, simultáneos o que se producen consecutivamente en un corto período de tiempo (menos de una semana), denominado SAF catastrófico (SAFc) (19). Afecta sobre todo al territorio vascular de pequeño vaso (18), y puede provocar un fallo multiorgánico, lo que explica su elevada mortalidad (2,8,17–19).

Los pacientes con SAFc tienen en común los siguientes aspectos: a) datos clínicos de afectación multiorgánica (normalmente, tres o más órganos afectados) en un corto período de tiempo; b) demostración histopatológica de trombosis múltiples, sobre todo de pequeño vaso; y c) confirmación de la presencia de aFL, generalmente con títulos altos (119).

En general, las manifestaciones clínicas del SAFc van a depender de dos factores: 1. La extensión de la afectación trombótica y los órganos que hayan sido afectados por los eventos trombóticos; y 2. Las manifestaciones clínicas asociadas al síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) característico del cuadro. De hecho, la presentación aguda de SAFc puede asemejarse al cuadro clínico de una sepsis grave. El ambiente proinflamatorio junto con niveles elevados de citoquinas (como el TNF α , interferón- γ e IL-1) pueden ser la causa del fallo multiorgánico (18,120).

En el décimo Congreso Internacional sobre aFL se propusieron los primeros criterios clasificatorios preliminares del SAFc (Tabla 1) (119,121)

(Tabla 1) Criterios de clasificación para el SAFc (119)

CRITERIOS
<ol style="list-style-type: none">1. Afectación ≥ 3 órganos, sistemas y/o tejidos^a2. Aparición de las manifestaciones simultáneamente o en < 1 semana3. Confirmación histológica de la trombosis de pequeño vaso en ≥ 1 órgano o tejido^b4. Confirmación de la presencia de aFL (AL, aCL y/o a$\beta 2$GpI)^c
SAFC DEFINITIVO
<ul style="list-style-type: none">• Los 4 criterios presentes
SAFC PROBABLE
<ul style="list-style-type: none">• Los 4 criterios, con afectación de ≤ 2 órganos, sistemas y/o tejidos• Los 4 criterios, sin confirmación de aFL a las 6 semanas, por el fallecimiento del paciente no estudiado previamente• Criterios 1, 2 y 4• Criterios 1, 3 y 4 y con un tercer evento en > 1 semana, pero < 1 mes a pesar del tratamiento anticoagulante

^a Habitualmente evidencia clínica de la oclusión vascular, en ocasiones confirmada radiológicamente. Afectación renal: incremento del 50% de la creatinina sérica, hipertensión arterial grave ($> 180/100$ mmHg) y/o proteinuria (> 500 mg/24 h).

^b Confirmación histológica: presencia de trombosis, aunque puede coexistir junto con vasculitis.

^c Si el paciente no había sido diagnosticado previamente de SAF, debe confirmarse la presencia de aFL de acuerdo con lo establecido por los criterios de clasificación del SAF.

Uno de los aspectos más característicos del SAFc es la presencia de factores precipitantes. En aproximadamente un 60% de los casos se identifica un probable factor desencadenante del cuadro (18). La causa más prevalente son las infecciones (presentes en el 49% de los casos), seguidas de procedimientos

quirúrgicos (17%), tumores malignos (16%), retirada del tratamiento anticoagulante o control subóptimo del *international normalized ratio* (INR) (8%), morbilidad obstétrica (8%), fármacos (5%) y LES activo (3%) (17,18,42). Se ha descrito el desarrollo de SAFc en pacientes diagnosticados de SAF seronegativo (SAFSN) (120,122,123). El término de SAFSN se emplea para definir a un grupo de pacientes con manifestaciones clínicas de SAF pero con determinaciones persistentemente negativas para el AL, los aCL y los a β 2GP1 (123).

A pesar del tratamiento, hoy en día la mortalidad del SAFc sigue siendo muy elevada (alrededor del 30%) (124,125). Debido a esta alta tasa de mortalidad, el diagnóstico precoz y un tratamiento agresivo son esenciales en su manejo.

3.1.5.5. Manifestaciones clínicas “no criterio” de Síndrome Antifosfolípido

Los eventos tromboembólicos y la morbilidad durante el embarazo componen los criterios clínicos clasificatorios del SAF. Sin embargo, el espectro de manifestaciones del SAF se ha expandido en las últimas décadas, y hay evidencia de otras entidades clínicas y analíticas, frecuentes en el contexto de aFL, pero distintas a las enumeradas en los criterios de clasificación: valvulopatía cardíaca (vegetaciones, engrosamiento y disfunción valvular), LR, nefropatía asociada a aFL, manifestaciones neurológicas, sobre todo a nivel del SNC, (disfunción cognitiva, migraña, esclerosis múltiple, mielopatía transversa y epilepsia), anemia hemolítica y trombocitopenia. Son las denominadas manifestaciones “no criterio” de SAF (1,42,126,127). Cuando una o más de estas manifestaciones “no criterio” se asocian con algún evento trombótico y/o complicación obstétrica pueden ayudar en el diagnóstico probable de SAF (44).

La trombocitopenia, definida como un recuento de plaquetas inferior a 100.000 U/L, se observa en aproximadamente un 20 a un 40% de los pacientes con SAF. En estos casos, la trombocitopenia suele ser leve (60,91), y rara vez presentan complicaciones hemorrágicas (60,91). La aparición de

trombocitopenia es más frecuente en pacientes con SAF asociado a LES que en pacientes con SAFp (43% Vs 21%) (91,127).

La LR aparece entre el 11 y el 22% de los pacientes con SAF (51,60). Los casos de LR también son más frecuentes en el SAF asociado al LES que en el SAFp (36% Vs 16%, respectivamente) (91). Además de la LR se han descrito otras manifestaciones cutáneas relacionadas con el SAF: úlceras, flebitis superficial, lesiones pseudovasculíticas y gangrena digital, entre otras (127).

En el caso de la nefropatía, la valvulopatía y el deterioro neurológico asociado a los aFL, el mecanismo por el cual se produce el daño no es del todo conocido y a día de hoy no existe suficiente evidencia para incluir estas entidades clínicas relacionadas con la positividad de los aFL como criterios de clasificación del SAF (127). La prevalencia de algunas manifestaciones clínicas asociadas al SAF, como la mielopatía transversa, el síndrome de Addison y la afectación pancreática o hepática, es muy baja (<1%)(128)

3.1.5.6. Recurrencia trombótica en el Síndrome Antifosfolípido

Aproximadamente, un 10% de los pacientes con SAF y hasta un 30% en los casos con un perfil de aFL triple positivo presentan recurrencia trombóticas, arteriales y/o venosas, durante el seguimiento, a pesar del tratamiento anticoagulante adecuado con fármacos anti-vitamina K (AVK) (con un INR objetivo de 2.5) (2), lo que conlleva una elevada morbilidad y mortalidad (92,129).

En cuanto a la localización de las recurrencias trombóticas en pacientes con SAF la tendencia es que aparezcan en el mismo lecho vascular que el primer evento trombótico (130,131). Las recurrencias trombóticas son más frecuentes en el territorio arterial (92,132), y la trombosis arterial previa es un fuerte factor predictor de un nuevo evento arterial (132).

3.1.6. Criterios clasificatorios del Síndrome Antifosfolípido

Los criterios diagnósticos-clasificatorios del SAF han variado a lo largo del tiempo. Los primeros criterios, formulados después del Octavo Simposio Internacional sobre aFL en Sapporo, Japón (1989) (41) determinaron las condiciones que habría de reunir un paciente para ser incluido en estudios de investigación (Tabla 2). En este consenso fueron excluidas algunas manifestaciones clínicas relacionadas con la presencia de aFL como la trombocitopenia, la *LR* y la presencia de úlceras en miembros inferiores, entre otras manifestaciones menores.

(Tabla 2). Criterios de Sapporo 1999.

El diagnóstico de SAF requiere la presencia de al menos un criterio clínico y un criterio de laboratorio (41).

CRITERIOS CLÍNICOS

Trombosis vascular

- a. Uno o más episodios de trombosis venosa, arterial o de pequeño vaso en cualquier tejido y órgano. La trombosis superficial no se incluye en los criterios clínicos.
 - b. Trombosis confirmada por doppler o histopatología exceptuando trombosis venosa superficial.
 - c. Confirmación histopatológica de trombosis sin evidencia de inflamación en la pared vascular.
-

Morbilidad obstétrica

- a. Una o más muertes inexplicables de fetos morfológicamente normales de 10 o más semanas de gestación documentadas por ultrasonido o examen directo del feto.
 - b. Uno o más partos prematuros de un neonato morfológicamente normal de ≤ 34 semanas de gestación debido a pre-eclampsia grave o insuficiencia placentaria grave.
-

-
- c. Tres o más abortos espontáneos recurrentes inexplicables antes de la décima semana de gestación, excluyendo anomalías anatómicas u hormonales en los padres, o causas de origen cromosómico paternas y/o maternas.

CRITERIOS DE LABORATORIO

- a. AL presente en plasma en al menos 2 determinaciones con un intervalo de tiempo de mínimo 6 semanas según las pautas de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (Subcomité Científico sobre AL/anticuerpos dependientes de fosfolípidos)(133,134).
- b. aCL, isotipo IgG y/o IgM, presente en suero o plasma, a títulos moderados o altos (>40 GPL o MPL, o > percentil 99) en al menos 2 determinaciones, con un intervalo de tiempo de mínimo 6 semanas. Determinados por ELISA dependientes de β 2GP1.

AL: anticoagulante lúpico; aCL: anticuerpos anti-cardiolipinas; GPL: unidades de IgG; MPL: unidades de IgM.

Unos años más tarde, durante el Undécimo Congreso Internacional sobre aFL, en Sídney, Australia (2006), se llevó a cabo una actualización de los criterios clasificatorios del SAF (1) (Tabla 3). Una de las principales modificaciones fue la inclusión de los $\alpha\beta$ 2GP1, con sus isotipos IgM e IgG, como criterio analítico. Además, se amplió el intervalo de tiempo entre las determinaciones de los aFL de 6 a 12 semanas y se describieron de manera más específica las comorbilidades obstétricas asociadas a los aFL, definiendo los conceptos de pre-eclampsia, eclampsia e insuficiencia placentaria.

En esta revisión aparece el término de manifestaciones clínicas “no criterio” para definir al conjunto de manifestaciones clínicas y analíticas relacionadas con la presencia de aFL pero que no forman parte de los criterios clasificatorios, por considerar que su inclusión como criterios independientes podría disminuir la especificidad diagnóstica de los mismos. En este grupo se incluyen la trombocitopenia, manifestaciones no trombóticas del SNC (como la

disfunción cognitiva), *LR*, nefropatía y valvulopatía cardíaca asociada a aFL, entre otras.

Por último, se estratificó a los pacientes en grupos de riesgo de trombosis según la presencia o no de otros factores de riesgo trombotico asociados. Entre estos factores de riesgo se incluyeron la edad (>55 años en hombres y >65 años en mujeres), la presencia de algún FRCV clásico (hipertensión arterial (HTA), diabetes mellitus (DM), dislipemia (DLP), tabaquismo, historia familiar de enfermedad cardiovascular (ECV) precoz, obesidad, microalbuminuria, filtrado glomerular (FG) <60 ml/min/1,72 m²), el antecedente de alguna trombofilia congénita, el uso de fármacos protrombóticos como los anticonceptivos orales (ACHOs), el síndrome nefrótico, el diagnóstico de enfermedad neoplásica maligna y el antecedente de inmovilización prolongada y/o de cirugía reciente.

(Tabla 3). Criterios de clasificación para el SAF

El diagnóstico de SAF requiere la presencia de al menos un criterio clínico y un criterio de laboratorio (1)

CRITERIOS CLÍNICOS

Trombosis vascular

-
- a. Uno o más episodios de trombosis venosa, arterial o de pequeño vaso en cualquier tejido y órgano. La trombosis superficial no se incluye en los criterios clínicos.
 - b. Trombosis confirmada mediante pruebas de imagen o histopatología, exceptuando trombosis venosa superficial.
 - c. Confirmación histopatológica de trombosis sin evidencia de inflamación significativa en la pared vascular
-

Morbilidad obstétrica

- a. Una o más muertes inexplicables de fetos morfológicamente normales de 10 o más semanas de gestación documentadas por ultrasonido o examen directo del feto.
- b. Uno o más partos prematuros de un neonato morfológicamente normal de ≤ 34 semanas de gestación debido a pre-eclampsia grave o insuficiencia placentaria grave.
- c. Tres o más abortos espontáneos recurrentes inexplicables antes de la décima semana de gestación, excluyendo anomalías anatómicas u hormonales en los padres, o causas de origen cromosómico paternas y/o maternas.

CRITERIOS DE LABORATORIO

- a. AL presente en plasma en al menos 2 determinaciones con un intervalo de tiempo de mínimo de 12 semanas según las pautas de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (Subcomité Científico sobre AL / anticuerpos dependientes de fosfolípidos)(133,134).
- b. aCL, isotipo IgG y/o IgM, presente en suero o plasma, a títulos moderados-altos (>40 GPL o MPL, o $>$ percentil 99) en al menos 2 determinaciones, con un intervalo de tiempo mínimo de 12 semanas, determinados por ELISA estandarizado.
- c. a β 2GP1, isotipo IgG y/o IgM presente en suero o plasma (título $>$ percentil 99), en dos o más determinaciones, con al menos 12 semanas de diferencia, medido mediante ELISA estandarizado, de acuerdo con los procedimientos recomendados (135).

Categoría I: pacientes con más de un criterio de laboratorio (cualquier combinación); **categoría IIa:** AL positivo aislado; **categoría IIb:** aCL positivo aislado; **categoría IIc:** a β 2GP1 positivo aislado.

AL: anticoagulante lúpico; aCL: anticuerpos anti-cardiolipinas; GPL: unidades de IgG; MPL: unidades de IgM; β 2GP1: beta 2 glicoproteína 1; a β 2GP1: anticuerpos anti- β 2GP1

Los criterios de clasificación de 2006 proporcionaron una base homogénea para seleccionar a pacientes en estudios de investigación y representan la mejor herramienta disponible para delimitar el diagnóstico de SAF en la práctica clínica diaria, aunque no fueran diseñados con fines clínicos.

A pesar de que estos criterios se han propuesto como una herramienta diagnóstica útil en el SAF, la definición de aFL positivos y clínicamente relevantes no está bien establecida (71), quizás porque la trombosis es un proceso multifactorial (136). Por ello, existen pacientes con aFL persistentemente positivos, incluso con anticuerpos a títulos altos, que se clasifican con un perfil de alto riesgo trombótico, pero que nunca presentan eventos clínicos. Y, por el contrario, existen pacientes con aFL positivos a títulos moderados o bajos, y/o intermitentemente positivos, categorizados con un perfil de riesgo trombótico bajo, que han presentado uno o más eventos trombóticos y/u obstétricos. Por lo tanto, con el conocimiento actual, no somos capaces de determinar el riesgo trombótico en los pacientes con aFL positivos.

Tampoco disponemos de modelos de predicción lo suficientemente precisos para evitar la aparición de un primer evento trombótico en portadores asintomáticos de aFL, o para predecir la recurrencia trombótica en los pacientes con SAF. Es posible que existan otros biomarcadores que influyan en la aparición de estos eventos clínicos; o moléculas, incluso conocidas, que tengan una función, no descubierta aún, en la patogénesis de esta enfermedad.

3.1.7. Perfil de Anticuerpos Antifosfolípido y otros factores de riesgo trombótico

El riesgo de evento clínico (trombótico y/u obstétrico) en los pacientes con aFL va a depender de diferentes factores. Los más estudiados por la comunidad científica incluyen el perfil de aFL, los FRCV clásicos, fármacos como los anticonceptivos a base de estrógenos y el antecedente de enfermedad autoinmune.

Los pacientes con aFL tienen con frecuencia uno o más FRCV, como HTA, hipercolesterolemia, DM o tabaquismo, y la coexistencia de FRCV y aFL puede asociarse con un mayor riesgo de trombosis. La HTA ha demostrado ser un factor de riesgo independiente de trombosis en pacientes portadores de aFL (RR 3,8; IC 95% 1,3-11,1) (97,137).

El antecedente de una enfermedad autoinmune subyacente también va a influir en el riesgo trombótico de los pacientes con aFL (138,139). Se estima que en los pacientes con diagnóstico de LES y AL positivo, el riesgo de presentar un evento trombótico a los 20 años es, aproximadamente, del 50% (51,140).

El concepto de perfil de aFL aparece inicialmente en los criterios de clasificación del SAF establecidos en Sídney en 2006, categorizando a los pacientes según su positividad para uno o más aFL (1). La evidencia ha demostrado que los pacientes con más de un aFL positivo tienen un mayor riesgo de desarrollar clínica trombótica y/u obstétrica (141). Esta asociación entre el número de anticuerpos positivos y el riesgo de presentar un evento clínico parece estar relacionada con la activación, mediada por aFL, de diferentes vías inflamatorias y protrombóticas al mismo tiempo, produciendo un aumento desproporcionado del riesgo (71).

Un perfil de aFL se considera de alto riesgo trombótico cuando cumple alguna de las siguientes opciones: AL positivo; doble positividad por la combinación de cualquiera de los aFL; triple positividad (los tres subtipos de aFL positivos); o sólo un aFL positivo pero a títulos persistentemente altos (5,138,139). Por otro lado, se considera un perfil de aFL de bajo riesgo trombótico cuando sólo presenta positividad para aCL o a β 2GP1, y a títulos moderados o bajos, sobre todo si la positividad es intermitente (5,138,139). Al elaborar este perfil hay tener en cuenta la variabilidad que puede existir entre los distintos ensayos comerciales, y también entre los diferentes laboratorios.

En cuanto al título de los anticuerpos, la positividad persistente de AL es un factor de alto riesgo de trombosis (96,142). En relación con los otros aFL, se consideran patogénicos cuando se mantienen positivos a un título moderado-alto

(1). Para los aCL se considera un título alto cuando los niveles de anticuerpos (isotipo IgG y/o IgM), en suero o plasma, son >40 unidades de fosfolípido IgG/IgM (GPL/MPL) o un título superior al percentil 99, calculado a partir de una muestra de población sana. Y en el caso de los a β 2GP1 se considera un título moderado o alto (isotipo IgG y/o IgM) cuando presenta cifras mayores al percentil 99. En ambos casos la determinación se lleva a cabo mediante técnica de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) estandarizado (1,138) (Ver apartado 2: Anticuerpos Antifosfolípidos)

En los últimos años, se han propuesto diferentes sistemas de puntuación para cuantificar y predecir el riesgo de eventos clínicos en pacientes con aFL (143,144), y así mejorar el manejo clínico y terapéutico de esta entidad.

La escala diseñada por Otomo y colaboradores (143), el *aPL-Score*, incluye la determinación de múltiples aFL, y se creó con el objetivo de calcular el riesgo trombótico en pacientes con SAF. Sin embargo, su utilidad es limitada porque, no tiene en cuenta otros factores de riesgo convencionales asociados a trombosis a parte del perfil de aFL, ni evalúa el riesgo de morbilidad obstétrica.

Un año después de la publicación del *aPL-Score* se publicó *the Global Anti-Phospholipid Syndrome Score* (GAPSS) (144). Sciascia y su equipo de investigación diseñaron una escala derivada de la combinación de factores de riesgo independiente de trombosis y morbilidad obstétrica, teniendo en cuenta el perfil de aFL (anticuerpos incluidos en los criterios de SAF y anticuerpos “no criterio” de SAF), FRCV clásicos y el perfil de anticuerpos autoinmunes. Esta escala ha sido validado en estudios posteriores y ha demostrado ser una herramienta válida en la estratificación del riesgo de trombosis en pacientes con SAF, tanto en SAFp como SAFs (88,145–148). El aGAPSS es una versión ajustada y validada del GAPSS (148,149), en la que se excluyó la determinación de aPS/PT al tratarse de una determinación poco frecuente en la práctica clínica diaria (146,148).

Además de los modelos predictivos, en la última década se han identificado nuevos biomarcadores implicados en las rutas de acción de los aFL; como citoquinas, vesículas extracelulares y micro-ARN (150).

3.1.8. Últimas recomendaciones en el manejo terapéutico del Síndrome Antifosfolípido

El tratamiento del SAF se fundamenta en la anticoagulación oral (1). En la mayoría de los casos, según las guías de práctica clínica y por consenso internacional, el tratamiento se debe mantener de manera indefinida (1,139).

3.1.8.1. Trombopprofilaxis en portadores asintomáticos de aFL

En los pacientes con determinaciones positivas de aFL en ausencia de eventos trombóticos y/o morbilidad obstétrica, es decir, portadores asintomáticos de aFL (AAF) (pacientes que cumplen criterios de laboratorio, pero no clínicos para SAF) el manejo terapéutico debe iniciarse por la estratificación del riesgo trombótico de manera individualizada. Entre los diferentes factores asociados a un mayor riesgo trombótico hay que tener en cuenta la edad (>55 años en los hombres y >65 años en las mujeres), FRCV clásicos (tabaquismo, HTA, DM, hipercolesterolemia y obesidad), trombofilias congénitas, fármacos (como los ACHOs), antecedente de enfermedades neoplásicas y/o autoinmunes y el perfil de aFL (1,151).

En los portadores asintomáticos de aFL que presentan un perfil de anticuerpos de alto riesgo, con o sin otros factores de riesgo trombótico asociados, se recomienda el tratamiento profiláctico con aspirina a dosis bajas (ADB) (75-100 mg diarios) (1,138,139). El riesgo anual de una primera trombosis en pacientes con un perfil de aFL de moderado a alto riesgo trombótico, en combinación con otros factores de riesgo trombótico, puede llegar a ser del 5% (69).

Se recomienda que en situaciones de alto riesgo trombótico (como período postquirúrgico, inmovilización prolongada y el puerperio) los portadores de aFL

reciban heparina a dosis profiláctica (139). En el caso de los portadores asintomáticos de aFL no existe evidencia suficiente que justifique el uso de otros fármacos, como la hidroxiclороquina (HCQ), para la prevención primaria de trombosis.

3.1.8.2. Manejo terapéutico del Síndrome Antifosfolípido Trombótico

3.1.8.2.1. Síndrome Antifosfolípido y Trombosis Venosa

En los pacientes con SAF definido por un primer evento trombótico venoso, el tratamiento establecido, con la evidencia científica disponible, es la anticoagulación oral con fármacos AVK, como el aldocumar y el acenocumarol, con un *INR* objetivo entre 2-3 (1,139). No se ha observado un mayor beneficio con un tratamiento anticoagulante más intenso, es decir, con un *INR* objetivo de 3-4 (138,152–154).

En los pacientes con SAF con trombosis venosa sin un claro desencadenante conocido, o idiopática, y unos aFL persistentemente positivos, el riesgo de recurrencia trombótica tras la retirada de la anticoagulación es muy alto, por lo que la recomendación actual es mantener el tratamiento anticoagulante de manera indefinida (1,5,98,138,155).

Sin embargo, existe un grupo de pacientes en los que el beneficio de la anticoagulación prolongada es un tema de controversia. Son aquellos pacientes con un factor desencadenante conocido de la trombosis (por ejemplo, la toma de ACHOs o un antecedente quirúrgico reciente), y los pacientes en los que los aFL son persistentemente negativos en determinaciones posteriores. Como el beneficio del tratamiento anticoagulante a largo plazo en estos dos grupos de pacientes no está claro, en las últimas guías se recomienda que en pacientes con SAF con un primer evento trombótico venoso y con un desencadenante conocido de la trombosis, la duración del tratamiento anticoagulante sea similar a los pacientes sin SAF (156). Y se considerará una anticoagulación prolongada en aquellos pacientes con un perfil de aFL de alto riesgo u otros factores de riesgo de trombosis concomitantes (1,138). No obstante, debemos tener en cuenta que

se tratan de recomendaciones basadas en la opinión de expertos debido a la falta de estudios clínicos precisos.

Por otro lado, en los pacientes con SAF y trombosis venosa recurrente a pesar del tratamiento con AVK, con un INR objetivo mantenido de 2-3 y una adecuada adherencia al tratamiento, se puede considerar la combinación con ADB y aumentar a 3-4 el INR objetivo; o cambiar el tratamiento anticoagulante de AVK a heparina (138).

Hoy en día no existen recomendaciones para el uso de anticoagulantes orales de acción directa (ACOD) en el tratamiento del SAF. El uso de ACOD podría considerarse en pacientes con SAF y una primera trombosis venosa que no puedan alcanzar un INR objetivo a pesar de una buena adherencia al tratamiento, o en aquellos casos que tuvieran alguna contraindicación para el uso de AVK (138,157). Es importante indicar que el rivaroxabán no debe usarse en pacientes con triple positividad de aFL debido al alto riesgo de recurrencia trombótica (158).

3.1.8.2.2. Síndrome Antifosfolípido y Trombosis Arterial

Al igual que en el caso de la trombosis venosa el tratamiento de elección es la anticoagulación oral con AVK. Se recomienda un INR objetivo entre 2-3, estudiando de manera individualizada el riesgo de sangrado y de recurrencia trombótica en cada caso (139,153,154). Los pacientes con SAF y trombosis arterial tienen un mayor riesgo de recurrencia trombótica, en comparación con los SAF con trombosis venosa; además, la recurrencia trombótica tiende a producirse en el mismo lecho vascular que el primer evento (131,138).

El tratamiento combinado con AVK y ADB ha demostrado disminuir la tasa de recurrencia trombótica y aumentar el tiempo sin nuevo evento trombótico en pacientes con SAF y trombosis arterial, en comparación con la monoterapia con antiagregación o AVK (159). La terapia antitrombótica dual, debido a que aumenta el riesgo de hemorragia, se reserva para los pacientes con FRCV clínicamente significativos, y para los casos en los que un solo agente

antitrombótico no ha podido prevenir la recurrencia. En aquellos pacientes con recurrencia trombótica arterial a pesar de un tratamiento adecuado con AVK, se puede considerar un aumento del INR objetivo a 3-4, el tratamiento dual con doble terapia antitrombótica o el cambio de AVK a heparina (1,138,139).

La definición del papel actual de los ACOD en el tratamiento del SAF se basa en datos clínicos limitados, información de los fabricantes, series de casos o estudios de cohortes, y el consenso de expertos. En base a la evidencia científica actual el uso de ACOD en pacientes con SAF y trombosis arterial no está recomendado debido al alto riesgo de recurrencia trombótica (158,160).

3.1.8.2.3. Terapias alternativas en el Síndrome Antifosfolípido de difícil control

En los casos de pacientes con SAF de difícil control anticoagulante, como son los casos con recurrencias trombóticas a pesar de un tratamiento anticoagulante adecuado, y los casos con niveles fluctuantes de INR, antecedentes de hemorragia grave y/o alto riesgo de hemorragia, podemos plantear el uso de terapias alternativas entre las que destacan: el uso de HBPM a largo plazo; y el tratamiento adyuvante con HCQ y/o estatinas (5,138,139).

Las estatinas inhiben la producción de mediadores implicados en la activación plaquetaria y la sobreexpresión del FT inducida por aFL (79,161). Se ha demostrado que la fluvastatina inhibe la producción de FT mediada por aFL y disminuye los niveles de otros mediadores inflamatorios y trombogénicos (161). Por lo tanto, más allá de la actividad hipolipemiente, las estatinas podrían tener un papel adyuvante en la prevención de la trombosis en pacientes con aFL, sin un riesgo adicional de sangrado (5,139,162).

En cuanto a la HCQ, se ha demostrado que reduce la activación plaquetaria mediada por aFL, e inhibe la formación de complejos formados por la unión de aFL, β 2GP1 y fosfolípidos de la membrana celular (139,163). La HCQ es un fármaco con un excelente perfil de seguridad y no se asocia con

mayor riesgo de sangrado, por lo que puede emplearse como agente adyuvante en pacientes con SAF de difícil manejo (5,66,138,139).

3.1.8.3. Manejo terapéutico del Síndrome Antifosfolípido Obstétrico

La estrategia actual para la prevención de complicaciones durante el embarazo en pacientes con SAFo es el uso de ADB y de heparina, HNF o HBPM. La heparina se empleará a dosis terapéutica si la paciente tiene antecedentes de comorbilidad obstétrica recurrente y/o SAft; y a dosis profilácticas en caso de que no haya tenido eventos clínicos previos relacionados con el SAF (10,106).

En mujeres con un perfil de aFL de alto riesgo, pero sin antecedentes previos de trombosis y/o complicaciones obstétricas, se recomienda el tratamiento con ADB durante el embarazo (138,164). Se ha descrito que el uso de aspirina previo a la gestación aumenta la probabilidad de embarazo y de una adecuada implantación del embrión, y favorece un alto porcentaje de nacimientos vivos (>70% de los embarazos) (10,165,166).

En mujeres no gestantes con antecedentes de SAF puramente obstétrico, sin eventos tromboticos, se recomienda el tratamiento profiláctico con ADB en función de la valoración individual del riesgo/beneficio (riesgo de trombosis Vs riesgo de hemorragia) (1,138,139). En este mismo grupo, mujeres con antecedentes de SAFo, se recomienda el tratamiento combinado con ADB y heparina a dosis profilácticas durante la gestación (5,10,106). La aspirina se debe comenzar preferiblemente antes de la concepción, y se debe asociar la heparina (HBPM o HNF) tan pronto como se confirme el embarazo (66,138).

En mujeres con antecedente de SAFo y complicaciones recurrentes en embarazos previos a pesar del tratamiento combinado con antiagregantes y heparina en dosis profilácticas, se recomienda aumentar la dosis de heparina a dosis anticoagulante. Además, otras estrategias de tratamiento pueden incluir la asociación de HCQ o dosis bajas de prednisolona durante el primer trimestre de embarazo (138,167–169). En los casos más graves, resistentes al tratamiento

convencional, podría considerarse el empleo de gammaglobulina intravenosa y/o recambios plasmáticos (10,66,170)

En mujeres con antecedentes de SAF trombótico, se recomienda el tratamiento combinado con ADB y heparina a dosis terapéuticas durante el embarazo, debido a que los antecedentes de SAF trombótico se asocian con un mayor riesgo de recurrencia trombótica y/o comorbilidad obstétrica (109,171). Se recomienda cambiar el tratamiento con AVK a heparina tan pronto como se confirme el embarazo para evitar los efectos teratogénicos de la anticoagulación con AVK (172).

En cuanto a los ACOD, su potencial teratogénico no está bien definido, por lo que actualmente se recomiendan evitar su uso durante el embarazo y la lactancia (173–177).

Las primeras semanas del puerperio se consideran un período de alto riesgo trombótico. En los casos de mujeres sin otros factores de riesgo de trombosis aparte de los aFL y que no recibieron tromboprofilaxis prenatal, pueden beneficiarse del uso de heparina a dosis profiláctica durante sólo los primeros 7-10 días del puerperio. En aquellos casos en los que sí existan otros factores de riesgo trombótico adicionales y/o fueron tratadas con heparina durante el embarazo, el tratamiento con heparina a dosis profiláctica debe continuarse durante 6 a 12 semanas para proteger a la madre de la aparición de posibles eventos tromboembólicos (10,66,106,118,138). No se recomienda la terapia antitrombótica a largo plazo de manera sistemática para mujeres que tienen antecedentes de SAFo y no tienen otros factores de riesgo de trombosis (5).

3.1.8.4. Manejo terapéutico del Síndrome Antifosfolípido Catastrófico

El tratamiento del SAFc se construye sobre tres pilares: 1. El tratamiento del factor desencadenante; 2. El tratamiento específico del cuadro trombótico que incluye anticoagulación; y 3. El tratamiento de soporte del paciente (19). En

base a la evidencia científica de la que disponemos, la primera línea de tratamiento en pacientes con SAFc sería la combinación de anticoagulación con heparina y altas dosis de glucocorticoides (19).

En los casos en los que la vida del paciente esté comprometida debe considerarse la administración de inmunoglobulinas intravenosas y/o la realización de recambios plasmáticos (125,178). En los últimos años se ha incluido dentro de las opciones terapéuticas del SAFc el uso del rituximab, un anticuerpo monoclonal anti-CD20, como terapia complementaria en los casos recurrentes y/o refractarios al tratamiento convencional (179,180). En algunos casos de SAFc se ha empleado con éxito el eculizumab, un anticuerpo monoclonal inhibidor del sistema del complemento mediante su unión al factor C5(19,181).

Es importante destacar, que para un adecuado manejo de los pacientes con aFL se necesitan mejores modelos de predicción de riesgo para eventos clínicos, trombóticos y/u obstétricos. Con los modelos de predicción actuales (143,144), aunque son de gran ayuda, no somos capaces de evitar gran parte de la morbi-mortalidad relacionada con los aFL. La identificación de marcadores que permitan identificar y clasificar de manera más precisa a cada paciente según su perfil de riesgo trombótico nos permitiría individualizar las estrategias de tratamiento antitrombótico, tanto en prevención primaria como secundaria.

3.2. ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS

3.2.1. Características generales

El conjunto de aFL está constituido por un grupo heterogéneo de autoanticuerpos que reconocen fosfolípidos aniónicos de la membrana celular, proteínas plasmáticas que se unen a fosfolípidos y/o complejos formados por proteínas unidas a fosfolípidos (71,182). La detección de los aFL no solo es diagnóstica de SAF sino que también tienen un papel patogénico, responsable de las diversas manifestaciones clínicas del síndrome (Figuras 2 y 3) (70,71).

Entre el 1 y el 5% de individuos sanos, sin antecedentes de eventos trombóticos ni obstétricos, presentan determinaciones positivas de aFL (51,60). Las personas con más de un aFL positivo tienden a tener niveles de anticuerpos más estables en determinaciones repetidas (72,183). Además de los anticuerpos descritos en los criterios diagnósticos de SAF existen otros anticuerpos relacionados con la enfermedad que actualmente no están incluidos en estos criterios. Por ejemplo, el isotipo IgA de los aCL y los a β 2GP1, junto con otros tipos de anticuerpos, aunque son frecuentes en pacientes con SAF, quedan excluidos de los criterios diagnósticos, formando el conjunto de los denominados anticuerpos “no criterio” de SAF (ver apartado 3.2.2 Anticuerpos Antifosfolípidos “no criterio” de Síndrome Antifosfolípido).

La determinación de aFL debe limitarse a los pacientes que tienen una elevada probabilidad de tener SAF (184). Las recomendaciones actuales aconsejan realizar la búsqueda de aFL en: pacientes jóvenes (menores de 50 años) con tromboembolismo venoso y/o arterial idiopático; eventos trombóticos en sitios inusuales; pérdidas fetales tardías; abortos espontáneos de repetición; y en caso de cualquier complicación trombótica u obstétrica asociada a una enfermedad autoinmune. En pacientes con ETEV con desencadenante conocido, debe considerarse su determinación en aquellos casos en los que la gravedad de la trombosis sea desproporcionada al supuesto agente desencadenante. También

en pacientes asintomáticos con un tiempo parcial de tromboplastina activado (TTPa) prolongado se recomienda la determinación de AL (1,184,185).

En 2009 y 2014 el *Scientific Standardization Subcommittee* (SSC) de aFL publicó las recomendaciones para la determinación de AL, aCL y a β 2GP1 (184,186).

3.2.1.1. Anticoagulante Lúpico

La determinación del AL es un test coagulométrico que mide la actividad de autoanticuerpos dirigidos contra diferentes cofactores proteicos unidos a fosfolípidos y que inhiben reacciones de la cascada de la coagulación dependientes de fosfolípidos, produciendo la prolongación del TTPa (184).

Para la detección del AL se recomiendan la combinación de al menos dos pruebas de coagulación dependientes de fosfolípidos, ya que ninguna prueba tiene suficiente sensibilidad ni especificidad de manera aislada (184,187). Los dos métodos recomendados son: la prueba del Veneno de la Víbora de Russell diluido (VVRd) y una prueba de TTPa sensible al AL empleando sílice como activador y una baja concentración de fosfolípidos, denominado *Silica Clotting Time* (SCT) (184).

Otras pruebas globales de hemostasia como los tiempos de caolina, el tiempo de protrombina diluido, y más recientemente el test de generación de trombina o el tromboelastograma, pueden ayudar a determinar la respuesta protrombótica de un paciente con aFL, aunque son ensayos no recomendados en la práctica clínica por su baja reproducibilidad y estandarización (188,189).

Mientras que los métodos para la detección de aCL y a β 2GP1 se pueden calibrar para generar resultados cuantitativos, la presencia de AL se infiere en función del comportamiento de autoanticuerpos en pruebas de coagulación dependientes de fosfolípidos (156,190). Tradicionalmente, en la determinación del AL se lleva a cabo un procedimiento constituido por tres fases:

1. **Test de *screening*:** en esta fase se emplea una concentración baja de fosfolípidos para aumentar el efecto del AL al aumentar la competencia con los factores de la coagulación por los sitios de unión a fosfolípidos. Si se produce un aumento de los tiempos de coagulación, indica que es probable la presencia de un AL (191,192).

2. **Test de confirmación:** es similar al test de *screening* pero empleando mayores concentraciones de fosfolípidos para saturar parcial o totalmente cualquier AL. Con este test se demuestra el carácter dependiente de fosfolípidos de los anticuerpos (191,192).

3. **Test de mezclas:** en este paso se combinan, en una proporción 1:1, plasma del paciente con plasma control normal (plasma con aproximadamente el 100% de actividad de todos los factores de coagulación y una mínima cifra residual de plaquetas ($<10^7$ /mL). Si los tiempos de coagulación no se corrigen, se demuestra la presencia de un inhibidor (191,192).

No Existe consenso en cuanto a la realización del test de mezclas. Algunos autores defienden que el test de mezclas se asocia a un factor de dilución que puede dar lugar a falsos negativos, reduciendo las tasas de detección de AL (184,191–193). Esto ha impulsado la adopción de los denominados modelos integrados como una estrategia de detección de AL, más rápida y rentable, mediante la realización únicamente del test de *screening* y test de confirmación.

La confirmación de la presencia de AL, y su carácter dependiente de fosfolípidos, se establece mediante una diferencia significativa entre el test de *screening* y el test de confirmación. En la interpretación de los ensayos se pueden utilizar la *ratio* normalizada test *screening*/test *confirmatorio*, o el porcentaje de corrección. El porcentaje de corrección es un cálculo recomendado para determinar si existe una dependencia de fosfolípidos, y hace referencia a la diferencia entre el test de *screening* con respecto al test de confirmación. Una corrección del 10% o mayor es indicativo de la presencia de un AL (190,194). En ambos casos los resultados se deben comparar con valores calculados para la

población local. Es necesario establecer valores de corte con cada una de las etapas de la determinación del AL para una correcta interpretación de las pruebas (184,192,195,196).

En una muestra con un AL verdaderamente positivo, el TTPa prolongado debería normalizarse al agregar un exceso de fosfolípidos (1,184). En ocasiones, es necesario un cuarto paso en el proceso de detección del AL para descartar la presencia de otros inhibidores distintos al AL. En este cuarto paso se añade un determinado factor de la coagulación para excluir la existencia de un inhibidor específico de este factor, que puede comportarse como un AL en el test de mezclas (191).

Uno de los principales inconvenientes de las pruebas de AL es su sensibilidad a la terapia anticoagulante, como los AVK, la heparina y los ACODs. Dabigatrán, rivaroxabán y la enoxaparina afectan a los resultados de las pruebas de AL en todas sus etapas (*screening*, confirmación y mezclas) (197). En la mayoría de los casos la determinación del AL debe posponerse hasta que se pueda suspender la terapia anticoagulante, ya que la determinación durante el tratamiento se asocia con falsos positivos y/o falsos negativos (184,197).

La detección actual de AL proporciona evidencia de presencia, pero no de concentración. La capacidad de cuantificar el AL podría ayudar a estratificar a los pacientes en determinados grupos de riesgo. Determinantes como la variabilidad en la sensibilidad y especificidad de las pruebas de detección, no disponer de un plasma de referencia para el test de mezclas, la falta de criterio estandarizado para clasificar al AL como fuerte, moderado o débil, la variabilidad en la interpretación de los resultados entre los laboratorios y las discrepancias sobre el uso del test de mezclas, son algunos de los problemas no resueltos en la determinación del AL (191).

3.2.1.2. Anticuerpos anti-cardiolipina y anti- β 2GP1

Los aCL y a β 2GP1 se detectan mediante ELISA en la mayoría de laboratorios y se expresan como unidades de antifosfolípidos IgM/ml (MPL),

para el isotipo IgM, y unidades de antifosfolípidos IgG/mL (GPL), para el isotipo IgG (1,186). Una unidad GPL o MPL se define como la actividad de unión a fosfolípidos cardiolipina de 1 µg/mL de aCL purificado con afinidad IgG o IgM, respectivamente (198). De acuerdo con la definición actual, se considera un título moderado-alto de anticuerpos cuando este valor es >40 unidades GPL y/o MPL, para aCL, o está por encima del percentil 99 de los valores obtenidos en sujetos de referencia, para aCL y aβ2G1. Estos valores son los que se incluyen como criterio diagnóstico de SAF con el objetivo de aumentar la especificidad de la prueba (1,139).

La presencia de aCL y aβ2GP1 del mismo isotipo refuerza la probabilidad clínica de SAF (187,199). Los test para la determinación de aβ2GP1 tienen un valor diagnóstico, una sensibilidad y una especificidad idénticas a los empleados para la determinación de los aCL (200). En cuanto a la mayor relevancia del isotipo IgG o IgM, distintos estudios han demostrado una asociación más fuerte del isotipo IgG de aCL y de aβ2GP1 con las manifestaciones clínicas del SAF en comparación con el isotipo IgM (15,96,201–203).

El valor y la relevancia clínica de títulos de aFL positivos <40 MPL/GPL y/o menores al percentil 99 es un importante tema de investigación. Diferentes síntomas clínicos pueden estar asociados con distintos niveles de aFL, y el mismo valor numérico de un anticuerpo no garantiza la misma expresión clínica. La definición de títulos de aFL patogénicos depende de las características de la técnica empleada, el método estadístico y la población de referencia utilizada para establecer valores de corte; por lo tanto, la importancia de un título bajo de aFL habrá que interpretarla según el perfil de riesgo completo del paciente. Existen determinados contextos clínicos, sobre todo en los casos de morbilidad obstétrica, en los que se suelen objetivar niveles más bajos de anticuerpos (204).

Debemos tener en cuenta que referirnos a determinados valores numéricos como niveles de aFL bajos o medios puede conllevar el riesgo de una mala interpretación del resultado. El enfoque más apropiado es considerar que un título de anticuerpos más alto significa un riesgo más alto (149). La

relevancia clínica de los resultados de aCL y/o a β 2GP1 que están por debajo del percentil 99 debe estudiarse y definirse mejor utilizando métodos de laboratorio estandarizados (187).

Recientemente se han introducido en el mercado nuevos métodos de determinación de aCL y a β 2GP1 basados en plataformas automatizadas con variaciones de la fase sólida (por ejemplo, micropartículas magnéticas y microesferas) y distintos sistemas de detección (por ejemplo, quimioluminiscencia, citometría de flujo y sistemas multiplex) (200,205,206). Los sistemas automatizados tienen la ventaja de que las condiciones de trabajo están más estandarizadas y protocolizadas, reduciendo así la variación entre laboratorios (187,207). Además, estos sistemas permiten determinaciones de aCL y a β 2GP1, IgM e IgG, con mayor sencillez y rapidez, proporcionando el resultado de las cuatro determinaciones de aFL al mismo tiempo, lo que evita tener que realizar múltiples ELISA.

3.2.1.2.1. Anticuerpos dependientes de cofactor

La mayoría de aFL son reactivos no solo a los fosfolípidos, sino también a las proteínas que se unen a los fosfolípidos, como la β 2GP1 y la protrombina (PT) (72,186,208). La actividad patogénica de los aCL está relacionada con su interacción con el complejo de unión formado por el fosfolípido cardiolipina y la β 2GP1. Este complejo aCL- β 2GP1 juega un papel importante en la patogénesis del SAF (72,182). Actualmente, la opinión predominante en la comunidad científica es que los aFL están dirigidos contra proteínas de unión a fosfolípidos y no contra fosfolípidos libres (65). Es decir, que la actividad de los aFL es dependiente de un cofactor proteico, y que esta dependencia de cofactor es una propiedad distintiva de los aFL patogénicos (67).

En la práctica clínica se recomienda que los inmunoensayos para la detección de aCL contengan β 2GP1 para asegurar la unión de aFL dependientes de cofactor, aunque esta recomendación no se incluyó en la actualización de los criterios clasificatorios del SAF de 2006 (1). Los aFL independientes de cofactor generalmente se consideran irrelevantes en la patogénesis del SAF. En esta

corriente, el SSC de la Sociedad Internacional de trombosis y hemostasia (ISTH, del acrónimo en inglés *International Society on Thrombosis and Haemostasis*) declaró que debe evitarse la detección de aCL independientes de cofactor (187). Un problema importante con esta recomendación es el hecho de que los ELISA actuales para la detección de aCL, por diseño, no pueden distinguir entre aFL independientes o dependientes de cofactor, hecho importante para tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados de los estudios clínicos de SAF y los estudios *in vitro* que utilizan preparaciones de aFL.

Sin embargo, las últimas investigaciones han demostrado que los pacientes con SAF pueden albergar aFL patogénicos que son reactivos a fosfolípidos independientes de cofactor, es decir, a fosfolípidos libres, sobre todo los pacientes que son positivos para aCL y negativos para a β 2GP1 (aproximadamente el 25-50% de los pacientes con SAF). Estos aFL reactivos a fosfolípidos libres inducen respuestas celulares específicas que se consideran procoagulantes y proinflamatorias (71). Esto evidencia que el concepto actual que sostiene que los aFL independientes de cofactor son irrelevantes necesita ser revisado (71).

3.2.2. Anticuerpos Antifosfolípidos “no criterio” de Síndrome Antifosfolípido

Además de los anticuerpos incluidos dentro de los criterios diagnóstico-clasificatorios del SAF (AL, aCL, IgM e IgG, y a β 2GP1, IgM e IgG) (1), se han descrito otros anticuerpos no incluidos en estos criterios pero que sí se han relacionado con la enfermedad, y a los que se les ha denominado anticuerpos “no criterio” de SAF. Estos anticuerpos se unen a fosfolípidos distintos a cardiolipina, como el fosfatidilinositol, el ácido fosfatídico y la fosfatidilserina; también se unen a proteínas que participan en la cascada de coagulación, como la protrombina y/o complejos fosfatidilserina-protrombina; a β 2GP1-D1; y anticuerpos que interfieren con la actividad anticoagulante de la anexina A5 (A5) (209,210).

Entre los anticuerpos “no-criterio” de SAF encontramos: el isotipo IgA de los aCL y a β 2GP1, anticuerpos anti-protrombina (aPT) (211), anticuerpos contra el complejo fosfatidilserina/protrombina (aPS/PT) (IgG e IgM); anticuerpos que se unen al ácido fosfatídico (aPA), anticuerpos anti-fosfatidiletanolamina (aPE) (212), anticuerpos anti-fosfatidilglicerol (aPG), anticuerpos anti-fosfatidilinositol (aPI), anticuerpos anti-fosfatidilserina (aPS), anticuerpos anti-anexina 5 (aA5) (213) y anticuerpos anti-vimentina/cardioplipina (182,210,214). En una reciente revisión sistemática sobre estos anticuerpos se observó una prevalencia significativamente mayor, de todos los anticuerpos analizados, en pacientes con SAF en comparación con controles no diagnosticados del síndrome (215). Los anticuerpos con mayor prevalencia fueron el isotipo IgA de los a β 2GP1 (56.3%), los aA5 (53.4%) y el isotipo IgG de los a β 2GP1-D1 (44%) (215).

Aunque el isotipo IgA no se incluye dentro de los criterios clasificatorios de SAF, los expertos recomienda su determinación, sobre todo de a β 2GP1 IgA, si los isotipos IgG e IgM son negativos y existe una alta sospecha clínica de SAF (149). Por otro lado, tenemos los a β 2GP1 dirigidos contra el dominio 1 de la β 2GP1 (a β 2GP1-D1). Estos anticuerpos son un subgrupo de a β 2GP1, de isotipo IgG, fuertemente asociados con los eventos trombóticos y, en menor medida, con las complicaciones obstétricas del SAF (186,216–218). Se ha demostrado que los a β 2GP1-D1 no incrementan el poder diagnóstico del panel actual de aFL (217,219). La determinación de esta población de a β 2GP1 puede considerarse en el contexto de confirmación de un mayor riesgo trombótico en los pacientes con aFL. Los anticuerpos contra otros dominios de la β 2GP1 no se han asociado con eventos trombóticos (220).

La prevalencia de los aPS/PT es elevada en pacientes con SAF, siendo mayor del 40% en algunos estudios (221,222). Los aPS/PT no están incluidos dentro de los criterios clasificatorios del SAF (1). Sin embargo, fue incluido como componente de la herramienta para la evaluación del riesgo trombótico y diagnóstico de SAF en pacientes con LES propuesta por Sciascia y su equipo de investigación, la escala GAPSS (144). Es frecuente la asociación de determinaciones positivas de aPS/PT con un AL positivo (221,223), y también

con la positividad de $\alpha\beta$ 2GP1-D1 en pacientes con SAF (221,224). En algunos estudios se ha descrito su papel como factor de riesgo independiente de trombosis y pérdidas fetales (222,225).

Otro de los aFL “no criterio” más estudiados son los aPE. En esta ocasión, también se ha descrito la asociación entre la positividad de los aPE y las manifestaciones clínicas del SAF (226). Aunque los aPE se han asociado con las características clínicas principales del SAF, el cribado por aPE no ha demostrado aumentar el rendimiento diagnóstico en el SAF. En cuanto a su valor diagnóstico en la identificación de pacientes con el denominado SAFSN, este es un tema novedoso y actualmente en investigación. En el estudio de Conti y colaboradores, un 58.3% de los pacientes con SAFSN presentaron alguna determinación positiva de aFL “no criterio”, de los cuales, en un 30,5% de los casos fueron aPE (227). Aun así, su papel en el SAFSN es una cuestión que continúa sin resolver (123,228).

La utilidad clínica de la identificación de estos anticuerpos y su valor diagnóstico en el SAF sigue siendo un tema de debate. En algunos estudios se defiende que estos anticuerpos no incluidos dentro de los criterios clasificatorios del SAF podrían ser útiles en el diagnóstico del denominado SAFSN (122,123). Sin embargo, dada la ausencia de métodos estandarizados y el coste-beneficio en el rendimiento diagnóstico de esta enfermedad, no existe justificación para su inclusión en los paneles de estudios rutinarios de aFL (182,210,228).

3.2.3. β -2-glicoproteína-1

La β 2GP1, también conocida como apolipoproteína H, es la principal diana antigénica de los aFL (13,78,229); y según la evidencia disponible los $\alpha\beta$ 2GP1 son los aFL responsables de la mayoría de las manifestaciones clínicas relacionadas con el SAF (208).

La β 2GP1 es un polipéptido glicosilado monocatenario de aproximadamente 50 Kilodalton (KDa). Aunque los hepatocitos representan la

principal fuente de síntesis de β 2GP1, se ha demostrado la presencia de ARN mensajero (ARNm) de β 2GP1 en astrocitos, neuronas fetales, células endoteliales, células trofoblásticas, monocitos y linfocitos (230). En su estructura presenta cinco repeticiones cortas y homólogas denominados dominios *sushi*. Todos los dominios son semejantes estructuralmente entre sí, excepto el dominio V que tiene un bucle C-terminal adicional con un grupo lisina con carga positiva que interacciona con fosfolípidos aniónicos y el lipopolisacárido (231).

La unión de los $\alpha\beta$ 2GP1 aumenta la afinidad de la β 2GP1 por los fosfolípidos aniónicos unas 100 veces (232), y este incremento puede modificar su función fisiológica. La β 2GP1 también puede unirse a otras moléculas con carga negativa, como heparina, ácido desoxirribonucleico (ADN), lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDLox) y células apoptóticas (233,234). La detección de autoanticuerpos contra complejos β 2GP1-LDLox sugiere un papel inmunogénico de los $\alpha\beta$ 2GP1 y la β 2GP1 en el desarrollo de la aterosclerosis (231,233,235).

Esta proteína plasmática puede adoptar tres configuraciones distintas: 1. Una forma circular, cuando circula libre en plasma; 2. Una configuración de anzuelo o en forma de J, que adopta cuando se une a superficies aniónicas, como cardiolipinas u otros fosfolípidos; 3. Y una forma de “S”, como forma intermedia entre las dos anteriores (236,237).

El epítipo con mayor relevancia inmunológica de la molécula, y principal objetivo de los aFL, se encuentra en el dominio 1 (238), y su exposición es dependiente de la conformación que adquiera la proteína: se oculta cuando la β 2GP1 adopta la conformación circular y la forma S, evitando así la unión de $\alpha\beta$ 2GP1. Factores como el estrés oxidativo o la unión a fosfolípidos favorecen cambios conformacionales en la estructura de la β 2GP1 que lleva a la exposición de este epítipo inmunodominante (237–239) (Figura 4).

Como vimos en el apartado de patogénesis, la unión de aFL a la β 2GP1 induce la activación de células endoteliales e incrementa la expresión de moléculas de adhesión protrombóticas, la secreción de citoquinas

proinflamatorias y de FT (72,86). Además, la interacción aFL- β 2GP1 disminuye la actividad del TFPI (83), reduce la actividad de la PCA (85), activa el complemento (88,89) y aumenta la actividad neutrofílica con aparición de NETosis y aumento de la expresión de IL-8 (80). Generando un fenotipo de alto riesgo trombótico (5).

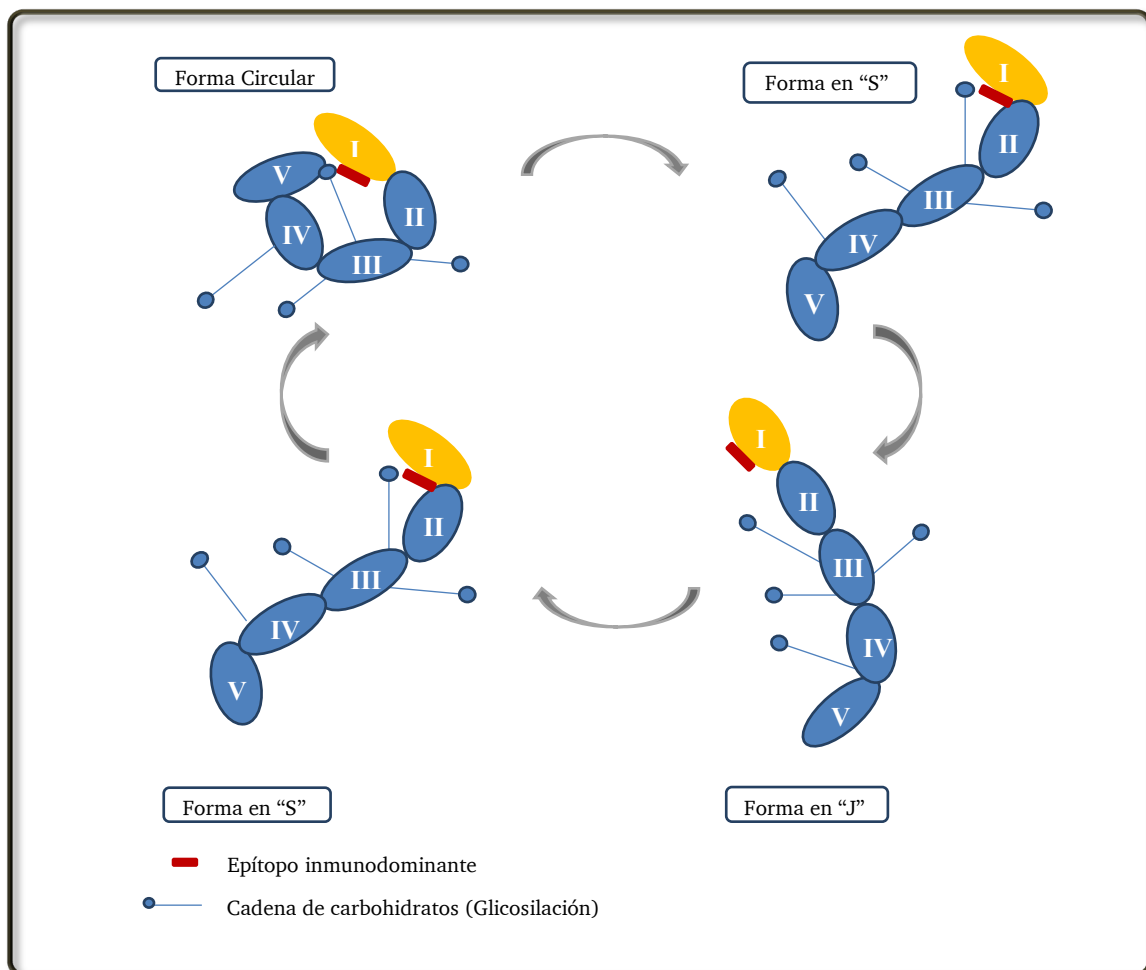


Figura 4. Representación esquemática de las tres conformaciones de la β 2GP1 y la relativa disposición del dominio 1 con el epítipo inmunodominante.

3.2.3.1. Papel fisiológico de la β 2GP1 en la hemostasia

La β 2GP1 juega un papel importante en la hemostasia (72,78,229): interfiere en diferentes fases de la cascada de la coagulación y actúa sobre el sistema fibrinolítico, llevando a cabo actividades tanto procoagulantes como anticoagulantes (78,229).

La β 2GP1 ejerce actividad procoagulante mediante la inhibición de varios anticoagulantes naturales; como impedir la activación de la proteína C e inhibir a la PCA, impidiendo así la degradación del FVa (240). También inhibe la vía del TFPI y la anexina A5 (78,81,213).

Debido a que diferentes moléculas con carga negativa, como la fosfatidilserina, pueden desencadenar la vía intrínseca de la coagulación, la β 2GP1 ha sido considerada como un anticoagulante natural (231). Es capaz de inhibir las reacciones de la coagulación dependientes de fosfolípidos, la actividad de la protrombinasa y la tenasa en plaquetas (241), la activación del FXII de la coagulación y la activación de plaquetas dependiente de adenosina difosfato (ADP) (231,242).

3.2.3.2. Relación entre Anticuerpos Antifosfolípidos, β 2GP1 y factor XI de la coagulación

La β 2GP1 está implicada tanto en la cascada de la coagulación como en el sistema fibrinolítico, y, posiblemente, una de las principales acciones anticoagulantes de la β 2GP1, en condiciones fisiológicas normales, es la atenuación de la vía intrínseca de la coagulación al inhibir la activación de FXI por la trombina (229). Se ha demostrado que la β 2GP1 es capaz de unirse directamente al FXI de la coagulación (243) y que el sitio de unión está localizado en la región C-terminal del dominio V (243). Además, se ha demostrado *in vitro* que los a β 2GP1 potencian la inhibición de la β 2GP1 sobre el FXI (244). De este modo se establece un importante nexo entre los aFL y la regulación de los factores de la coagulación, en particular el FXI, con gran implicación en el riesgo trombótico de estos pacientes.

3.3. EL FACTOR XI DE LA COAGULACIÓN

3.3.1. Bioquímica del FXI

El gen que codifica el FXI está localizado en el cromosoma 4 (4q35). Se compone de 15 exones y 14 intrones, y abarca una región de 23 kilobases (245). La mayor parte del FXI se sintetiza en los hepatocitos, aunque también se ha demostrado su expresión en túbulos renales y en islotes pancreáticos (246). En estas células también se ha demostrado la presencia de factor de transcripción nuclear de hepatocitos-4 α (HNF-4 α), que es necesario en la transcripción del gen *F11* (247).

El FXI es una glicoproteína que circula en el plasma en forma de zimógeno de la serín proteasa FXIa, que como hemos comentado es la forma activada del FXI. La mayor parte del FXI en plasma circula formando complejos con el quinínogeno de alto peso molecular o HK (del acrónimo en inglés *high molecular weight kininogen*), que funciona como transportador y estabilizador del FXI, y además participa en la unión del FXI a superficies cargadas negativamente y en la activación proteolítica de FXI a FXIa (248–250).

Tanto los niveles plasmáticos de FXI como su actividad coagulante (FXI:C) en población sana son muy variables y oscilan de 3 a 7 $\mu\text{g/mL}$, y 70 a 150 U/dL (o 70-150%); respectivamente (251). Algunos trabajos concluyen que algunos fármacos como los corticoides pueden elevar el nivel de FXI (252).

El FXI tiene una característica estructural que lo distinguen de otras proteasas que participan en la coagulación (248); es un dímero de 160 kDa compuesto por dos subunidades idénticas, de 80 kDa y 607 aminoácidos cada una (250,253). La dimerización del FXI es crucial para su secreción y para la activación del FIX de la coagulación en la superficie plaquetaria (Figura 5) (251,254,255).

Cada monómero o subunidad del FXI contiene cuatro repeticiones de aminoácidos denominadas dominios manzana, del inglés *Apple* (A1 a A4), y un dominio catalítico C-terminal (Figura 6) (248,253,256). Los dominios manzana contienen los sitios de unión a otras moléculas entre las que se incluyen la trombina en el dominio A1; el HK en el dominio A2; FIX, glicoproteína plaquetaria GPIb, heparina y heparán sulfato en el dominio A3; y el FXIIa en el dominio A4. El dominio A4 también contiene la interfaz para la unión entre los 2 monómeros, que se realiza por un puente disulfuro entre la cisteína 321 de cada subunidad (Figuras 5 y 6)

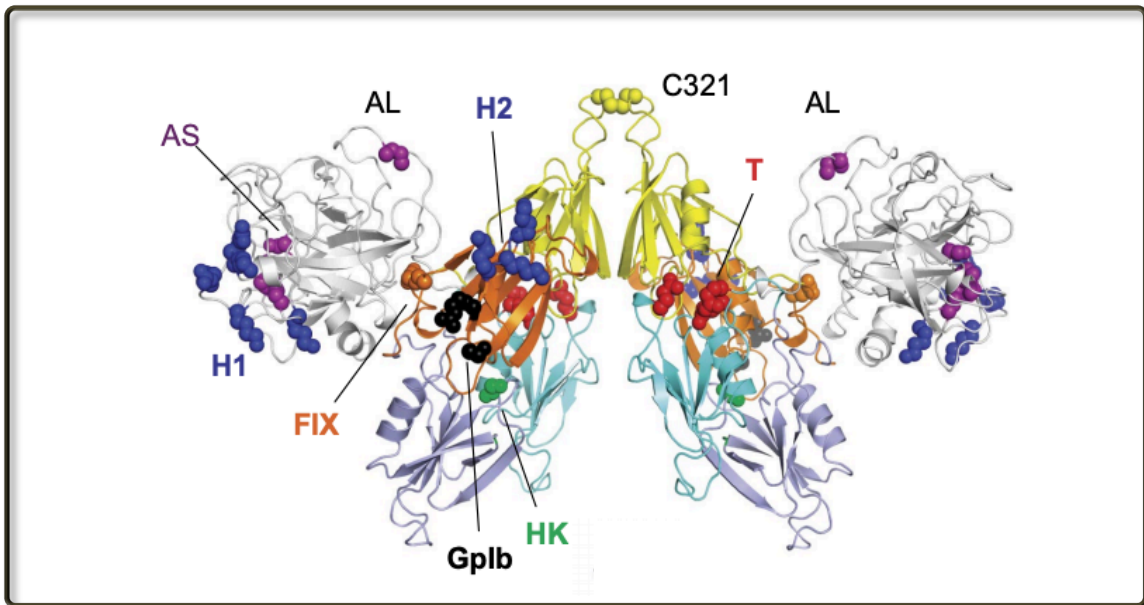


Figura 5. Estructura dimérica del FXI. Los sitios de unión son: rojo para trombina (T), verde para HK, negro para GPIb, azul para heparina (H1 y H2) y naranja para FIX. El dominio catalítico está en blanco, en el que el sitio activo (AS) y el punto de ruptura del *loop* de activación (AL) está identificados en color púrpura. Figura modificada de la original publicada en *Blood* por los autores Emsley, J., McEwan, P. A., & Gailani, D. (250) .© The American Society of Hematology.

Los dominios manzana adoptan una estructura discoide que interactúa con la base del dominio catalítico creando una configuración de "taza y plato" que facilita la función fisiológica del FXIa (Figura 5) (248,253).

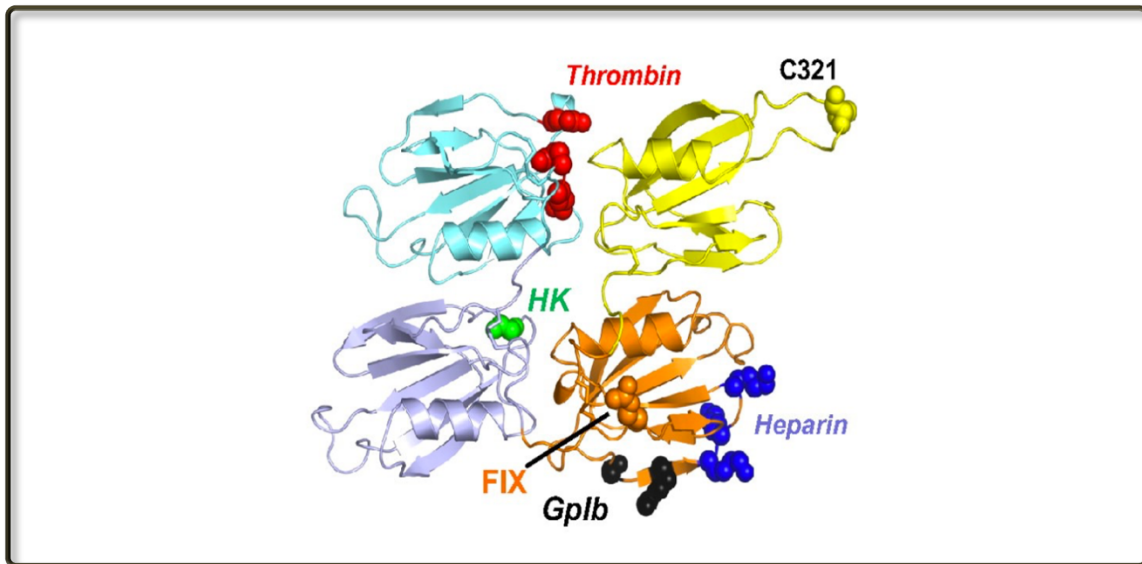


Figura 6. Subunidad del FXI de la coagulación humano. En la imagen podemos observar los 4 dominios manzana: dominio A1 (azul claro), A2 (morado), A3 (naranja) y A4 (amarillo), que constituyen una subunidad del FXI, sin el dominio catalítico. HK: sitio de unión del kininógeno de alto peso molecular; Thrombin: sitio de unión a la trombina; GPIb: sitio de unión de la GPIb; Heparin: sitio de unión de la heparina; y FIX: sitio de unión del FIX. Figura modificada de la original publicada en *Blood* por los autores Emsley, J., McEwan, P. A., & Gailani, D. (250) .© The American Society of Hematology.

3.3.2. Función del factor XI de la coagulación

En la evolución genómica de la ruta de contacto de la cascada de la coagulación, el FXI surgió en los mamíferos por una duplicación del gen de la

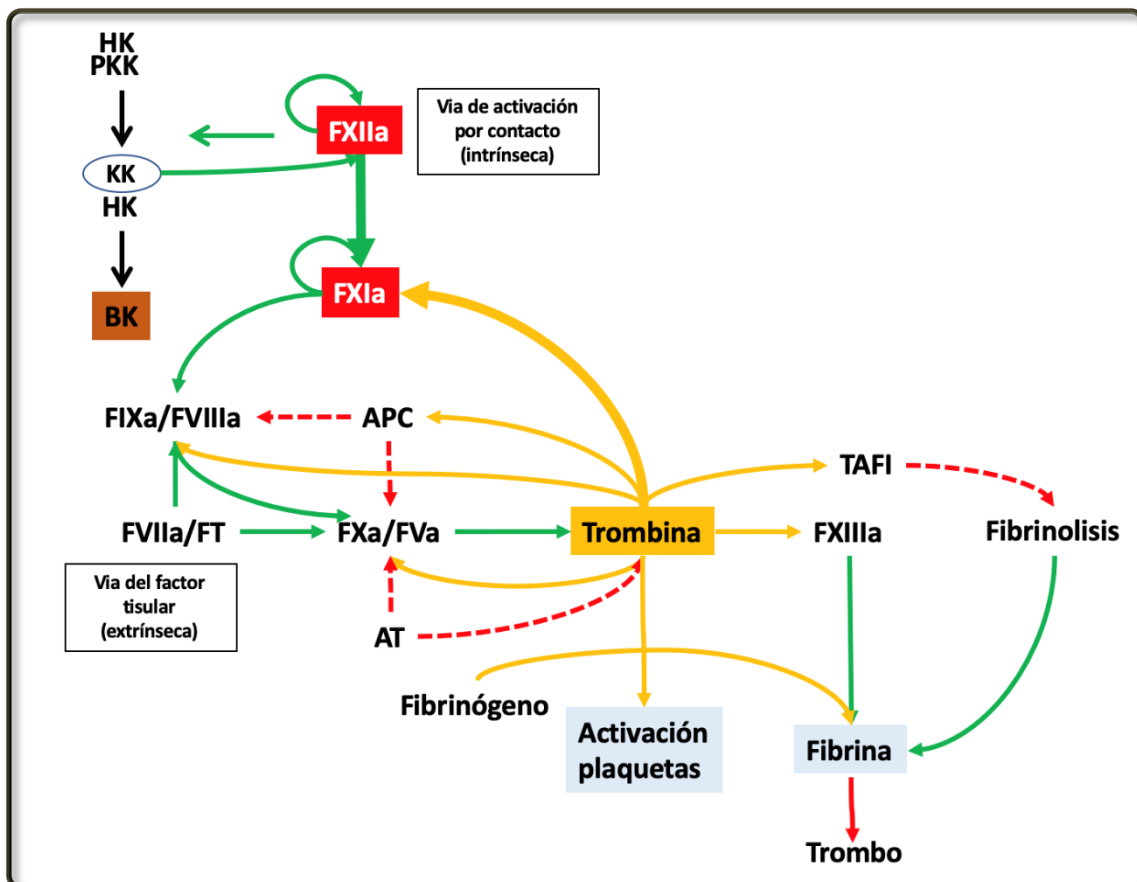
precalicreína (PK) (257) y aunque comparte características con esta, tiene funciones únicas que le permiten contribuir a la generación de trombina. Así, al igual que la PK, el FXI se une al HK (258) y es activado por el FXIIa (254,259). Pero, a diferencia de la PK, el FXI también es activado por trombina, lo que le permite participar en la vía extrínseca de la coagulación iniciada por el complejo FT-FVIIa (Figura 7).

De manera similar, el FXIa conserva la capacidad de la α -calicreína (forma activa de la PK) para activar el FXII, mientras que también tiene la capacidad de activar al FIX (255,260); pudiendo funcionar como una interfaz bidireccional entre los sistemas de contacto y la generación de trombina iniciada por el complejo FT-VIIa.

El FXI circula en plasma como un zimógeno, que se activa tras la acción proteolítica mediada por diferentes proteasas. Es un factor necesario para la activación del FIX, y de este modo mantener la producción de trombina durante el proceso de coagulación en el sitio de la lesión vascular y así conseguir la estabilidad del trombo (Figura 7) (261). A pesar de la capacidad de la vía de contacto para iniciar la coagulación *in vitro*, el FXI parece ser el único factor de esta vía requerido en el proceso de la hemostasia (260,262). La deficiencia de los otros factores de la ruta de contacto (FXII, PK y HK) no está asociada con un aumento del riesgo sangrado, mientras que los pacientes con déficit de FXI, en ocasiones, sí presentan episodios hemorrágicos, lo que sugiere que el papel del FXI en la hemostasia es independiente de la activación por la vía de contacto (262,263).

Como hemos comentado, el FXI no solo participa en la vía intrínseca de la coagulación, sino que tiene un papel procoagulante independiente a la activación del FIX (264). Se ha demostrado que puede actuar como activador del FX *in vitro* y promueve la formación de trombina a través de la activación de los cofactores VIII y V (258,260). Además, el FXI también actúa sobre la vía extrínseca de la coagulación mediante la inactivación del TFPI (258,265).

Se ha demostrado que los principales activadores del FXI son el FXIIa y la trombina. Con la evidencia científica disponible, se postula que ambas vías, la activación mediada por FXIIa y la activación mediada por trombina, tienen diferentes significados biológicos; siendo poco relevante en la hemostasia fisiológica la activación mediada por el FXIIa, pero sí en la formación patológica de eventos trombóticos *in vivo* (259,266–268).



HK: quinínogeno de alto peso molecular; PKK, precalicreína; KK, calicreína; BK, bradiquinina; APC, proteína C

Figura 7. Esquema del funcionamiento de la cascada de la coagulación.

El FXIa generado por trombina contribuye a la síntesis mantenida y estable de trombina en la fase de amplificación de la coagulación. Este mecanismo de retroalimentación o *feedback* permite alcanzar una coagulación efectiva. La trombina generada en esta fase de amplificación activa las plaquetas,

el FV, el FVIII, el FXI y al inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina o TAFI (del acrónimo en inglés *Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor*), que protege el coágulo de una fibrinólisis prematura mediada por plasmina (269). Este papel del FXI se considera muy importante para la propagación del coágulo, especialmente cuando pequeñas cantidades de FT inician la cascada de la coagulación (269). Por todo ello, además de su función procoagulante, se ha asignado al FXI una función antifibrinolítica (258,260) (Figura 7).

Esta función hemostática justifica las implicaciones patológicas en las que se ha involucrado al FXI. Pero además de su papel en la hemostasia y la coagulación, resultados obtenidos de estudios con modelos animales sugieren un papel del FXI como enlace molecular entre la cascada de la coagulación y el complejo proceso de la inflamación, actuando como un factor regulador de la respuesta inflamatoria (270–272).

3.3.2.1. Factor XI de la coagulación y trombosis

El papel procoagulante y antifibrinolítico del FXI también justifica que los niveles elevados de FXI incrementen el riesgo trombótico (273). Los datos del *Leiden Thrombophilia Study* (273) han demostrado que las personas con niveles de FXI por encima del percentil 90 tienen mayor riesgo de ETEV con una OR de 2.2 (Intervalo de confianza (IC) 95%, 1,5-3,2). Varios estudios, uno de ellos reciente, han demostrado una alta recurrencia de ETEV en pacientes con mayores valores de FXI:C (274,275).

También se han asociado niveles elevados de FXI con un incremento del riesgo de eventos trombóticos en territorio arterial (276–278). En el estudio de Loeffen y colaboradores, en el que se incluyeron un total de 56 pacientes con un primer IAM y 30 voluntarios sanos, se demostró, que los niveles plasmáticos de FXIa en los pacientes con IAM eran significativamente mayores en comparación con los niveles de FXIa en los controles sanos (mediana (RIC): 3,7 (2,7-5,5) Vs 2,7 (1,6-4,2); $p= 0.004$). Además se objetivó que en los pacientes con IAM, durante el evento isquémico agudo, la concentración plasmática de FXIa fue significativamente mayor en comparación con una nueva medición a los 6 meses

(3,7 (2,7-5,5) Vs 2,8 (1,9-4,3); mediana (rango intercuartílico (RIC)); $p = 0.001$) (278).

En cuanto a la afectación del SNC, los niveles elevados de FXI también se han asociado con un mayor riesgo de eventos isquémicos. En el estudio de Yang y colaboradores, en el que se incluyeron 95 pacientes menores de 55 años, 65 con antecedente de ictus y 13 con antecedente de AIT, se observó que los niveles de FXI:C por encima del percentil 95, calculado a partir de un grupo de controles sanos, se asociaban con una OR de 5.3 (IC 95% entre 1,2-24,1) para ictus (279).

Sin embargo, sigue siendo difícil determinar si el aumento de este factor de la coagulación es la causa o la consecuencia de un evento trombótico.

3.4.2.2. Factor XI de la coagulación, inflamación y respuesta innata del sistema inmune

La ruta de contacto de la coagulación es una cascada de proteasas plasmáticas iniciada a través del FXII que activa la sistema proinflamatorio calicreína-cinina y la vía intrínseca de la coagulación (280). La activación de la ruta de contacto no tiene un papel relevante en la hemostasia fisiológica, pero puede contribuir de manera importante en procesos inflamatorios y a la activación de la coagulación en procesos trombóticos (281–283).

La interacción entre la coagulación y la inflamación está mediada por el sistema de contacto, que consta del FXII, FXI, PK y HK (284). Estas enzimas a su vez son responsables de la generación del FIXa, la activación del sistema del complemento y la generación del potente péptido inflamatorio y vasodilatador bradiquinina a partir del HK (257).

La acumulación local de bradiquinina desencadena los signos clásicos de inflamación, que incluyen vasodilatación, aumento de la permeabilidad, dolor y función tisular reducida (280). Las superficies aniónicas son capaces de inducir la activación del zimógeno FXII a FXIIa. Las superficies bacterianas también tienen la capacidad de activar las proteínas del sistema de contacto, lo que

indica un papel importante para la defensa del huésped mediante la cooperación de las vías inflamatoria y de coagulación.

La coagulopatía resultante en procesos inflamatorios probablemente sea impulsada por componentes de células bacterianas, entre los que se incluyen peptidoglicanos, ácido teicoico, polifosfatos y lipopolisacáridos (LPS), que se ha demostrado que activan las proteasas de la ruta de contacto y los leucocitos, aumentando la expresión de FT (285). También se ha demostrado que la activación de los zimógenos que participan en la cascada de la coagulación sanguínea se produce localmente en los procesos inflamatorios (286), donde se cree que desempeñan un papel en la regulación del tráfico y la función de los leucocitos polimorfonucleares.

En cuanto al papel del FXI, participa como factor regulador de la respuesta inflamatoria (272,287). Hemos visto que el FXIa participa en la fase de propagación y estabilización del coágulo, manteniendo el proceso de generación de trombina. Este proceso podría incrementarse en procesos sépticos mediante la regulación positiva de la expresión de FT y el aumento de la permeabilidad vascular (288).

La coagulación intravascular que se produce en algunos procesos infecciosos es común en pacientes con sepsis grave. La activación y el consumo de factores de contacto asociados a la infección, incluidos FXI y FXII, han sido bien documentados en modelos animales (271,280,285). Corral y colaboradores, en su estudio sobre la incidencia de coagulación intravascular diseminada en ratones tras ligadura intestinal y punción cecal, o mediante infusión de LPS, propusieron que la activación de la coagulación es independiente de la respuesta inflamatoria y que la coagulopatía tiene una menor influencia en la supervivencia (289). También se ha demostrado que en ratones deficientes en FXI la sepsis bacteriana mixta y la coagulopatía asociada que se desarrolla tras la realización de una perforación intestinal son menos graves que en los modelos no deficientes en este factor (272).

En el estudio de Tucker y colaboradores sobre la supervivencia en ratones con sepsis polimicrobiana tras inhibición de la activación del FXI, se observó que la anticoagulación temprana con un anticuerpo inhibidor de la activación del FXI por el FXII mejoraba la supervivencia tras la perforación del intestino grueso sin aumentar el riesgo de hemorragia ni el tiempo de sangrado (290); demostrando en este modelo que el tratamiento con inhibidores de la activación del FXI aumenta significativamente la supervivencia en sepsis polimicrobianas en comparación con el tratamiento habitual, sin incrementar el riesgo de sangrado (290).

Por lo tanto, además de su papel en la hemostasia y la trombosis, la actividad del FXI puede estar involucrada en el proceso inflamatorio, actuando sobre plaquetas y leucocitos, así como en el proceso de generación de bradicinina. De este modo se pone de manifiesto la interacción entre el proceso inflamatorio y la cascada de la coagulación, lo que además implica que el FXIa puede desempeñar un papel en la inmunidad innata (270).

3.3.3. Déficit de factor XI

La deficiencia de FXI fue descubierta por Rosenthal en 1953 al describir una nueva coagulopatía hereditaria a la que denominó hemofilia C (291). A diferencia de la hemofilia A y la hemofilia B, el déficit de FXI en raras ocasiones se manifiesta como una hemorragia espontánea, y no se asocia con hemorragias articulares ni musculares. Los sangrados espontáneos son raros incluso en pacientes con déficit grave de FXI (292,293).

El patrón de herencia de la deficiencia congénita de FXI es autosómico recesivo; aunque existen algunas mutaciones con efecto dominante negativo, por lo que en algunos casos sujetos heterocigotos tienen una FXI:C <50% (249). La mayoría de las mutaciones del gen del FXI, el gen *F11*, se relacionan con disminución de la producción de la proteína activa, y se definen como mutaciones CRM- (del acrónimo en inglés *Cross Reactive Material negative*). Solo un 4% de los casos de déficit congénito de FXI se relaciona con mutaciones que

no afectan a la síntesis (producción, plegamiento y dimerización) y/o secreción del FXI, y que sólo tienen consecuencias funcionales; estas son las denominadas mutaciones CRM+ (del acrónimo en inglés *Cross Reactive Material positive*) (251,294,295).

La deficiencia de FXI (FXI:C <70%) es un trastorno hemorrágico raro que se observa con una incidencia, aproximada, de 1 de cada 1.000.000 de personas en todo el mundo (296,297). Se considera que es el más frecuente de los trastornos hemorrágicos poco comunes. Sin embargo el déficit congénito de FXI, es más frecuente en algunos grupos étnicos, como los judíos de origen Askenazí o Iraquí, con una frecuencia heterocigótica del 8 y el 3,3%, respectivamente (298). En la población judía de origen Askenazí, dos mutaciones, p.Glu135Ter y p.Phe299Leu, se identifican hasta en el 95% de los casos de deficiencia de FXI (299).

No obstante, evidencias sobre las limitaciones de los métodos diagnósticos de la deficiencia de FXI y sus escasas manifestaciones hemorrágicas han llevado a plantear a muchos autores que la prevalencia de la deficiencia de FXI en poblaciones no judías esté subestimada. Así, en un reciente estudio se objetivó una frecuencia más alta de la esperada de algunas de las mutaciones patogénicas responsables de la deficiencia congénita de FXI (300).

Además del déficit congénito se han descrito casos de déficit adquirido de FXI, sobre todo relacionados con enfermedades autoinmunes sistémicas, como el LES, en el que se ha observado la presencia de inhibidores del FXI asociados a una mayor actividad clínica y analítica de la enfermedad (301–303). En varios estudios también se ha demostrado una relación entre el FXI y los aFL. Como ya hemos comentado anteriormente, la β 2GP1 inhibe la activación del FXI mediada por trombina, y los a β 2GP1 potencian esta acción inhibitoria de la β 2GP1 (243,244).

En cuanto a los métodos diagnósticos para determinar el FXI, el trabajo de Salloum-Asfar y colaboradores demostró la importante limitación del TTPa

como método para el diagnóstico de la deficiencia de FXI. En este mismo trabajo, se establece que los ensayos que emplean sílice y ácido elágico como activadores de la ruta de contacto para la determinación de la FXI:C tienen una sensibilidad mucho mayor que el TTPa para detectar pacientes con deficiencia de este factor (304).

La activación de la ruta de contacto empleada para determinar los valores de FXI:C se puede realizar con dos reactivos: uno basado en ácido elágico (SynthAFax™) y otro basado en sílice (SynthASil™) tras diluir el plasma del paciente en plasma carente de FXI. Los tiempos de coagulación obtenidos se expresan como porcentaje del obtenido con el plasma de referencia establecido en el laboratorio.

En función del resultado de la FXI:C se establecen tres niveles de deficiencia de FXI: 1. Grave (FXI:C <20%); 2. Moderada (niveles de FXI:C entre el 20 y 60%); 3. Leve (niveles de FXI:C entre el 60 y 70%). Como el rango de normalidad de la FXI:C es muy amplio, entre el 70 y el 150%, los casos con un déficit leve pueden pasar totalmente desapercibidos (260).

3.3.3.1. Perfil clínico de la deficiencia de FXI

Estudios en modelos animales, y en pacientes con deficiencia congénita de FXI muestran de forma contundente que el riesgo de sangrado asociado a la deficiencia de FXI es muy variable, ya que abarca desde una ausencia completa de manifestaciones hemorrágicas a hemorragias graves que precisan tratamiento con trasfusión de varios concentrados de hematíes, y que, sorprendentemente, no se correlaciona con el nivel plasmático de FXI, ni con los valores de FXI:C (292,293).

Estudios con ratones *knockout* (KO) para el FXI (ratones modificados genéticamente para presentar una deficiencia completa de FXI), confirman el papel del FXI en la ruta de contacto, ya que estos ratones presentaban una prolongación del TTPa. Pero también demuestran el escaso papel fisiológico de

esta ruta, ya que estos ratones no solo no presentan mayor riesgo de hemorragia, sino que su tiempo de sangrado, determinado al cortar el extremo de la cola, era radicalmente normal (305,306). Estudios recientes notifican cierto riesgo hemorrágico cuando se emplean determinados modelos de sangrado, como los de la vena safena (307), y aunque los datos de estos estudios experimentales en ratones no se extrapolan necesariamente a los seres humanos, es interesante observar que la hemorragia en los casos con deficiencia de FXI se produce principalmente como resultado de una alteración en el sistema hemostático secundaria a lesiones traumáticas y/o quirúrgicas.

En humanos con deficiencia congénita de FXI se ha mostrado su relación con una clínica hemorrágica, sobre todo después de una cirugía o traumatismo en tejidos con alta actividad fibrinolítica, como la boca, la nariz y el tracto genitourinario, que es especialmente relevante en la mujer (304), y que pueden llegar a comprometer la vida del paciente (249). Sin embargo, la variabilidad del riesgo hemorrágico en los pacientes con déficit de FXI y la ausencia de relación con los niveles plasmáticos y su actividad coagulante en plasma ha llevado a plantear que sean otros factores los que determinen el riesgo hemorrágico en pacientes con deficiencia de FXI: alteración de otros factores de la coagulación, defectos plaquetarios y alteración del sistema fibrinolítico, entre otros.

Aunque quedan muchos aspectos por aclarar en relación al riesgo hemorrágico asociado con la deficiencia de FXI, lo que ha revolucionado el protagonismo de esta molécula procoagulante, y en particular su deficiencia, ha sido la reciente descripción del papel que tiene en patología trombótica y las abundantes evidencias tanto experimentales, obtenidas con diferentes modelos animales, como epidemiológicas, que sustentan la hipótesis de que la deficiencia de FXI puede tener un efecto protector frente a los eventos trombóticos, tanto en territorio arterial como venoso (266,308–310).

3.3.3.2. Deficiencia de factor XI de la coagulación y trombosis

Numerosos estudios nos aportan evidencia científica sobre el papel protector del déficit de FXI en la patología tromboembólica. Un estudio reciente que incluye un total de 10193 sujetos; 8.958 con FXI:C normal, 690 (6,8%) con deficiencia de FXI moderada y 542 (5,3%) con deficiencia moderada-grave, demostró que el déficit de FXI disminuye significativamente tanto la incidencia de eventos trombóticos arteriales (ictus, AIT e IAM) como, especialmente, el riesgo de ETEV (HR=0,26; IC95%: 0,08-0,84) (311).

En otro estudio, Salomon y su equipo de investigación mostraron que ninguno de los 219 pacientes que presentaban un déficit grave de FXI:C desarrollaron eventos trombóticos venosos; un resultado estadísticamente menor al número esperado en la población general (4,7%, calculado a partir de un estudio poblacional) (p= 0,019) (309).

Sin embargo, existe controversia sobre el efecto protector de la deficiencia de FXI en la trombosis arterial, especialmente con el IAM (310). Según lo publicado en otros trabajos, el déficit de FXI parece no ejercer un papel protector en el IAM, pero sí en el ictus (310,312,313). Es necesario la realización de estudios dirigidos a clarificar esta disparidad del efecto protector de la deficiencia de FXI en la trombosis arterial.

El efecto protector antitrombótico asociado al déficit de FXI también se ha estudiado en distintos modelos animales, y todos ellos demuestran que la reducción y/o inhibición del FXI (por diferentes métodos, desde genéticos a farmacológicos) protege de eventos trombóticos sin aumentar el riesgo hemorrágico (308,314,315). Los trabajos con modelos murinos KO para FXI, en los que se llevó a cabo la inducción de trombosis mediante diferentes modelos y en distintos territorios, demostraron que el déficit del FXI ejerce un papel protector frente al desarrollo de eventos trombóticos, tanto en territorio arterial como venoso (316).

Todos los modelos analizados de inducción de trombosis confirman que la deficiencia de FXI protege frente a la trombosis: lesión con cloruro férrico (317,318), lesión mediada por láser (319), compresión vascular (320), o mediante la oclusión transitoria de la arteria cerebral media (266). En todos estos casos el déficit de FXI actuó como un elemento inhibidor de la formación del trombo. Además, se ha demostrado que este efecto protector se mantiene también en algunos estados trombofílicos (321).

El efecto antitrombótico observado en ratones con déficit de FXI, asociado a un riesgo hemorrágico mínimo, también se ha estudiado y descrito en otros modelos animales (ratas, conejos, e incluso primates); no sólo mediante aproximaciones genéticas que rompen el gen codificante, sino también mediante agentes farmacológicos que reducen los niveles o bloquean la actividad procoagulante del FXI plasmático.

Gruber y colaboradores, en su estudio con primates, fueron los primeros en demostrar el efecto antitrombótico del empleo de anticuerpos anti-FXI (322). En su trabajo, el efecto antitrombótico de los anticuerpos anti-FXI fue comparable con el de la heparina a dosis que prolongaban de manera significativa el TTPa, el tiempo de protrombina (TP) y el tiempo de sangrado (TS); sin embargo, a pesar de que el agente anti-FXI también prolongó el TTPa, el TP y el TS no se vieron afectados. Todos estos resultados mostraban que el FXI es un objetivo prometedor en la terapia antitrombótica (323) y animaron a iniciar ensayos clínicos que evaluaran la eficacia antitrombótica de fármacos anti-FXI.

3.3.4. El factor XI de la coagulación como nueva diana terapéutica antitrombótica

La TV, incluyendo la TVP y el embolismo pulmonar (EP), afecta en torno a 7-14 millones de personas/año en todo el mundo (324). Además, la trombosis arterial, incluida la cardiopatía isquémica y el accidente cerebrovascular, causa más de 10 millones de muertes al año en todo el mundo; una tasa que se ha incrementado en un 25-35% durante los últimos 20 años y que se espera alcance

cifras pandémicas en el futuro por el envejecimiento de la población (324). La trombosis es la patología subyacente común de estas enfermedades y los fármacos anticoagulantes son el pilar principal para su prevención y/o tratamiento.

El objetivo de la terapia anticoagulante es evitar o al menos disminuir los eventos trombóticos sin alterar la hemostasia. Durante décadas, los AVK como el aldocumar y el acenocumarol, que impiden una modificación postraduccional (gamma-carboxilación) de varios factores de coagulación (325), fueron los únicos anticoagulantes orales disponibles. Los ACOD han surgido en la última década como alternativas a los AVK y han sido aprobados tanto para indicaciones venosas como arteriales. Los ACOD comercializados como dabigatrán (un inhibidor directo de la trombina), apixabán, betrixabán, edoxabán y rivaroxabán (inhibidores del FXa) son medicamentos anticoagulantes muy efectivos y con un perfil de seguridad mejor que los AVK (326–329). Sin embargo, su riesgo de sangrado no es nulo y puede llegar a ser de entre el 2 y el 3% por año en pacientes con fibrilación auricular; mientras que la tasa anual de sangrado intracraneal varía de 0.3% a 0.5% (330–332). Por todo ello, es necesario continuar la búsqueda de anticoagulantes más selectivos con menor o ningún riesgo de sangrado.

En este contexto, y con las evidencias ya indicadas, especialmente la relación de niveles elevados de FXI con alto riesgo trombótico, la protección antitrombótica que provoca su déficit y el escaso riesgo hemorrágico asociado con esta deficiencia, apuntan al FXI como un excelente candidato en las nuevas terapias anticoagulantes (267,321,333). Por ello, en la actualidad hay un destacado interés tanto por instituciones académicas como por la industria farmacéutica en identificar y desarrollar nuevas opciones terapéuticas que tienen como objetivo al FXI, para prevenir eventos trombóticos y al mismo tiempo evitar la alteración de la hemostasia (334).

Se están explorando varias estrategias relacionadas con la inhibición del FXI (Tabla 4). Entre las principales líneas de investigación nos encontramos: I.

Oligonucleótido Antisentido o ASO (del acrónimo inglés *Antisense Oligonucleotide*) que reducen la síntesis hepática de FXI (335–339); II. Anticuerpos monoclonales que bloquean la activación de FXI o la actividad del FXIa (340,341); III. Aptámeros (segmentos cortos de ADN o ARN con dianas específicas) que se unen al FXI o FXIa, impidiendo la activación de su substrato en la cascada de la coagulación, el FIX (342,343); IV. Pequeñas moléculas que bloquean el sitio activo del FXIa o inducen una modulación alostérica del FXI (344–346).

Entre los anticuerpos monoclonales inhibidores del FXI el más reciente es el Osocimab, un anticuerpo monoclonal IgG humanizado que reduce la actividad del FXIa y prolonga el TTPa de manera dosis-dependiente (347). Aunque se ha demostrado que este anticuerpo es efectivo en la inhibición del FXI, y así prevenir los eventos trombóticos, el Osocimab no demostró un perfil de seguridad mayor que el de otros tratamientos antitrombóticos como la HBPM o el apixaban (348).

En un estudio muy reciente se describe otra de las estrategias diseñadas para reducir los niveles plasmáticos de FXI, mediante la inmunización del dominio catalítico. El experimento fue llevado a cabo en ratones a los que se inmunizó, por vía parenteral, con un antígeno quimérico que contenía el dominio catalítico del FXI y el dominio T de la toxina diftérica. Esta inmunización produjo una reducción de la actividad coagulante del FXI plasmático de hasta el 54%, con lo que se obtuvo un efecto protector frente a la trombosis (349).

Tabla 4. Principales estrategias terapéuticas antitrombóticas que tienen como diana al FXI.

Estrategia anti-FXI	Mecanismo de acción
Antagonistas de los polianiones	Neutralización de polifosfatos o ácidos nucleicos vía interacciones aniónicas, atenuando la ruta de contacto
Anticuerpos monoclonales	Unión al FXI y bloqueo de su actividad
Aptámeros	Unión al FXI y bloqueo de la activación o de la actividad
ASO	Reducción de la síntesis hepática del FXI
Inmunización mediante antígenos	Inmunización del dominio catalítico del FXI
Pequeñas moléculas peptidomiméticas	Unión al sitio activo del FXIa y bloqueo de su actividad

ASO: *antisense oligonucleotide*; FXI: factor XI de la coagulación; FXIa: FXI activado.

Algunos de estos fármacos se han mostrado con excelente eficacia preclínica en modelos de trombosis (350,351) y varios ya han iniciado ensayos clínicos en diferentes estadios (351–353)(Tabla 5).

Tabla 5. Ensayos clínicos realizados hasta la fecha empleando agentes que tienen como diana al FXI

Fármaco	Acción	Vía de administración	Lugar de acción	Fase de Ensayo Clínico
ISIS 416858	Antisentido	Subcutánea	FXI mRNA	Fase 2
MAA868	Anticuerpo	Subcutánea	En el sitio de acción del FXI y FXIa	Fase 1
BAY 12123790	Anticuerpo	IV; en 60 minutos.	Adyacente al lugar de acción del FXIa	Fase 1
AB023	Anticuerpo	IV; en bolo.	Dominio manzana del FXI y FXIa	Fase 1
EP-7041	Molécula pequeña	IV; en bolo y por goteo	Inhibe al FXIa de manera selectiva	Fase 1
BMS-986177	Molécula pequeña	Oral	Inhibe al FXIa de manera selectiva	Pre-clínica

Hasta la fecha, se han realizado tres ensayos clínicos en humanos sobre terapia antitrombótica que tiene como diana terapéutica el FXI (338,348,353).

EL primero de ellos fue publicado en *New England Journal of Medicine* (NEJM), en 2015, en el que se emplea un ASO anti-FXI de la coagulación; en 2020 se ha publicado en el *Journal of the American Medical Association* (JAMA)

un ensayo clínico en fase 2 en el que se emplea un anticuerpo monoclonal anti-FXIa, el osocimab, en la prevención de ETEV en pacientes que se someten a una artroplastia de rodilla. En ambos estudios se demostró las ventajas de emplear un agente anti-FXI sobre la terapia antitrombótica estándar (HBPM a dosis profilácticas) (338,354). El más reciente, publicado en la revista *Blood* en junio de 2021, compara el efecto del AB023, un anticuerpo único que se une al FXI e inhibe su activación por el FXIIa pero no por la trombina, frente a placebo en 24 pacientes con enfermedad renal crónica terminal sometidos a hemodiálisis sin heparina (353). El AB023 redujo la coagulación del dializador y los complejos trombina-antitrombina en comparación con placebo durante la diálisis sin heparina (353).

El estudio publicado en *NEJM* es un ensayo clínico aleatorizado (NCT01713361) en el que se compara una terapia profiláctica antitrombótica estándar (HBPM, enoxaparina) con dos dosis (200 y 300 mg) de un ASO anti-FXI, IONIS-416858, en pacientes sometidos a una artroplastia de rodilla. Este trabajo demostró que la disminución de los niveles de FXI reduce el riesgo de ETEV con una eficacia superior, en comparación con el tratamiento con enoxaparina, en pacientes sometidos a una artroplastia total de rodilla.

En este estudio el objetivo principal para valorar la eficacia terapéutica fue el desarrollo de ETEV, que incluía la TVP asintomática, la TVP sintomática, el EP y la muerte relacionada con ETEV. Por otro lado, para determinar la seguridad del fármaco se evaluó la aparición de sangrado, contabilizando los eventos hemorrágicos graves y los clínicamente relevantes. La aparición de ETEV y/o mortalidad relacionada con ETEV, ocurrió en 36 de 134 (27%) y en 3 de 71 (4%) de los pacientes que recibieron las dosis de 200 y 300 mg de IONIS-416858, respectivamente; en comparación con 21 de 69 (30%) de los pacientes que recibieron enoxaparina. El régimen de 200 mg de IONIS-416858 no fue inferior y el régimen de 300 mg fue superior a la enoxaparina ($p < 0,001$).

En cuanto a las tasas de sangrado fueron del 3% en ambos grupos que recibieron el ASO, y del 8% en el grupo de enoxaparina; diferencias que no fueron estadísticamente significativas. Por lo tanto, en este estudio se demostró que disminuir los niveles de FXI reduce el riesgo de ETEV postoperatoria en un mayor porcentaje que con enoxaparina, sin aumentar el riesgo de hemorragia.

Los resultados a favor de la terapia alternativa a la heparina fueron determinantes. Con estos datos, la inhibición del FXI a través de la terapia antisentido podría posicionarse como una prometedora, nueva y eficaz alternativa en el tratamiento y prevención de eventos trombóticos, así como en el manejo de trombofilias congénitas; con un perfil de seguridad y especificidad mejorado con respecto a los tratamientos actuales (337,338,340,349).

En el estudio publicado en *JAMA* se evaluó la eficacia del Osocimab en la prevención de eventos tromboembólicos en pacientes que se van a someter a una artroplastia de rodilla, en comparación con la terapia estándar con enoxaparina; estudio FOXTROT (NCT03276143) (348)

El Osocimab es un anticuerpo de inmunoglobulina G1 monoclonal completamente humano que se une junto al sitio activo del factor XIa y evita que este active al FIX. En el estudio de Weitz, las dosis de Osocimab de 0,6 mg/kg, 1,2 mg/kg y 1,8 mg/kg, administradas en el postoperatorio, cumplieron los criterios de no inferioridad en comparación con enoxaparina, y la dosis preoperatoria de 1,8 mg/kg de Osocimab cumplió criterios de superioridad en comparación con enoxaparina en cuanto a la incidencia de eventos tromboembólicos venosos entre los primeros 10-13 días del postoperatorio.

La tasa de eventos adversos graves con Osocimab fue similar a la de enoxaparina y apixaban, y ninguna de las reacciones relacionadas con la infusión con Osocimab requirió su interrupción o suspensión (348).

Si los fármacos inhibidores del FXI/FXIa demuestran una mayor seguridad en el contexto de la enfermedad tromboembólica en comparación con los tratamientos actuales, tendrían el potencial de transformar el paradigma del

tratamiento antitrombótico. Estos fármacos serían útiles en un espectro de indicaciones clínicas más amplio, especialmente para el tratamiento de enfermedades de difícil manejo con los tratamientos vigentes, como el SAF, debido al riesgo de sangrado y de recurrencias tromboticas asociado a la terapia estándar y fármacos actuales.

4. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

4. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

A pesar de las herramientas de las que disponemos para evaluar el riesgo trombótico en pacientes con aFL, definir el perfil de riesgo trombótico de estos pacientes, y realizar la predicción de un primer evento clínico o de una recurrencia trombótica, continúa siendo el talón de Aquiles en el manejo clínico de los pacientes con aFL positivos.

Actualmente, en la mayoría de los pacientes con SAF el tratamiento recomendado es la ACO indefinida con AVK (1,138,139), lo que se asocia a un gran aumento del riesgo hemorrágico y un detrimento de la calidad de vida de los pacientes. Tampoco está bien definida la tromboprofilaxis primaria en pacientes portadores asintomáticos de aFL, que se establece en algunos casos, en función del riesgo trombótico estimado, precisamente por las posibles complicaciones asociadas

Todo ello, convierte a la estratificación del riesgo trombótico en portadores asintomáticos de aFL, y del riesgo de recurrencia trombótica en el caso de pacientes con SAF, en un objetivo de gran importancia para el clínico.

La identificación de nuevos biomarcadores o factores que estén implicados en la patogénesis del SAF, y actúen como predictores del riesgo trombótico tendría importantes implicaciones: 1) Supondría un avance en el conocimiento de esta enfermedad; 2) Sería una ayuda eficaz en el diagnóstico y pronóstico de estos pacientes, lo que permitiría ajustar con mayor precisión el manejo clínico de estos casos; 3) Y por último, identificaría una posible diana terapéutica para fármacos con un perfil de seguridad y especificidad mejorado con respecto a los empleados actualmente en el tratamiento del SAF.

El papel que los niveles elevados de FXI tienen en el incremento del riesgo trombótico, la protección antitrombótica de la deficiencia de FXI, con escasos o nulos efectos adversos hemorrágicos, y la relación que existe entre el FXI y los aFL, justifican el estudio de los niveles de FXI en el contexto de aFL positivos;

por sus potenciales implicaciones clínicas y fisiopatológicas. Creemos que este marcador podría ser una importante herramienta para la determinación del riesgo trombótico en pacientes con aFL, y mejorar el manejo diagnóstico y terapéutico de los eventos tromboembólicos tanto en portadores asintomáticos como en los pacientes con SAF.

5. HIPÓTESIS

5. HIPÓTESIS

El FXI de la coagulación tiene una posición privilegiada en el complejo proceso de la formación del trombo. Fisiológicamente, el FXI interviene en la amplificación de la generación de trombina. Patológicamente, niveles elevados en sangre de este factor se han relacionado con un mayor riesgo trombótico. Por otro lado, niveles de FXI por debajo del umbral de la normalidad (FXI:C <70%), aunque incrementan el riesgo hemorrágico, han demostrado conferir una potente protección antitrombótica.

El FXI es una proteína que se une a fosfolípidos e interacciona con la β 2GP1. Se ha sugerido que podrían existir anticuerpos anti-FXI en pacientes con LES y otras enfermedades autoinmunes sistémicas, como el SAF.

Todos estos datos nos llevaron a pensar que el FXI podría ser una diana de los aFL y que la determinación de los niveles plasmáticos de FXI en estos pacientes pudiera ofrecer información de utilidad clínica tanto para el diagnóstico, como sobre todo en la determinación del pronóstico de estos pacientes. Creemos que nuestro trabajo también podría abrir nuevas perspectivas terapéuticas para estos pacientes.

6. OBJETIVOS

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO PRINCIPAL

Identificar elementos implicados en el riesgo trombótico en pacientes con aFL positivos, especialmente evaluando el papel del FXI de la coagulación, definiendo su importancia en el diagnóstico, pronóstico y manejo de estos pacientes.

6.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Describir las características funcionales, biológicas y moleculares de los casos con deficiencia de FXI. Relacionar los niveles de FXI con el perfil de aFL, tipo y titulación, así como analizar su asociación con la clínica.
- Analizar los casos con niveles elevados de FXI y su relación con el perfil de aFL, tipo y titulación, así como analizar su asociación con la clínica.
- Analizar la influencia del perfil de aFL en la aparición de eventos trombóticos.
- Estudiar posibles variables demográficas, clínicas y analíticas asociadas con la incidencia de eventos trombóticos en pacientes con SAF.
- Identificar subgrupos de pacientes con mayor riesgo de trombosis en función de perfil de anticuerpos, nivel de factor XI y factores de riesgo cardiovascular.
- Estudiar la posible interferencia de la deficiencia de FXI en las pruebas coagulométricas para la determinación del anticoagulante lúpico.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Diseñamos un estudio multicéntrico, transversal y descriptivo, con componente analítico, de una base de datos prospectiva.

7.2. POBLACIÓN DEL ESTUDIO

Este estudio se ha llevado a cabo en la Región de Murcia, y en el que se ha incluido a la población perteneciente a dos áreas sanitarias: 1. El área VI de salud, con 265.842 habitantes, y cuyo centro hospitalario de referencia es el Hospital General Universitario José María Morales Meseguer (HGUMM); 2. El área VII de salud, con 199.499 habitantes, que tiene como centro hospitalario de referencia el Hospital General Universitario Reina Sofía (HGURS) (355).

7.3. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El tratamiento y manejo de los pacientes fue el requerido por la clínica presentada y en base a los objetivos del estudio. Todos los procedimientos que se llevaron a cabo están de acuerdo con las normas éticas de la declaración de Helsinki y fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética del HGUMM.

Todos los participantes dieron su consentimiento informado para participar en el estudio, guardando siempre las garantías de confidencialidad en los términos establecidos por la Ley de Investigación Biomédica (Ley 14/2007, del 3 de Julio).

El proyecto fue aprobado por la Comisión de Evaluación de Trabajos de Investigación (CETI) del HGUMM, código CETI-25/19. de acuerdo con la declaración de Helsinki - Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos de la Asociación Médica Mundial (AMM), adoptada por la 64ª Asamblea General, celebrada en Fortaleza, Brasil, en octubre del 2013.

7.4. SUJETOS DEL ESTUDIO

7.4.1. Pacientes con anticuerpos antifosfolípidos

La población diana del estudio fueron pacientes de ambos sexos, mayores de 18 años, con determinaciones de aFL positivas; tanto pacientes sin antecedentes de eventos tromboembólicos ni de morbilidad obstétrica, como pacientes con diagnóstico de SAFp, trombótico y/u obstétrico.

La selección de estos pacientes se realizó revisando las bases de datos hospitalarias del servicio de Análisis Clínicos, el servicio de Hematología y el servicio de Documentación Hospitalaria, del HGUMM, desde 1995 a junio del 2019. Los casos positivos que cumplieran con los criterios para poder ser incluidos en el estudio se contactaron por vía telefónica.

También se incluyeron en este proyecto, de manera sistemática y consecutiva, todos los pacientes que acudieron a la consulta de la Unidad de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas del Servicio de Medicina Interna del HGUMM, desde enero de 2014 a junio de 2019, que cumplieran, al menos, criterios analíticos de SAF (1) y no presentaban ninguno de los criterios de exclusión establecidos (ver más adelante).

Todos los pacientes que aceptaron participar en el estudio se citaron en la consulta de Medicina Interna del HGUMM. Después de proporcionar información adecuada y comprensible a cada paciente sobre el estudio, y una vez firmado el consentimiento informado, se realizó una entrevista clínica en la que se cumplimentó un formulario específico para la recogida de variables sociodemográficas y antropométricas, relacionadas con factores de riesgo cardiovascular, y otras variables clínicas de interés. En esta entrevista clínica también se realizó la extracción de la muestra de sangre para el estudio analítico.

7.4.1.1. Criterios de inclusión

Sujetos mayores de 18 años, portadores de aFL y/o diagnosticados de SAF primario, trombótico y/u obstétrico, según los criterios de Sídney 2006 (1); que dieron su consentimiento firmado para la realización de una entrevista clínica, una exploración física y un análisis de sangre.

7.4.1.2. Criterios de exclusión

Se excluyeron todos los casos de SAFs, es decir, aquellos pacientes con antecedente conocido de alguna conectivopatía y/o enfermedad autoinmune sistémica además del SAF. También se excluyeron los participantes que presentaron con anterioridad y/o en la analítica realizada en el momento de la inclusión en el estudio un nivel de anticuerpos antinucleares (ANA) \geq a 1/160 y/o alguno de los anticuerpos contra antígenos extraíbles del núcleo (ENA) positivos.

El seguimiento prospectivo de los pacientes, por vía telefónica y/o través de la historia clínica electrónica, se ha realizado desde enero 2014 hasta junio 2019.

Los datos obtenidos fueron incorporados a una base de datos del *software* estadístico SPSS para su posterior análisis, habiendo identificado previamente a cada paciente mediante un código alfanumérico para asegurar el anonimato de los datos.

7.4.2. Estudios familiares

A todos los pacientes de nuestra cohorte que presentaron déficit de FXI de la coagulación se les realizó un estudio molecular del gen *F11*.

En dos de los pacientes con déficit de FXI, uno de ellos un portador asintomático de aFL y otro un paciente diagnosticado de SAFt, se detectó una mutación característica de la población judía de origen Askenazí: c.403G>T; p.Glu135Ter, no descrita previamente en nuestra población.

El estudio de esta mutación y su posible repercusión diagnóstica se evaluó mediante estudios familiares. Para ello, se reclutaron los familiares de primer grado disponibles de ambos pacientes tras su consentimiento informado. A los familiares que aceptaron participar en el estudio se les realizó una entrevista clínica y una extracción de sangre para estudios posteriores.

7.4.3. Cohorte de pacientes con déficit congénito

Al hallar tres casos de déficit congénito de FXI en nuestra cohorte de pacientes con aFL positivos y deficiencia de FXI, nos planteamos una posible interacción entre los niveles de FXI y la determinación de aFL.

Para estudiar esta posible relación analizamos la presencia de AL en 40 pacientes con déficit congénito de FXI procedentes de una cohorte de 200 pacientes con este desorden, caracterizados clínica, bioquímica y molecularmente (294), y los casos con déficit congénito de FXI caracterizados en este estudio. Los 40 pacientes seleccionados presentaban distintos tipos de mutaciones en el gen *F11*, con distinto grado y tipo de deficiencia de FXI: heterocigotos y homocigotos; pacientes con déficit de FXI leve, moderado o grave; así como pacientes con deficiencia CRM+ y CRM-.

7.5. TOMA DE MUESTRAS

La extracción de sangre se realizó, previa asepsia del área a pinchar, mediante punción de la vena antecubital, empleando una palomilla de seguridad premontada y sellada a portatubos BD Vacutainer® de un solo uso, para extracción por vacío 21G 3/4" y tubular de 18 cm; siguiendo los protocolos establecidos en nuestro hospital.

Se recogieron 1 tubo de suero, 1 anticoagulado con EDTA y 4 tubos anticoagulados con citrato sódico. Los tubos fueron centrifugados inmediatamente (menos de 2 horas desde su extracción) a 2200xg, 20 min, se separó el plasma y la capa leucocitaria. El plasma se sometió a una segunda

centrifugación con las mismas condiciones, y se repartió en alícuotas que fueron almacenadas a -80°C (356). La capa leucocitaria también se almacenó a -80°C .

EL ADN se purificó de las células presentes en la capa leucocitaria y se utilizó para realizar el estudio genético del FXI. El plasma se empleó para estudiar el FXI y los aFL.

Los estudios se han llevado a cabo en el Laboratorio de Coagulación del HGUMM y en el Centro Regional de Hemodonación (CRH) de la Región de Murcia. Las muestras se almacenarán en ambos laboratorios el período de tiempo necesario hasta dar por finalizado este estudio.

7.6. VARIABLES DEL ESTUDIO

7.6.1. Variables principales o dependientes

7.6.1.1. Anticuerpos antifosfolípidos (aFL)

Para la determinación de los aFL se consideraron los criterios analíticos, diagnósticos de SAF, establecidos en Sídney 2006 (1).

7.6.1.1.1. Anticoagulante Lúpico (AL)

El concepto de AL designa a un grupo heterogéneo de anticuerpos dirigidos contra fosfolípidos de carga negativa o contra complejos formados entre fosfolípidos y proteínas, como la $\beta 2\text{GP1}$, o factores de coagulación, como la protrombina. Estos anticuerpos interfieren con las pruebas de coagulación en las que participan los fosfolípidos, tales como el TTPa, el test del VVRd y el SCT.

La heterogeneidad entre anticuerpos, la variabilidad que existe entre reactivos e instrumentos empleados en su determinación y la falta de un “gold standard” en el proceso, dificultan las estrategias diagnósticas. La ISTH actualizó sus guías para la determinación del AL en 2009 (184); posteriormente lo hizo la Sociedad Británica de Hematología (SBH), en el año 2012 (185); y en el año

2014, *the Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) publicó su primera guía para el diagnóstico del AL (195)

Las tres entidades coinciden en los siguientes puntos clave:

- Debe emplearse una muestra de plasma citratado con una doble centrifugación para conseguir un número de plaquetas $<10 \times 10^9$ /L.
- Deben realizarse las pruebas de tiempo de protrombina (TP), TTPa y tiempo de trombina (TT) para detectar algún tratamiento anticoagulante u otras coagulopatías existentes.
- Debe llevarse a cabo más de un test en la determinación del AL.
- Debe realizarse un test confirmatorio que demuestre la dependencia de fosfolípidos de los anticuerpos presentes.
- Los puntos de corte deben establecerse en cada laboratorio de manera local.
- Debe repetirse la determinación a las 12 semanas, y al final del ensayo debe ponerse un comentario sobre la interpretación de los resultados, sobre si el AL es positivo o negativo.

En nuestro estudio, seguimos las recomendaciones de las distintas sociedades para medir la actividad del AL, realizando el test de *screening* y el test de confirmación mediante dos técnicas diferentes, ya que ninguna prueba tiene suficiente sensibilidad ni especificidad de manera aislada (5,7,8,9): I. SCT; II. El test del VVRd.

I. *Silica Clotting Time* (SCT)

Para la realización del SCT empleamos una muestra de plasma citratado y el kit comercial: “*Silica Clotting Time HemosIL*® (0020004800)”, siguiendo las instrucciones del fabricante en un analizador automático. Esta prueba consta de un test de *screening* (SCT *Screen*) y un test de confirmación (SCT *Confirm*). Ambos reactivos son sensibles a anticuerpos dependientes de fosfolípidos.

El SCT *Screen* tiene una concentración baja en fosfolípidos por lo que el reactivo es altamente sensible a la presencia de AL, alargando el tiempo de

coagulación en presencia de éste. Una alta concentración de fosfolípidos en el SCT *Confirm* neutraliza el AL y acorta los tiempos de coagulación.

– *Cálculo de ratios:*

Para calcular las *Ratios* del SCT *Screen* y del SCT *Confirm* se aconseja:

- Determinar el Rango de Normalidad para cada instrumento y para cada lote específico de SCT *Screen* y SCT *Confirm*, según el documento C28, Vol. 28, No. 3 del CLSI (357).
- Calcular la Media de cada Rango de Normalidad en segundos.
- La media de cada Rango de Normalidad se usará como denominador común para el cálculo de las *Ratios*.

Debido a las variables que pueden afectar a los tiempos de coagulación, cada laboratorio debe verificar su propio rango de normalidad.

$$\text{Ratio SCT Screen} = \text{resultado del paciente (segundos)} / \text{Media del Rango de Normalidad (segundos)}$$

$$\text{Ratio SCT Confirm} = \text{resultado del paciente (segundos)} / \text{Media del Rango de Normalidad (segundos)}$$

$$\text{Ratio Normalizada SCT: Ratio SCT Screen} / \text{Ratio SCT Confirm}$$

II. Test del Veneno de la Víbora de Russell diluido (VVRd)

VVRd HemosIL®

Al igual que ocurre con el SCT, el reactivo VVRd *Screen* es pobre en fosfolípidos, lo que lo hace sensible al AL; y la cantidad adicional de fosfolípidos presentes en VVRd *Confirm* neutraliza al AL, dando tiempos de coagulación más cortos.

Los test VVRd *Screen* y VVRd *Confirm* no se ven afectados por alteraciones en los factores de la vía de contacto, deficiencia o inhibidores de los factores VII, VIII y IX (184).

El procedimiento de recolección y preparación de muestras, y el cálculo de ratios, es similar con ambas técnicas (SCT y VVRd) (Ver apartado: “I. *Silica Clotting Time* (SCT)”))

Según las pautas indicadas por la ISTH (184), la expresión e interpretación de los resultados debe realizarse empleando la ratio de AL normalizada entre el test de *screening* y el test de confirmación, para cada uno de los test realizados:

$$\text{Ratio VVRd Normalizada} = (\text{Ratio VVRd Screen} / \text{Ratio VVRd Confirm})$$

$$\text{Ratio SCT Normalizada} = (\text{Ratio SCT Screen} / \text{Ratio SCT Confirm})$$

– Resultados:

Cuando ambos test, VVRd HemosIL® *Screen/Confirm* y SCT HemosIL® *Screen/Confirm*, son positivos, se cumpliría con los requisitos de Test Integrado, definido en las recomendaciones para la detección de AL (184).

Con los datos de nuestro laboratorio se considera un resultado positivo para la presencia de AL una *Ratio Normalizada* (RN) $\geq 1,20$, para ambos métodos.

$$\text{Ratio Normalizada} = (\text{Ratio Screen} / \text{Ratio Confirm}) \geq 1,20, \text{ POSITIVO}$$

La actividad del AL se dividió en tres categorías de intensidad según la RN:

1. Positivo leve: cuando la RN se encontraba entre 1,20 - 1,59.
2. Positivo moderado: cuando la RN se encontraba entre 1,60 - 1,99.
3. Positivo alto: cuando la RN era $\geq 2,00$.

III. Test de Mezclas

La mayor discrepancia entre las distintas guías para la determinación del AL es el orden en el que realizar los distintos ensayos durante el procedimiento (test de *screening*, test confirmatorio y test de mezclas); sobre todo en relación al test de mezclas.

La tendencia actual es realizar en primer lugar los test de *screening* y confirmatorio, y el test de mezclas sólo en casos seleccionados (195). Detractores del test de mezclas alegan que este procedimiento introduce un factor de dilución que puede generar resultados falsos negativos, sobre todo en aquellos casos con anticuerpos débiles, por lo que hacerlo de rutina, puede reducir las tasas de detección de AL clínicamente relevante (195,358,359).

En nuestro laboratorio, siguiendo el esquema más actual, realizamos el test de mezclas sólo en aquellos casos que presentan tiempos muy prolongados con ambos test, *screening* y confirmatorio, que pudieran dar lugar a una ratio normal con AL potente, y por tanto un falso negativo. También hacemos el test

de mezclas de manera individualizada, estudiando cada paciente, por ejemplo, en los casos de discrepancias entre el test de *screening* y confirmatorio.

En el test de mezclas se combinan, en una proporción 1:1, plasma del paciente con plasma control normal (plasma con aproximadamente el 100% de actividad de todos los factores de coagulación y una mínima cifra residual de plaquetas ($<10^7$ /ml)), y se repite la determinación del TTPa en la mezcla de los dos plasmas. Si los tiempos de coagulación no se corrigen y continúan prolongados, se demuestra la presencia de un inhibidor.

7.6.1.1.2. Anticuerpos anticardiolipina (aCL) y anticuerpos anti β 2GP1 (a β 2GP1)

I. Anticuerpos Anticardiolipina (aCL)

Para realizar una medición semicuantitativa de aCL empleamos los inmunoensayos quimioluminiscentes de micropartículas o CIA (del acrónimo en inglés *chemiluminescence immuniassay*) QUANTA Flash[®] aCL (IgG e IgM) en un equipo BIO-FLASH[®], un analizador quimioluminiscente de acceso aleatorio, de respuesta rápida y totalmente automatizado (Biokit S.A., Barcelona, España), siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial. Los resultados se expresan en unidades quimioluminiscentes (CU).

– Principios del procedimiento:

El ensayo QUANTA Flash[®] consta de partículas magnéticas recubiertas con cardiolipina y β 2GP1 humana que captura, si existen, los anticuerpos aCL de la muestra.

Después de la incubación de las partículas con la muestra, la separación magnética y una fase de lavado, se añade un anticuerpo anti-IgM o anti-IgG humana, dependiendo del isotipo que estemos analizando, marcado con isoluminol. Este se une a una inmunoglobulina aCL capturada en las partículas. Tras una segunda incubación, separación magnética y fase de lavado, se añaden

los reactivos que inician la reacción luminiscente y se mide la luz emitida como unidades relativas de luz (URL), mediante el sistema óptico del BIO-FLASH®. Las URL son directamente proporcionales a la concentración de aCL en la muestra.

Los resultados de aCL se expresan en CU. Las características analíticas de los ensayos, incluido el punto de corte, las unidades de medida y el rango de medición analítica (RMA) se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6. Características analíticas de los ensayos de aCL utilizados en este estudio.

Ensayo	Antígeno	Unidades	RMA	Punto de corte
QF aCL IgG	Cardiolipina y β 2GP1	CU	2.6–2024 CU	≥ 20 CU Positive
QF aCL IgM	Cardiolipina y β 2GP1	CU	1.0–774 CU	≥ 20 CU Positive

QF: QUANTA Flash; CU: unidades quimioluminiscentes; RMA: rango de medición analítica

– *Puntos de corte:*

Consideramos como valores clínicamente relevantes o patológicos en relación con el SAF, los puntos de corte establecidos, y validados en el estudio de Lakos y colaboradores (360). En este artículo se comparó este inmunoensayo quimioluminiscente (QUANTA Flash®) con el ELISA, la prueba considerada como estándar para la determinación de los aCL. En su trabajo analizaron un total de 288 muestras de distintos pacientes, entre los que incluían paciente con SAF primario (n= 70), SAF secundario (n= 42), pacientes con sospecha de SAF (n= 36), pacientes con LES sin SAF (n= 96) y pacientes con otras enfermedades del tejido conectivo (n= 44). Todas las muestras fueron analizadas para detectar anticuerpos aCL (IgM e IgG). El punto de corte considerado como bajo/medio

del ensayo QUANTA Flash® aCL para los isotipos IgG e IgM se estableció en 95 y 31 CU, respectivamente. Estos valores son equivalentes a 40 unidades GPL y MPL.

La concordancia entre los resultados del ensayo de quimioluminiscencia y el ELISA mejoró sustancialmente cuando se utilizó el umbral del nivel de anticuerpos determinado en el estudio de Lakos (360) en comparación con el resultado obtenido empleando el punto de corte establecido por el fabricante del test; el coeficiente kappa de Cohen aumentó de 0.85 a 0.91 para aCL IgG, y de 0.59 a 0,75 para el isotipo IgM (360). En nuestro estudio empleamos los valores de 95 CU para el isotipo IgG y 31 CU para el isotipo IgM, como puntos de corte para considerar patogénicos y/o clínicamente relevantes los niveles de aCL IgG e IgM, respectivamente.

II. Anticuerpos anti β 2GP1 (a β 2GP1)

Para la determinación de los a β 2GP1 (IgM e IgG) empleamos un inmunoensayo quimioluminiscente totalmente automatizado, que lleva a cabo una determinación semicuantitativa de a β 2GP1 en suero y plasma citratado, empleando el sistema *HemosIL ACL AcuStar*®.

– Principios del procedimiento:

El ensayo *HemosIL ACL AcuStar*® es un inmunoensayo quimioluminiscente de dos pasos constituido por partículas magnéticas recubiertas con β 2GP1 humana purificada que capturan los a β 2GP1, si estos están presentes en la muestra.

Tras un proceso de incubación, separación magnética y lavado, se añade un trazador que está formado por un anticuerpo anti-IgM o anti-IgG humana marcado con isoluminol, el cual se une a las a β 2GP1 IgM o IgG, respectivamente, capturadas en las micropartículas.

Después de un segundo proceso de incubación, separación magnética y lavado, se añaden los reactivos que inician la reacción luminiscente y la luz

emitida se mide con el sistema óptico del *ACL AcuStar*[®] en URL. Las URL son directamente proporcionales a la concentración de a β 2GP1 que contiene la muestra.

Para la realización de este inmunoensayo en nuestro laboratorio se siguió el protocolo establecido por la casa comercial durante todo el procedimiento.

– *Puntos de corte:*

Los resultados de los a β 2GP1 se expresan en U/mL. El rango de normalidad se estableció con muestras de plasma citratado de donantes de sangres adultos y sanos, mediante varios lotes de reactivos y calibradores *AcuStar a β 2GP1*. De acuerdo con las recomendaciones del Comité Internacional de Sídney (1), el valor umbral para clasificar una muestra como positiva de anticuerpos a β 2GP1 se estableció en el percentil 99, que corresponde en nuestra población y con los reactivos usados en 20 U/mL.

Las características analíticas de los ensayos, incluido el punto de corte, las unidades de medida y el rango de medición analítica (RMA) se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7. Características analíticas de los ensayos de a β 2GP1 utilizados en este estudio.

Ensayo	Antígeno	RMA	Punto de corte
AA a β 2GP1 IgG	β 2GP1	6,4 - 6100 U/mL	\geq 20 U/mL Positivo
AA a β 2GP1 IgM	β 2GP1	1,1 - 841 U/mL	\geq 20 U/mL Positivo

AA: ACL AcuStar; U/mL: unidades por mililitro; RMA: rango de medición analítica

7.6.1.2. Factor XI de la coagulación (FXI)

Para el análisis del FXI hemos estudiado el TTPa; se han realizado pruebas coagulométricas para determinar la actividad coagulante del FXI en plasma (FXI:C); hemos evaluado el FXI plasmático por Western Blot; y llevamos a cabo el análisis molecular del gen *F11* en casos seleccionados.

7.6.1.2.1. Tiempo de Tromboplastina Parcial activado (TTPa)

La determinación del TTPa se realiza en muestras de plasma citratado, empleando un coagulómetro automático de la familia ACL (Instrumentation Laboratory), empleando diferentes agentes activadores de la ruta de contacto de la misma casa comercial: SynthASil[®] (Ref. 0020006300) que utiliza sílica como agente activador de la vía de contacto sílica; o SynthAFax[®] (Ref. 0020007400) que emplea ácido elágico como agente activador de la ruta de contacto.

Los resultados de las determinaciones del TTPa se expresaron de manera absoluta (en segundos), y como *ratio* (es decir, el resultado del TTPa del plasma del paciente con respecto a un plasma de referencia obtenido a partir de plasma de individuos sanos)

7.6.1.2.2. Actividad coagulante del FXI (FXI:C)

Para la determinación cuantitativa de la actividad coagulométrica dependiente del FXI (FXI:C) se usa plasma citratado del paciente, diluido en plasma deficiente de FXI empleando el kit *Factor XI deficient plasma HemosIL[®]* (Ref. 0020011300) y los mismos agentes activadores de la ruta de contacto indicados para el TTPa (SynthASil[®] y SynthAFax[®]). La reacción se realizó en el mismo coagulómetro automático ACL, de *Instrumentation Laboratory*, un coagulómetro automático ubicado en el HGUMM.

Determinamos que un paciente tenía niveles patogénicos de FXI o deficiencia de factor, cuando presentaban un valor de FXI:C >150% o FXI:C <70%, respectivamente, con ambos reactivos.

7.6.1.2.3. Análisis del FXI en plasma

El análisis de los niveles antigénicos de FXI plasmático y de las características electroforéticas se realizó mediante Western Blot.

Para llevar a cabo la separación electroforética se empleó un gel de acrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS), en condiciones no reductoras con la finalidad de detectar el dímero de FXI circulante en plasma (361). Posteriormente, después de la transferencia a una membrana de fluoruro de polivinilideno, el FXI se identificó empleando un anticuerpo policlonal anti-FXI humano de origen caprino (*Enzyme Research Laboratories*) que detecta una banda de 160 kDa, correspondiente al homodímero del FXI: dos moléculas de 80 kDa unidas por puentes disulfuro.

Con el fin de dotar de especificidad a la interacción antígeno-anticuerpo, empleamos una solución de bloqueo PBS Tween 1x suplementada con 5% de leche desnatada en polvo. Después de 3 lavados de membrana, se incubó con un anticuerpo anti-IgG de cabra generado en ratón y acoplado a peroxidasa (A9452, *Sigma-Aldrich*). Tras un segundo proceso de lavado, la señal del anticuerpo secundario se detectó mediante quimioluminiscencia (ECL; *GE Healthcare Amersham TM*) en un equipo *ImageQuant LAS4000mini* (*Exon Biotec, GE Healthcare*).

7.6.1.2.4. Análisis molecular del gen *F11*

7.6.1.2.4.1. Amplificación de fragmentos del gen *F11*

En aquellos pacientes que presentaron deficiencia de FXI, antigénico y/o coagulométrico procedimos a un estudio molecular del gen codificante, gen *F11*.

Este proceso se inició con la amplificación de los 15 exones y sus zonas flanqueantes del gen *F11* mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para este procedimiento empleamos los cebadores que se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Lista de cebadores utilizados para la amplificación del gen *F11* que codifica el FXI.

EXÓN	SECUENCIA OLIGONUCLEÓTIDOS (5'-3')	TH (°C)	TAMAÑO (pb)
1	F: CTTGGCCTTAGGAGGAATCCT	58	824
	R: GACACTGTTACTCTTCTGTTGTTCCA		
2	F: CCCCTCTCTCCCTATTTCTTGTA	58	302
	R: TTTGAAAACCTCTGGAGCCTCA		
3	F: AACATAACGCATGCCATGTAC	50	225
	R: GTCTCCTCGATGTAGAAACAT		
4	F: GTTGACACATTCTGTTTGTTCCT	58	391
	R: GATATGTGTACATCACAGCTGGT		
5	F: GGTACTCATGTCTTCTGCTT	52	240
	R: TCACGATTCTGTTTTTCATCG		
6	F: GCAGTTGGAAGAATAAGACAC	48	185
	R: GAATTACATCATCAAGAAGTGC		
7	F: AGTCCCTGACATAGTTCTTC	46	228
	R: GAAGATAACAAATTATCCTTACT		
8-9-10	F: TGAGCTGACTTTACTTTCTCTAGGTGC	60	751
	R: CCCTTCTGTGGCTATAACTGACAGT		
11	F: AAGATGTAGGAAGCTGCTCATC	55	208
	R: ATGAACTAATAAAAACAGCCGTG		
12	F: GTCCATCATTGGCAGAAAATATTAGT	58	406
	R: CCCTTTCATGATGATAACGCA		
13	F: CGTCTCATATTTAAACCACGA	55	159
	R: GGAGCACATATAACAACATCA		
14	F: TATGGTTATTCTACAAACGAAC	52	220
	R: CAATTTGCATATATTCCATTGG		
15	F: GAAGCGTCTGAGTTGATCTG	52	257
	R: AGCAAATCCTGGGTCCTTCA		

F: secuencia directa (forward); R: secuencia inversa (reverse), TH: temperatura de hibridación.

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con *GelRed*[®] (1:20000) (*Biotium, Fremont, CA*) en tampón TAE (TRIS base 0.04 M, ácido acético 0.04M, EDTA 0.001M, pH 8) durante aproximadamente 20 minutos a 60V.

Los amplicones obtenidos se purificaron con el sistema *ExoSAP-IT* de *Affymetrix* para su secuenciación empleando uno de los cebadores de la PCR.

7.6.1.2.4.2. Reacción de secuenciación

La reacción de secuenciación se llevó a cabo empleando el kit *Big Dye Terminator v 3.0*; *Applied Biosystems, Foster City, CA*. Se le adicionó 1 µl de oligonucleótido iniciador de la secuencia y 2µl de la mezcla *Big Dyes* a 2µl de PCR purificada. Este procedimiento se realizó en un termociclador, durante 25 ciclos en las condiciones que figuran en la Tabla 9.

Tabla 9. Características del procedimiento de la reacción de secuenciación.

Etapas	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	96°C	10 segundos
Hibridación	50°C	5 segundos
Extensión	60°C	4 minutos

Después de la reacción de secuenciación, el producto que se obtuvo se purificó con el kit *Performa DTR* (Dye Terminator Removal) *Gel Filtration Cartridges*, y se desnaturalizó añadiendo 10 µl de formamida. Los fragmentos de secuenciación se analizaron mediante electroforesis capilar en el equipo *Hitachi 3130xl Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*).

El Sistema *Applied Biosystems 3130* es un analizador genético de ADN mediante electroforesis capilar, totalmente automático, que permite secuenciar

150 muestras al día en condiciones de máximo rendimiento. Este equipo consta de un detector de distintas emisiones de fluorescencia con capacidad de detección de hasta 5 fluorocromos simultáneamente. Utiliza la técnica de marcaje del DNA con múltiples fluorocromos y es capaz de realizar secuenciación de ADN, análisis de fragmentos y genotipado, empleando los programas de *Applied Biosystems: sequencing Analysis™* y *GeneMapper™*, e incorporar adicionalmente el programa *SeqScape™* de identificación y detección de mutaciones puntuales.

Una vez que las muestras son incorporadas en los capilares rellenos de polímero, se separan en fragmentos de distintos tamaños mediante la aplicación de alto voltaje. Durante el procedimiento de separación, antes de alcanzar el polo positivo, estos fragmentos son alcanzados por un láser que excita los fluoróforos incorporados en cada dideoxinucleótido, más conocido como el método Sanger, y la fluorescencia emitida es detectada por un dispositivo óptico. Mediante un programa informático esta información se convierte en datos digitales y estos datos se visualizan como imágenes mediante el programa *SeqScape™*.

7.6.1.2.4.3. Herramientas de análisis

A parte de los programas empleados para el diseño de cebadores (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>), en este estudio hemos utilizado unas herramientas de análisis de secuencia adicionales.

Por un lado, las secuencias ALU, se han buscado en el gen *F11* mediante el software *Repeat Masker* (<http://www.repeatmasker.org/>). Se trata de un programa que analiza secuencias de ADN buscando repeticiones intercaladas y secuencias de ADN de baja complejidad.

También hemos utilizamos el software *Human Splicing Finder* (<http://umd.be/HSF3/>) para la búsqueda de secuencias,ceptoras y donadoras, que pudieran estar implicadas en el procesamiento de intrones.

7.6.1.2.4.4. Secuenciación del gen *F11* por NGS

Para este trabajo hemos amplificado el gen *F11* en su totalidad (30019 pb), empleando 93 amplicones (Tabla 10) que se secuenciaron en un equipo PGM (*Ion Torrent, Life Technologies*).

Tabla 10. Cebadores utilizados para la generación de los 93 amplicones que cubren el gen *F11*.

Amplicón	Cebador F	Cebador R	Tamaño (pb)
1	CTTGCAGTTGGAAGAATAAGACACTTTTC	GGTATCCTGAGTGAGATCTACTGTAATCAT	233
2	ATTGGAATGCTTAATGCGTTGGG	CTGCTTTTAAAAATGCATTAAGCGGC	374
3	AGGTGCATTATGTTTATACCGTTTTGTTC	GCTTGAGTGACAGGAGTAAAATAATAGAA	301
4	TTGTATAGCTAACAGGCTAACAGAAACA	CCTATTCACTCTGGCAGTGTCT	352
5	TGTCTCTTAAAAACATCTGAGAGTGGAT	CAAGAAATCAGTGTCATGGTAAAATGAAGA	244
6	TGTCACCACATAGCTTTCAATCTGT	TGCTCAATAAATATTTCCATGGCCAGA	373
7	CTGCCTATGTGAACACATTTCTTTTGT	TCACAGCAGCAGCTTGTCTTAG	352
8	CATATGCCTGCCTTCCAAAGGA	TACATGACTTGACAGGGCAGAAAAG	158
9	AGGTCAGCTAGAATTAATGGTTAACAGC	GCTGCAATCTTAATAAGGGTGCTTTT	373
10	AGTAAACATGTGAGTGTAGGTATCTTTGTG	GCTCTTTCTGTTCTGGTTCAATATTTT	223
11	TGTCTGATTTAGCTTTGTAGAGATGTTCC	GATACATTAATCGATTGTCTTGGTCACCTA	256
12	GGCTTCTGCAGAGCTGTAAGAG	GGCATAAATGGTGTGGGATTCTC	365
13	ATCTTGATTTGCCTCACTAATTAGTTGGT	GCTATTTTCTAAAGGAATGCTTCAGCTTT	299
14	CAGCTCATAATTTCAATTTCTCTGTGACA	GCAAATTGTTGTATACTGTGTTGTTTCG	307
15	AGCCAATCCCTCATAGATATCAAGGAAT	CCTTAAAATTTGTTGAGCCTGTTTCAGA	126
16	CAACTTAAGTGCTAAGAAATTAGAAGGCA	GGTGTCAAGATTACCCTGACCTTATAAAAT	134
17	GAAAAGCAGGAACTCACACAGATATA	GTCTTGATGAAATTGACTACCTAAGTACC	295
18	GTTGCACAGCAATGTAAATACCCTTAG	TCCAGTCAAGAGTAAATGAAAATAATGGG	350
19	CGTCAATATACAACAGCAAGCACTT	TCAATATGCCACTAGATGGGAGGAT	370
20	CGCATGTGCATGAGAGAGA	TGTTCTATATTAATAATGCGGAGTGGGC	343
21	CCACCTGAGGCTGTTCAATCAATA	GTCTCCTCGATGTAGAAACATAAGCATTTA	370
22	AAACATTTACACTTTGCTTTTCTATCGAT	GGATAGTGCATGCTGAAGTATTAGGG	287
23	CTTACCAAGAGTCACTCACTGCAT	CCTGCTCTAGGTTCTGGAATAGTAAATTTT	215
24	CCCTCCAACACTGTAAAAACCT	GAAAATGAACAAATTAGCTGGGAATGTTG	291
25	GCCAGTCGAAATCTTTATTAACGT	GGCAATGACCTAAGCAACTGTC	337
26	CATTGAGTGGTCGATGAAAAACAG	AAGGGCACTGACAATCATACCAAT	293
27	AAGTCATTAAGTAAGAAGGACTTAGCC	TGACTTCTCAAGCCCTTCTATTTTT	351
28	TCAGAAACAGCATGGAAAATTTCTTTGATT	GGAATAGCAAGCTGGGCATAGT	374
29	TAAGTCAGCTTTAAAACCTGGCTTGTA	CTCTCATCTCCACTCTGGTCCAATA	358
30	TGACACATTTATACACCTGGCATTCT	GGTCTCATTAGGAAATGCCAGTTGT	365
31	GTTACAATAAAAAATCCAACCAGCAGTGT	GCAGATAATCTGACACAGAATGTTTTGTG	346
32	TCGGCACCATTCTGTTGCTTT	ACGCAGCTATTCCCTTTACATTAG	372
33	CCTTTATGACGCTTCCCACCTT	AGGATGAGAGAAGGAGTTCGGAA	177
34	AATTTCAAGACCCACACAGATGTT	CITGTTGACAGTTTGGGATTCTCTG	374
35	GCTGGAGTTTCTCATTCACTGGA	CCTGAGTTACAGAGACTTTATAATCAAGCT	280
36	CTCCATCATTGGAACCAAGTGGAT	TATGCTCTGCAGGGAATAACATGAAG	329
37	CGGTGTGTGTTAAATACAGAAAGTGG	ACCTAAGTAAGGAATCCAATGTGAGGA	374
38	GAGTTCCTGTTACCTGTACAT	CATTGTGAAGTGTGTGGCTGTTAATT	359
39	GAATTTTATCCGAAAGTGTCTCCAATG	ATCCAACACTTTGATCCTGCA	368
40	AGCACTTTTCAAGTAAATGTTCTAGCCT	GGTGGTGGTTGGGTACCTATAATC	372
41	CCCTCTGCTGCAAAACACAAT	TGCTCAAAACAACTACAACGATCATAGAA	352
42	CTCATGTAAAAAGTCTTATCCTGCTCCAT	TGCTTTCTGTTCACTCCTCTTTGT	316

43	CCGTCGCGCAGCTTGATTA	AAAAAGAGTCCTCGGTAATGTTGG	367
44	TGGGCTTTCAGTGTAGCCAAATA	CTAAATAAAGTGTACACAGGCACAGAGA	140
45	AGTCAAATTCAGAAGAGAGGTTTATGTGG	CTGCACCCAGCCAGTTTTATTTAAT	367
46	TAAATAAAAATAAAAATTCACCTCCAGCTG	TTGCTCTATTGTCAGTCTTCTAGTATCT	373
47	ATATATGTGGCCAGCACCAC	TCGTTGTAGAATAACCATACACAATACACATA	373
48	ATGTTTATGTGTATTGTGTATGGTTATTCTACA	CCCAACGCATTAAGCATTCCA	256
49	AAAAATGAGAAGGGCTTGAGAAGTCA	TGTGCTTCAGTAGACAAATGTTACTGAATA	299
50	GCTGATGGAGATAGGGAGCATG	AAAAATCACACTTGATGAATTGTATAGTTGTT	333
51	CTGGGAGTGTTGAAAGGAAGGAA	AGAAAGAGCTTTGCTCTTTTTAATGCG	374
52	GAAAACAAATGTCACAAGTTGTTATGTC	TTCTGAAAATCTGCCATTAATGCAATCAA	372
53	TCACAAAAGAACAAACTACTGTGGGATCT	CCATGTAGCCATCTTGAGTGTACA	253
54	CTACATTCACAGGCATTTATGTAGCAC	GGACCTGTTGGTAAAATGCAACC	268
55	TCATTAGAGGAGGATGAAGACCAT	GTTGTCCACATTTCTCTCAGATTAGTTA	277
56	GCAGTCTGTTAATGCTTACTGGAGAT	GAGCATTCTTAGTGTGACTGTGT	368
57	AGAGGGAAATCACACTGCAATCTC	GTGTGTATGTTCCATTGAACTGACTG	315
58	AGGTATTGTTTAGTTCATGACCATTCTT	TGTAGTTATTGGGTCCAGTGTCAAAT	367
59	GTTCCACATCCATGGATTTAAACAACAT	TTCCATGTGCATGTATAAAGGACCTAAAT	346
60	GTATTTATAATCACCGTGAATGGGAGCTA	GTGTGCTTCCATTTAATTAATTTCTGCGA	359
61	ACACATATTTGAGAGGTCAACATAACCC	GTTAGTGTGAATAATGCTGCTATGAGATG	374
62	CTTCCCAAGGGATTGAGAATAGGA	AGTGTGAGTAAAACTAGTTCATCTGCTTT	299
63	ACAGCCTCAACAGGTAATTTTTCAA	TACTAGCTGGGCATGGTTGTTTC	353
64	GGGTGAGGATGTGTGTTATCACA	TGAATTTGGAAATCAAGGCAATAAACAAT	355
65	GCGGAATCACCATCTGAGGATC	AGAAGTCCAGTTTGTGAGAAGCA	372
66	ACCACAAAACCGCAATGTTTG	GGTGGACTGTTAAAATGTTTTAAACCTGA	291
67	AAAAACAGGTTTACTTGTGCTGAA	GGGAAGTGAGGTAGTAAGATATGCTTTCT	343
68	TCCCAGCCTAAAATCTTAAATGAAAGTCT	CACCTCAACCTTTATATTTGCTCCTTTCAA	370
69	AGGTGGGTGAAAAAGTTGAAAGGAT	GCATAAAGTTGATGGCAAAGCTTTTTAGT	344
70	CGCTACACTTTTAAATGGCACTTTTG	TCTGTTGATTCCAGATAAATGCAGTTTACT	374
71	TCATGACAACATAAAGACAATTCAGTCCA	AGGGACAGCAACCTTAGCTAGT	279
72	ACTATGCCAGCTTGCTATTCC	TGAGGGCTCTGAGAGTTCCAAT	127
73	GGGATACCATTTAGTGAACATAATCGACA	AGTATCAGCTGTATATTGGTGACACCTA	366
74	AGAAGGGAGAACATTGAGGAAATAACAA	TCTACAACAAATTAGCCGAGTGTGT	374
75	ACACTCCTGTTATCAAGGCCAGTA	TGACTATGCTCAGAAATGGCCA	342
76	GAAGTAACAATCCTGCCTCGTGAT	GCTAAGTGTCCCTTCTAACGCTT	359
77	TAAGTGGTTTTACTGCGCTGTATTTGAT	ATTCATTTTGGAGGGCCATCTATTCT	366
78	CGTTCTCACCTCAGTTGCTGTTAG	CCTGTGTAGCTTTCAAATGCAGAT	374
79	CCTGAGTCAAAGTCCTGAAAAGT	CGTGTAGAAAATGCACATTCTTCAGC	331
80	AGTCAATTCATTTTTATGTGCATGT	GGTACTGACCCATAGAAACAGTGAG	358
81	CTTCCCATTAAACCGCATTACACA	GTGCTACAGGCACACAAAACCCAT	354
82	ATAAAATACAGAACGAGTTCGGTATGCA	TGACAGAAACTAGGCTTTCTGCTAC	318
83	TACCTAAATGTCCATCATTGGCAGAAA	GGCCGTAAGTCTAGTAGTGTAAACATTTT	373
84	GGGATGAAGGATTGAAGGTTAGAACAAT	CAGTCACCCAGCAATCAGTGTATATT	358
85	TGTTGTTATATGTGCTCCATCCTAGAAATG	CTAACTGGAATGACTTCCCAAGAAAGT	303
86	GCCGCTTAATGCATTTTAAAAAGC	GCTCGTGATGCCTACCAGAT	309
87	GCGTTTTAACATTGGATTTTAACTTCTGC	GCGCCTGGCTAAGTCCTTC	287
88	TCGACTCTTGATGATGTAATTCACCAT	CTGTCTGCAAACACCGTATTAGG	369
89	ATGGGACACCACGCCAGTAAT	TGAGGCAGGAGAAATTATCTAATGGGA	315

90	CAACTCTCTGAGTCTCCAATAGCTT	GGTACATAGCCAAAGGAAAAGAAAGAAA	366
91	TTTATTAATAAATAAATAAACTGGCTGGGTGCA	CACTTGAATGTGGCTAACACAGC	370
92	CTGACATGTGGTCTGCTGTCTAG	GTTTGAAGAAAGCTTTAAGTAACACTTGC	304
93	AGACATGAGTTTTGTGTTGTTGTTGTTT	GTGGTGCTGGGCCACATATA	347

pb: pares de bases

7.6.1.2.4.5. Genotipado de variaciones genéticas de *F11*

Las alteraciones genéticas indicadas en la Tabla 11 se genotiparon empleando sondas *Taqman*[®] (*Applied-Biosystem, Life Technologies*) o sondas de diseño propio (*Sigma-Aldrich, St Louis, MO*) en un equipo de PCR en tiempo real (RT-PCR) (*LightCycler*[®] 480, *Roche*). El reactivo empleado para el genotipado fue *Premix Ex Taq TM (Probe qPCR)* de *Takara Bio inc.*

Tabla 11. Variaciones genéticas de *F11* genotipadas mediante RT-PCR.

Alteración genética	Gen	Sonda
c.166 T>C (p.C56R) rs121965069	<i>F11</i>	Taqman: C_27531184_10
c.1613 C>T (p.P538L) rs139695003	<i>F11</i>	Taqman: C_170166878_10
c.1247G>A (p.C416Y)	<i>F11</i>	5′[6FAM]GACACCTG <u>T</u> GTGGAGGCT[BHQ1]3′ 5′[HEX]GACACCTGT <u>A</u> TGGAGGCT[BHQ1]3
c.-4 C>T: rs1801020	<i>F12</i>	Taqman: C_1989313_20
c.1601G>A: rs6025	<i>F5</i>	Taqman C_11975250_10
c.*97G>A: rs1799963	<i>F2</i>	Taqman C_876802_20

Por otra parte, el genotipado de la mutación p.Glu135Ter en los miembros de las dos familias analizadas se realizó mediante análisis del patrón de restricción de la PCR del exón 5 (2 microlitros) empleando la enzima

Hpy188III (*New England Biolabs*) 1 U, durante 12 horas a 37°C, y analizando los fragmentos de restricción en geles de agarosa al 1% con GelRed® (*Biogen Científica*) para visualizar los fragmentos de ADN.

7.6.1.2.4.6. Análisis de grandes deleciones y/o inserciones en el gen *F11* mediante “Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification” (MLPA)

En los casos en los que no detectamos ninguna alteración genética en los exones y/o regiones flanqueantes del gen *F11* empleando la secuenciación de Sanger o NGS, realizamos *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification* (MLPA), metodología empleada para evaluar grandes alteraciones genéticas. Para este procedimiento empleamos el kit *Salsa MLPA P440 F10+F11 probemix* (*MRC Holland, Amsterdam, Netherlands*). Este test evalúa conjuntamente todos los exones de estos dos genes. Para llevar a cabo el análisis de los datos obtenidos mediante MLPA empleamos el sistema *Coffalyser.Net*.

7.6.2. Variables generales o independientes

En el diseño de este estudio se incluyeron las siguientes variables independientes.

7.6.2.1. Variables clínicas generales

- Variables demográficas: sexo (mujer y hombre) y fecha de nacimiento.
- Variables antropométricas: talla (cm), peso (Kg) e índice de masa corporal (IMC) (kg/m^2).
- Presión arterial sistólica (mmHg), presión arterial diastólica (mmHg).
- Factores de riesgo cardiovascular: hipertensión arterial (HTA), uso de fármacos antihipertensivos, diabetes mellitus (DM), dislipemia (DLP), obesidad (definida como un IMC $>30 \text{ Kg}/\text{m}^2$), tabaquismo (incluimos la condición de tabaquismo activo y exfumador en el momento de la incorporación en el estudio), sedentarismo (consideramos como NO sedentarios los casos que practicaban ejercicio físico aeróbico de intensidad moderada durante un mínimo de 30 minutos, 5 días a la

semana. o de intensidad moderada-alta, como correr, un mínimo de 20 minutos tres días a la semana), SCORE (%).

- Factores asociados con un mayor riesgo trombótico:
- Congénitos: déficit de anticoagulantes naturales (Proteína C, Proteína S y Antitrombina), mutación del Factor V Leiden, mutación G20210A del gen de la protrombina y/o resistencia a la proteína C activada.
- Adquiridos: tratamiento farmacológico con anticonceptivos orales y/o tratamiento hormonal sustitutivo, antecedente de inmovilización prolongada (> de 3 días), traumatismo y/o cirugía en el mes previo al evento trombótico, presencia de neoplasia subyacente, embarazo y/o viaje de más de 4 horas en avión.

Score aGAPSS (146).

- *Escala de riesgo cardiovascular del proyecto Systematic Coronary Risk Estimation (SCORE) (362)*

Se trata de una herramienta para predecir el riesgo de muerte por eventos cardiovasculares en el ámbito de población europea, que estima el riesgo de muerte a 10 años. Esta escala clasifica como bajo riesgo a los pacientes con puntuación menor del 1%; moderado riesgo entre 1-4%; alto riesgo ente 5-9%; y de muy alto riesgo a pacientes por encima del 10%.

En nuestra cohorte, para el cálculo del SCORE, se ha empleado una adaptación para modelos de bajo riesgo cardiovascular (362).

- *Escala de riesgo trombótico en pacientes con SAF: GAPSS ajustado o aGAPSS (144).*

The Global Antiphospholipid Syndrome Score (GAPSS) (144) es uno de los sistemas de puntuación más recientes para cuantificar el riesgo de eventos trombóticos en pacientes con LES y SAF. También ha demostrado ser una herramienta válida en la estratificación del riesgo trombótico en pacientes con

SAFp y en pacientes portadores de aFL con una enfermedad autoinmune sistémica asociada (145,146).

Sin embargo, como el complejo formado por los anticuerpos aPS/PT, una de las variables incluidas en el GAPSS, no se determina de manera rutinaria en la mayoría de los laboratorios clínicos, su inclusión como parte de la puntuación puede suponer un gran inconveniente. Por este motivo se creó el GAPSS ajustado (aGAPSS) (146), en el que se excluye la determinación del complejo aPS/PT, y lo hace ampliamente aplicable en la práctica clínica diaria. En el aGAPSS las variables a puntuar serían: hiperlipidemia (3 puntos), hipertensión arterial (1 punto), aCL IgG/IgM (5 puntos), a β 2GP1 IgG/IgM (4 puntos) y AL (4 puntos). La puntuación que puede obtener un paciente variaría entre de 0 y 17.

Este modelo modificado del GAPSS ha sido validado como escala para estratificar a los pacientes en función de su riesgo trombótico (146,148). Recientemente, en el año 2017, la Dra. Nuria Fernández y su equipo de investigación evaluaron la validez de la escala aGAPSS como herramienta en la predicción de trombosis en pacientes con SAF y/u otra enfermedad autoinmune sistémica, en un estudio de cohortes retrospectivo. En su estudio concluyeron que el aGAPSS, con un punto de corte ≥ 5 , constituía un factor de riesgo independiente para la aparición de evento trombótico (148).

7.6.2.2. Antecedentes en la historia clínica de patología tromboembólica

La revisión de la historia clínica electrónica de cada paciente, incluyendo pruebas de imagen e informes clínicos, junto con la entrevista clínica presencial realizada en el momento de la inclusión en el estudio, permitió evaluar los siguientes datos clínicos en relación con los antecedentes de patología trombótica:

- Tipo del primer evento trombótico (arterial y/o venoso).
- Territorio y localización del primer evento trombótico.
- Fecha de presentación del primer evento trombótico.

- Tipo de tratamiento antitrombótico en el momento del primer evento trombótico.
- Recurrencia trombótica.
- Fecha de presentación de la recurrencia trombótica.
- Tipo de la recurrencia trombótica (venoso y/o arterial).
- Territorio y localización de la recurrencia trombótica.
- Tipo de tratamiento antitrombótico en el momento de la recurrencia trombótica.
- Número de episodios trombóticos.
- Tipo de tratamiento antitrombótico en el momento de inclusión en el estudio.

7.6.2.3. Manifestaciones clínicas “no criterio” de SAF

Mediante revisión de la historia clínica electrónica de cada paciente también evaluamos posibles antecedentes de las denominadas manifestaciones clínicas “no criterio” relacionadas con el SAF, según los criterios de Sídney 2006 (1).

Además, en el formulario empleado durante la entrevista clínica se incluyó información sobre algunas de estas manifestaciones clínicas “no criterio”, consideradas como las más frecuentes en pacientes con aFL positivos:

- Migraña
- Epilepsia/convulsiones/corea
- Lívedo reticularis
- Úlceras vasculares

7.6.2.4. Morbilidad obstétrica

En las mujeres de nuestra cohorte se evaluaron los antecedentes de morbilidad obstétrica relacionada con el SAF, según los criterios de Sídney 2006 (1), descritos en el apartado “**3.1.4 Criterios clasificatorios de Síndrome Antifosfolípido**”.

7.6.2.5. Variables analíticas

- Variables analíticas generales: creatinina (mg/dL), urea (mg/dl), colesterol total (mg/dL), colesterol LDL (mg/dL), colesterol HDL (mg/dL), triglicéridos (mg/dL), HbA1c (%), plaquetas (U/ml), TP (segundos), TT (segundos), TTPa (segundos).
- Anticoagulantes naturales: Proteína C, Proteína S y antitrombina.
- Estados trombofílicos congénitos: mutación del Factor V Leiden, mutación G20210A del gen de la protrombina y/o resistencia a la proteína C activada.
- Perfil de autoinmunidad no AAF: Anticuerpos Anti-nucleares (ANA); Anticuerpos extraíbles del núcleo (ENA) (anticuerpos anti-Smith (antiSm); anticuerpos antirribonucleoproteínas (anti-RNP); anticuerpos anti-Ro60 (SS-A), anticuerpos anti-Ro52/TRIM21, anticuerpos anti-SS-B (La), anticuerpos anti-Scl-70 (topoisomerasa I) y anticuerpos anti-Jo-1)

7.6.2.5.1. Análisis de autoinmunidad no aFL

7.6.2.5.1.1. Anticuerpos Antinucleares (ANA)

Los anticuerpos antinucleares (ANA) son autoanticuerpos que aparecen con elevada frecuencia en pacientes con enfermedades autoinmunes sistémicas y/o del tejido conectivo, y especialmente en el caso del LES. La presencia de ANA puede ser utilizada junto con otros test serológicos y datos clínicos para ayudar en el diagnóstico de LES u otras enfermedades autoinmunes.

La inmunofluorescencia indirecta (IFI) es el método de referencia para los ensayos de ANA. En nuestro estudio, para la determinación de los ANA empleamos el test *Nova Lite® Hep-2 ANA Kits/Substrate Slides* (para diagnóstico *in vitro*). Este test es un ensayo por IFI, que se usa para el cribado y la determinación semicuantitativa de ANA en suero humano.

En la técnica por IFI las muestras de los pacientes se incuban con un substrato de antígenos; después de la incubación, se realiza un lavado para

eliminar los anticuerpos que no han reaccionado. Este sustrato se vuelve a incubar, pero en esta ocasión con un conjugado específico, marcado con fluoresceína, y se realiza un segundo lavado que elimina el reactivo que no se ha enlazado.

El sustrato escogido para el kit *NOVA Lite® HEp-2 ANA* es una línea de células epiteliales humanas (HEp-2) y el conjugado son anticuerpos anti-IgG humana purificados. Cuando se observan a través de un microscopio de fluorescencia, las muestras positivas para autoanticuerpos mostrarán una fluorescencia de color verde manzana en las áreas de la célula o del núcleo donde se ha enlazado el autoanticuerpo.

Durante todo el procedimiento para la realización de esta técnica con el kit *Nova Lite® Hep-2 ANA Kits/Substrate Slides* se siguió el protocolo establecido por la casa comercial.

7.6.2.5.1.2. Anticuerpos contra antígenos extraíbles del núcleo (ENA)

Para el análisis del grupo de anticuerpos contra antígenos extraíbles del núcleo (ENA); del acrónimo en inglés *Extractable Nuclear Antigens*, empleamos el kit *QUANTA Flash® ENA7*. Se trata de un inmunoensayo por quimioluminiscencia empleado en la detección cualitativa en suero humano de autoanticuerpos IgG contra los antígenos Sm, RNP, Ro60 (SS-A), Ro52/TRIM21, SS-B (La), Scl-70 (topoisomerasa I) y Jo-1.

La presencia de estos autoanticuerpos se utiliza como ayuda en el diagnóstico del LES, la esclerosis sistémica (ES), la polimiositis (PM), la dermatomiositis, el síndrome de Sjögren (SS) y la enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC), junto con datos clínicos y otras pruebas de laboratorio.

El kit *QUANTA Flash® ENA7* permite detectar simultáneamente autoanticuerpos contra Sm, RNP, Ro60, Ro52, SS-B, Scl-70 y Jo-1 en un solo pocillo. Las muestras negativas en este análisis es probable que sean negativas para los anticuerpos contra Sm, RNP, Ro60, Ro52, SS-B, Scl-70 y Jo-1. Las

muestras que den positivo deben volver a analizarse mediante otro ensayo específico para los ENA, como un CIA o un ELISA, a fin de confirmar su positividad, establecer la especificidad de los autoanticuerpos y, si se desea, cuantificar los niveles de anticuerpos específicos.

Como reactivos se emplean partículas paramagnéticas recubiertas con Ro60, Scl-70, Jo-1, Ro52 y SS-B (La) recombinantes y Sm y RNP nativos. Para su uso se añade una solución tampón y se coloca en el instrumento *BIO-FLASH*[®]. La luz generada por la reacción se mide como URL mediante el sistema óptico del *BIO-FLASH*[®]. El número de URL es proporcional a la cantidad de anticuerpos anti-ENA unidos a las partículas de ENA7. En función del valor de URL se calculan las CU. La reactividad expresada en CU está relacionada el valor de los autoanticuerpos presentes en la muestra del paciente.

Tabla 12. Características de los ensayos de ENA utilizados en este estudio.

Ensayo	Antígeno	Unidades	RMA	Punto de corte
QF ENA7	Partículas paramagnéticas con ENA 7	CU	3,6 – 429,4	≥20 CU Positivo

QF: QUANTA Flash; ENA: extractable nuclear antigens; CU: unidades quimioluminiscentes; RMA: rango de medición analítica.

En nuestro laboratorio el intervalo de referencia empleado es el indicado por el fabricante. El rango de medición analítica del ensayo va de 3,6 CU a 429,4 CU. Si el resultado de un paciente es inferior a 20 CU, debe notificarse como un resultado negativo. Si el resultado de un paciente es superior a 20 CU, el resultado se considerará positivo.

7.7. SEGUIMIENTO PROSPECTIVO DE LA COHORTE

En enero 2014 se inició la recogida de datos, con la incorporación del mayor grueso de pacientes a la cohorte.

Desde el inicio del estudio hasta junio de 2019 se ha hecho un seguimiento prospectivo, anual, telefónico y a través de la historia clínica electrónica, con el fin de conocer, entre otros datos, la aparición de un posible primer evento trombótico en los pacientes portadores asintomáticos de AAF y en las pacientes con diagnóstico de SAF obstétrico, o de una recurrencia trombótica en los pacientes con diagnóstico de SAF trombótico.

7.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

7.8.1. Análisis estadístico bivariado

Para el análisis de las características basales de nuestra cohorte hemos realizado una descripción de las variables.

En cuanto al estudio de las variables continuas, el primer paso fue comprobar la normalidad de su distribución mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las variables cuantitativas con una distribución normal se presentan como media y desviación estándar, y en el caso de las variables cuantitativas que no sigan una distribución normal, como mediana y rango intercuartílico (P25-P75). En cuanto a las variables cualitativas o categóricas las hemos expresado como frecuencia (n) y tanto por ciento (%).

En el análisis de comparación entre grupos, para establecer posibles asociaciones, hemos empleado diferentes pruebas estadísticas en función del tipo de variables analizadas. Para comparar variables categóricas utilizamos la prueba de la Chi-cuadrado (X^2) y la prueba exacta de Fischer.

Para establecer asociaciones entre las variables cuantitativas o continuas, empleamos la prueba t, el análisis de varianza (ANOVA) o los test no paramétricos de U Mann-Whitney o Kruskal-Wallis, según correspondía en cada

caso. Para el estudio de las asociaciones utilizamos la correlación de Pearson, si la variable era normal, y la correlación de Spearman si no lo era.

7.8.2. Análisis estadístico multivariado

Todas las variables que en el análisis de regresión logística univariante tuvieron una significación estadística como factor de riesgo de evento clínico (trombosis y/o morbilidad obstétrica), se agruparon en diferentes modelos de regresión multivariante para detectar posibles factores de riesgo independientes.

Los resultados se expresaron como *odds ratio* (OR) con un IC del 95% y con un nivel de significancia de 0.05.

7.8.3. Antiphospholipid Syndrome-FXI score (APS-FXI Score)

Teniendo como referencia el gran trabajo de Sciascia y su equipo de investigación (144) nos planteamos crear una escala o *score* como herramienta que ayudara al clínico en la difícil tarea de diferenciar a los pacientes con mayor riesgo de sufrir un evento clínico (trombótico y/u obstétrico), en un grupo de pacientes con aFL positivos; incluyendo como novedad una variable que hasta ahora no se ha relacionado con los aFL ni con el SAF como posible elemento implicado en su patogénesis, el FXI de la coagulación.

Se ha demostrado a través numerosos trabajos y artículos que el FXI influye de manera decisiva en la patología tromboembólica, venosa y arterial. Y que, además, este factor puede adquirir diferentes roles, protrombótico y protector frente a la trombosis, según su actividad coagulante en plasma.

Realizamos una regresión logística univariante de todas las variables clínicamente relevantes, y con las que resultaron ser estadísticamente significativas construimos un modelo de regresión logística multivariante. A cada variable del modelo, le asignamos un valor de riesgo proporcional a su coeficiente en el modelo de regresión. Este valor lo calculamos dividiendo el coeficiente de la variable en cuestión entre el menor coeficiente del modelo.

Una vez desarrollado el *score*, al que hemos denominado *Antiphospholipid Syndrome-FXI (APS-FXI)* realizamos una curva ROC para calcular el mejor punto de corte, y determinamos la capacidad discriminativa del APS-FXI midiendo el área bajo la curva ROC (AUC, del acrónimo en inglés *area under curve*).

8. RESULTADOS

8. RESULTADOS

8.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y ANALÍTICAS GENERALES DE PACIENTES Y CONTROLES

La tabla 13 recoge las características demográficas, clínicas y analíticas de los sujetos incluidos en este estudio:

- 1. Grupo SAF.** Grupo constituido por 112 pacientes diagnosticados de SAFp; SAF trombótico (SAFt) (N= 105) o SAF obstétrico (SAFo) (N= 7), clasificados según los criterios de Sídney 2006 (1). Un 16,7% (9/54) de las mujeres con diagnóstico de SAFp presentaron comorbilidad obstétrica. La edad media de este grupo fue de 51,3 años con una desviación estándar (DE) de 12,8 años.
- 2. Grupo AAF.** En este grupo se clasificaron los pacientes que eran portadores asintomáticos de aFL; pacientes que cumplían criterios analíticos de SAF sin antecedentes de evento trombótico, ni comorbilidad obstétrica. Se incluyeron un total de 82 pacientes con una edad media similar a la del grupo SAF (50,2±15,1 años).
- 3. Grupo TROMBÓTICOS (TROM).** En este grupo se incluyeron aquellos pacientes que tenían antecedentes de al menos un evento tromboembólico (arterial y/o venoso) y que no cumplían criterios analíticos de SAF. Estaba formado por un total de 79 pacientes con una edad media de 51,9±13,2 años.
- 4. Grupo SANOS (SAN).** Este grupo estaba constituido por sujetos sanos que no cumplían criterios clínicos ni analíticos de SAF, no tenían antecedentes de eventos tromboembólicos ni de comorbilidad obstétrica y tampoco eran portadores de aFL. Se incluyeron un total de 74

participantes con una edad media similar a la de los pacientes (51,4±11,5 años).

La edad media del total de nuestra muestra fue de 51,2±13,2 años, con un rango de edad comprendido entre 21 y 84 años. La proporción de mujeres fue de 50,3%. El grupo AAF presentó un mayor porcentaje de mujeres en comparación con el resto de los grupos del estudio (65,9%) (grupo TROM 43%, $p=0,004$; grupo SAN 44,6%, $p=0,008$; grupo SAF 48,2%, $p=0,015$).

La prevalencia de enfermedad renal crónica en nuestra muestra fue del 1,1%, con una creatinina media de 0,82 mg/dl. Un 2,3% de los pacientes del estudio presentó plaquetopenia (plaquetas < 100000 U/ μ L). La plaquetopenia fue mayoritaria en el grupo AAF (4,9%), sin diferencias significativas entre grupos.

8.1.1. Perfil de riesgo cardiovascular de nuestra muestra

En relación con el perfil de riesgo cardiovascular, un 92,8% de toda la muestra del estudio presentaba al menos un factor de riesgo cardiovascular (FRCV), siendo el más prevalente la DLP, descrita en un 60,2% de la población. La prevalencia del resto de FRCV clásicos en la muestra fue: tabaquismo 56,2%, sedentarismo 51,9%, HTA 38,3%, obesidad 29,7% y DM 12,1% (Tabla 13).

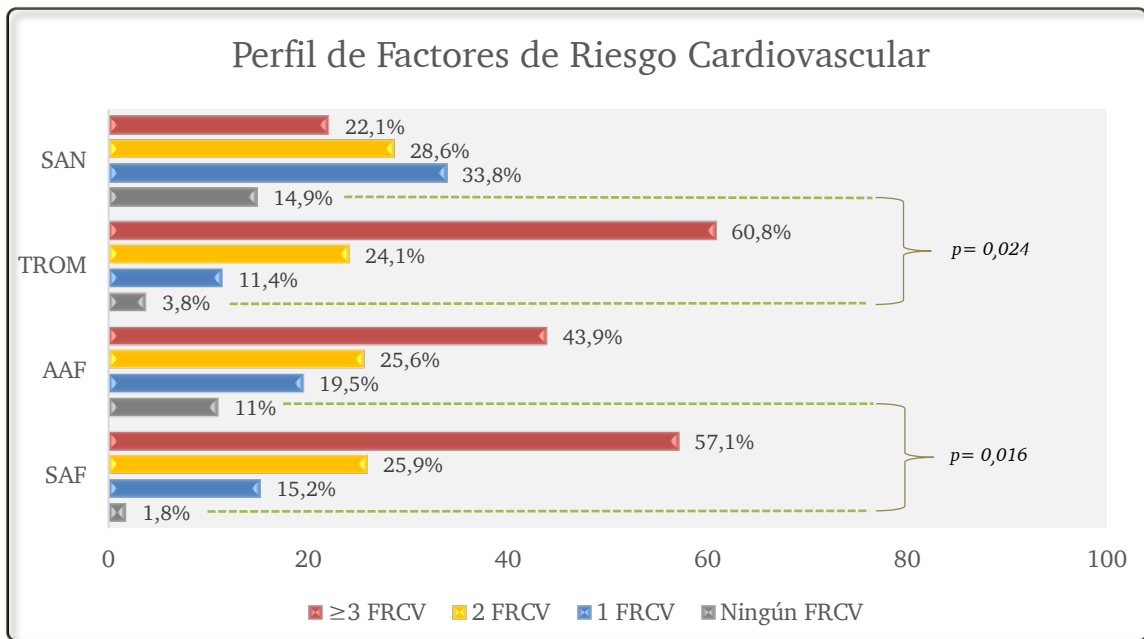
El grupo de SAF y el grupo TROM presentaron un mayor porcentaje de pacientes con ≥ 3 FRCV (Figura 8). En el grupo AAF y el grupo SAN, la proporción de pacientes sin ningún FRCV fue significativamente mayor con respecto a los grupos de pacientes con trombosis previa ($p < 0,05$) (Figura 8).

Analizando de manera individualizada cada FRCV, la prevalencia de HTA, DLP y obesidad fue significativamente mayor en el grupo SAF y el grupo TROM, en comparación con los pacientes sin antecedentes de eventos trombóticos ($p < 0,05$).

Tabla 13. Características clínicas y analíticas de los grupos que forman nuestra cohorte.

	Total (n:347)	SAF (n:112)	AAF (n:82)	TROM (n:79)	SAN (n:74)
Sexo - n (%)					
Hombre	174 (49,7)	58 (51,8)	28 (34,1)	45 (57)	41 (55,4)
Mujer	176 (50,3)	54 (48,2)	54 (65,9)	34 (43)	34 (44,6)
Edad (años)- M (DE)	51,2 (13,4)	51,3 (12,8)	50,2 (15,1)	51,9 (13,2)	51,4 (11,5)
FRCV - n (%)					
Hipertensión arterial	133 (38,3)	50 (44,6)	25 (30,5)	38 (48)	20 (27,0)
Dislipemia	209 (60,2)	84 (75)	43 (52,4)	58 (73,4)	24 (32,4)
Diabetes Mellitus	42 (12,1)	11 (9,8)	9 (11)	18 (22,8)	4 (5,4)
IMC > 30 Kg/m ²	103 (29,7)	43 (38,4)	17 (20,7)	32 (40,5)	11 (14,9)
Tabaquismo	195 (56,2)	66 (58,9)	44 (53,7)	46 (58,2)	39 (52,7)
Sedentarismo	180 (51,9)	57 (50,9)	49 (59,8)	45 (57)	29 (39,2)
Algún FRCV	322 (92,8)	110 (98,2)	73 (89)	76 (96,2)	63 (85,1)
1 FRCV	67 (19,3)	17 (15,2)	16 (19,5)	9 (11,4)	25 (33,8)
2 FRCV	90 (25,9)	29 (25,9)	21 (25,6)	19 (24,1)	21 (28,4)
3 o más FRCV	165 (47,6)	64(57,1)	36 (43,9)	48 (60,8)	17 (23,0)
Creatinina (mg/dl) - M (DE)	0,81 (0,3)	0,89 (0,4)	0,75 (0,2)	0,79 (0,2)	0,81 (0,3)
Enfermedad renal crónica - n (%)	4 (1,2)	3 (2,7)	0 (0)	1 (1,3)	1 (1,4)
Plaquetopenia - n (%)	8 (2,3)	2 (1,8)	4 (4,9)	1 (1,3)	1 (1,4)
Hipotiroidismo - n (%)	32 (9,2)	11 (9,8)	12 (14,6)	4 (5,1)	5 (6,8)
Trombofilia congénita - n (%)					
Déficit de Antitrombina	3 (1,9)	2 (2,3)	1 (1,4)	NR	NR
Déficit de Proteína C	2 (1,3)	1 (1,1)	1 (1,4)	NR	NR
Déficit de Proteína S	3 (1,9)	1 (1,1)	2 (2,8)	NR	NR
Resistencia a la PCA	5 (3,2)	2 (2,3)	3 (4,2)	NR	NR
FV Leiden	4 (2,5)	4 (4,6)	0 (0)	NR	NR

M, media. DE, desviación estándar. IMC, índice de masa corporal. FRCV, factor de riesgo cardiovascular. PCA, proteína C activada. FV, factor V de la coagulación. NR, no realizado.



FRCV, factor de riesgo cardiovascular.

Figura 8. Perfil de riesgo cardiovascular en los grupos de nuestra cohorte.

8.2. DESCRIPCIÓN Y ANÁLISIS DE EVENTOS TROMBÓTICOS EN NUESTRA POBLACIÓN

La trombosis venosa fue la localización más frecuente del primer evento trombótico de nuestros pacientes. En el grupo SAF, la primera trombosis ocurrió en lecho vascular venoso en un 73,3% de los casos, y en el grupo TROM en un 63,3% (Tabla 14).

La trombosis venosa con mayor frecuencia en ambos grupos fue la TVP, con un 49,5% de todas las trombosis venosas en el grupo SAF, y un 43% en el grupo TROM (Tabla 14). En el caso de las trombosis arteriales la localización más frecuente fue el SNC, ictus de origen no cardioembólico, con un 19% de las trombosis arteriales en el grupo SAF y un 24,1% en el grupo TROM (Tabla 14).

La media de tiempo, medido en años, hasta la aparición del primer evento trombótico, fue significativamente menor en el grupo SAF en comparación con el grupo TROM, 43,2 años y 47 años, respectivamente ($p = 0,039$) (Tabla 14).

Mediante análisis de supervivencia con el método de Kaplan-Meier, analizamos el tiempo libre de trombosis en el grupo SAF y el grupo TROM; entendiendo como tiempo libre de trombosis, el tiempo transcurrido desde la fecha de nacimiento hasta la fecha de diagnóstico del primer evento tromboembólico. En el análisis de supervivencia encontramos una diferencia significativa entre ambas curvas, con un valor de $p < 0,05$ del estadístico Log Rank (Mantel-Cox) (Figura 9).

8.2.1. Recurrencia trombótica

Un 30,4% de nuestros pacientes con antecedentes de eventos trombóticos presentaron, al menos, un episodio de recurrencia trombótica (Tabla 14). No hallamos diferencias estadísticamente significativas en el número de recurrencias trombóticas, ni en el tipo de la trombosis (arterial o venosa), entre el grupo SAF y el grupo TROM (Tabla 14).

El territorio del primer evento trombótico (arterial o venoso) no se relacionó de manera significativa con una mayor o menor proporción de recurrencias trombóticas.

Como se ha descrito en otros estudios, en nuestra población la mayoría de las recurrencias trombóticas se produjeron sobre el mismo lecho vascular que el primer evento trombótico (130,131).

En el grupo SAF, el 100% de las recurrencias trombóticas en los pacientes con un primer evento trombótico arterial se produjeron sobre territorio arterial; y en los pacientes con un primer evento trombótico venoso, el 86,2% de las recurrencias se produjeron sobre lecho vascular venoso ($p < 0,001$) (Figura 10).

En el grupo TROM, los pacientes con una primera trombosis arterial que presentaron una recurrencia trombótica, en el 75% de los casos fue sobre lecho vascular arterial; en los pacientes de este grupo con un primer evento trombótico en territorio venoso, la recurrencia trombótica fue en territorio venoso en el 90,9% de los casos ($p < 0,05$) (Figura 11).

Tabla 14. Descripción y análisis de eventos trombóticos en los grupos que presentaban esta clínica.

	Total n:184	SAFt n:105	TROM n:79	P
Tipo de primera trombosis - n (%)				0,145
Arterial	57 (31,0)	28 (26,7)	29 (36,7)	
Ictus no cardioembólico	39 (21,2)	20 (19,0)	19 (24,1)	
IAM	16 (8,7)	7 (6,7)	9 (11,4)	
Venosa	127 (69,0)	77 (73,3)	50 (63,3)	
TVP	86 (46,7)	52 (49,5)	34 (43,0)	
TEP	34 (18,5)	19 (18,1)	15 (19,0)	
Recurrencia trombótica - n (%)	56 (30,4)	37 (35,2)	19 (24,1)	0,103
Tipo de recurrencia trombótica - n (%)				0,741
Arterial	19 (33,3)	12 (32,4)	7 (36,8)	
Ictus no cardioembólico	7 (12,5)	4 (10,8)	3 (15,8)	
IAM	8 (14,3)	5 (13,5)	3 (15,8)	
Venosa	38 (66,7)	25 (67,6)	12 (63,2)	
TVP	27(48,2)	20 (54,1)	7 (36,8)	
TEP	10 (17,9)	5 (13,5)	5 (26,3)	
Tiempo (años) hasta la primera trombosis - Me (RIC)	45 (19,0)	43,2 (13,4)	47 (21)	0,039

Tiempo (años) entre la 1ª trombosis y la determinación de FXI - Me (RIC)	4 (6)	5 (9)	3 (3)
--	-------	-------	-------

SAFt, grupo de pacientes diagnosticados de Síndrome Antifosfolípido trombótico. M, media. DE, desviación estándar. Me, mediana. RIC, rango intercuartílico. IAM, infarto agudo de miocardio. TVP, trombosis venosa profunda. TEP, tromboembolismo pulmonar. FXI, factor XI de la coagulación.

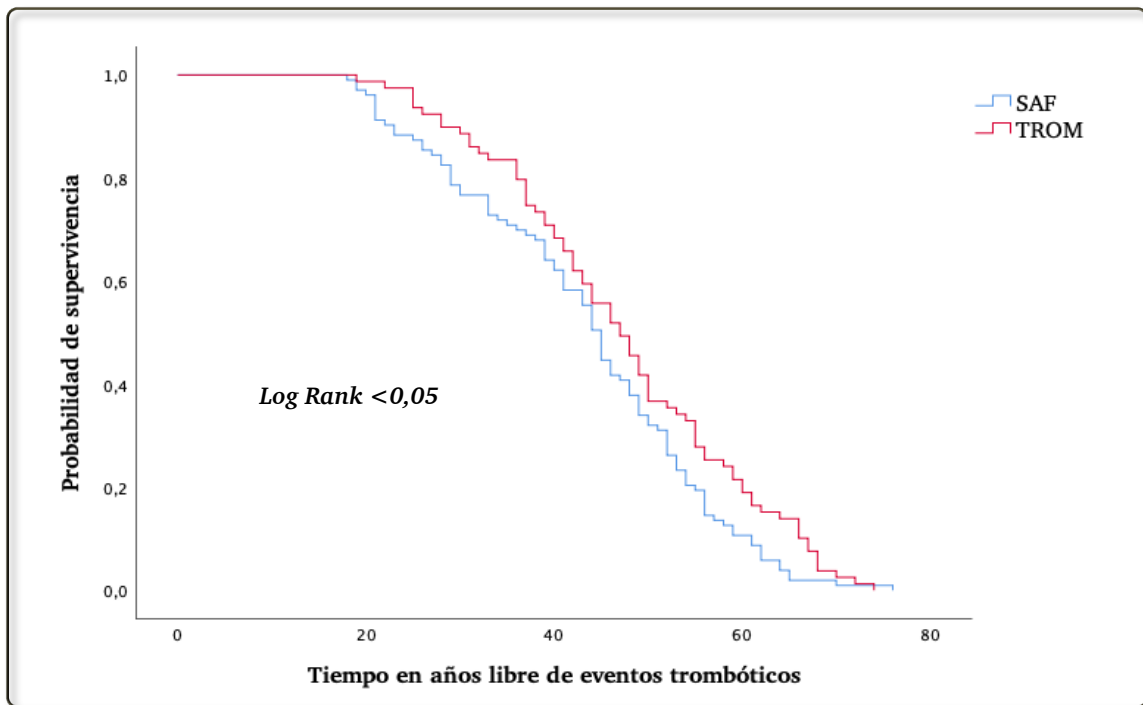


Figura 9. Supervivencia en años libre de trombosis hasta la aparición del primer evento trombótico.

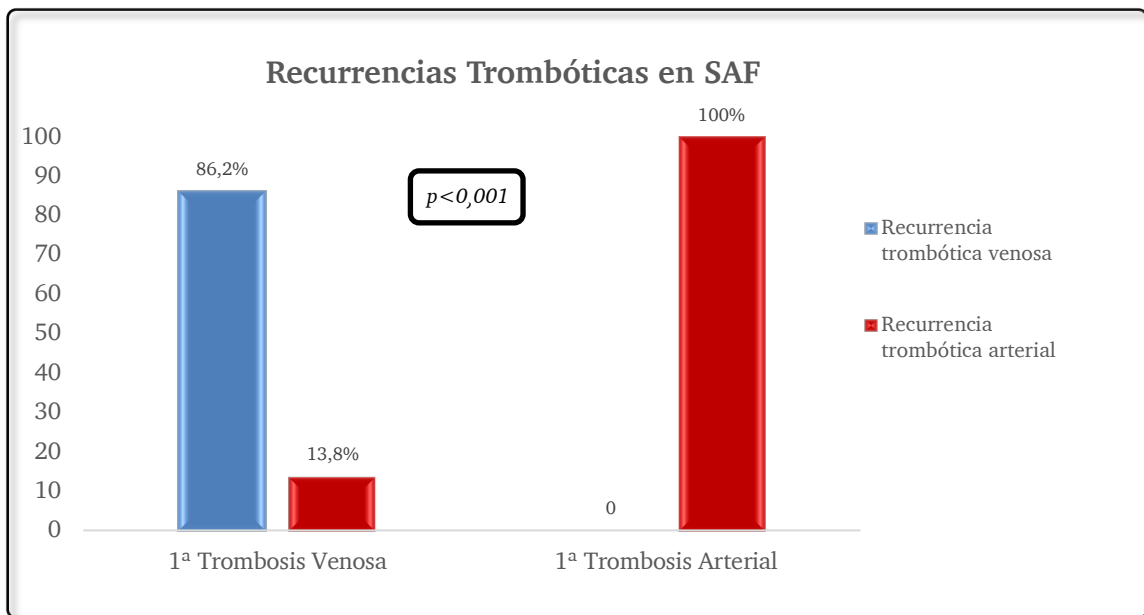


Figura 10. Tipo de recurrencia trombótica (arterial o venosa) en grupo SAF según el lecho vascular del primer evento trombótico.

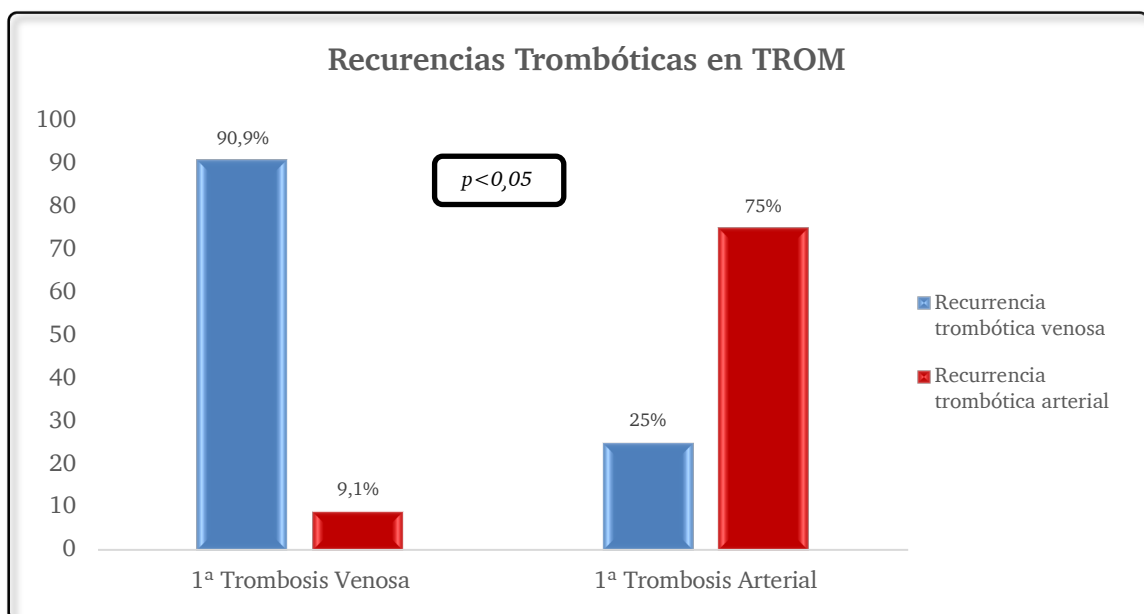


Figura 11. Tipo de recurrencia trombótica (arterial o venosa) en grupo TROM según el lecho vascular del primer evento trombótico.

8.3. ANÁLISIS DEL PERFIL DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN PACIENTES CON ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS POSITIVOS

En el grupo SAF la proporción de hombres fue mayor que en el grupo AAF, 51,8% Vs 34,1%, respectivamente ($p = 0,008$). La edad media de ambos grupos fue similar (Tabla 15).

En cuanto a la prevalencia de los distintos FRCV clásicos, la HTA, la DLP y la obesidad ($IMC > 30 \text{ Kg/m}^2$), fueron más prevalentes en el grupo SAF que en el grupo AAF ($p < 0,05$) (Tabla 15). El porcentaje de pacientes con al menos un FRCV fue significativamente mayor en el grupo SAF en comparación con el grupo AAF, 98,2% Vs 89%, respectivamente ($p = 0,016$) (Tabla 15).

8.3.1. Estratificación del riesgo cardiovascular según el modelo predictivo SCORE

Clasificamos a los pacientes de ambos grupos con aFL (grupo SAF y grupo AAF) según los estratos de riesgo cardiovascular (RCV) establecidos para el modelo predictivo SCORE (Tabla 15).

Esta escala clasifica a los pacientes en función del RCV del siguiente modo: - Bajo RCV los casos con una puntuación $< 1\%$; - Moderado RCV para los casos con una puntuación entre el 1% y el 4%; - Alto RCV aquellos con un valor de SCORE entre un 5% y un 9%; - Muy alto RCV a los pacientes con una puntuación $\geq 10\%$.

Según este modelo, el 12,5% de todos los pacientes con aFL positivos de nuestra muestra se clasificó como RCV alto o muy alto, el 42% como RCV moderado y el 43,8% como RCV bajo.

La proporción de pacientes con un SCORE de bajo RCV fue mayor en el grupo AAF ($p = 0,043$) (Tabla 15) (Figura 12), mientras que en el grupo SAF se identificó una mayor prevalencia de pacientes con un SCORE equivalente a un RCV moderado ($p = 0,014$) (Tabla 15) (Figura 13).

Tabla 15. Análisis univariante de variables sociodemográficas y variables de riesgo cardiovascular entre los grupos con aFL: SAF y AAF.

	SAF (n:112)	AAF (n:82)	OR	IC95%	p
Sexo - n (%)					
Hombre	58 (51,8)	28 (34,1)	2,23	1,24 – 4,01	0,008
Mujer	54 (48,2)	54 (65,9)			
Edad (años) - M (DE)	51,3 (12,8)	50,2 (15,1)	0,99	0,97 – 1,02	0,586
FRCV - n (%)					
Hipertensión arterial	50 (44,6)	25 (30,5)	1,87	1,02 – 3,41	0,042
Dislipemia	84 (75)	43 (52,4)	2,72	1,48 – 5,00	0,001
Diabetes Mellitus	11 (9,8)	9 (11)	1,13	0,45 – 2,87	0,794
IMC > 30 Kg/m ²	43 (38,4)	17 (20,7)	2,45	1,27 – 4,73	0,007
Tabaquismo	66 (58,9)	44 (53,7)	1,24	0,69 – 2,20	0,465
Sedentarismo	57 (50,9)	49 (59,8)	1,41	0,79 – 2,51	0,247
Algún FRCV	110 (98,2)	73 (89)	6,78	1,42 – 32,28	0,016
1 FRCV	17 (15,2)	16 (19,5)	1,36	0,64 – 2,87	0,428
2 FRCV	29 (25,9)	21 (25,6)	1,02	0,53 – 1,95	0,964
3 o más FRCV	64(57,1)	36 (43,9)	1,70	0,96 – 3,03	0,069
SCORE – n (%)					
SCORE Bajo	49 (43,8)	47 (57,3)	0,55	0,30 – 0,98	0,043
SCORE Moderado	47 (42)	20 (24,4)	2,20	1,17 – 4,14	0,014
SCORE Alto	10 (8,9)	7 (8,5)	1,03	0,37 – 2,83	0,957
SCORE Muy alto	4 (3,6)	5 (6,1)	0,56	0,15 – 2,15	0,397

SAF, Síndrome Antifosfolípido primario. AAF, Portadores de anticuerpos antifosfolípidos sin antecedente de evento trombótico. M, media. DE, desviación estándar. FRCV, factor de riesgo cardiovascular. IMC, índice de masa corporal.

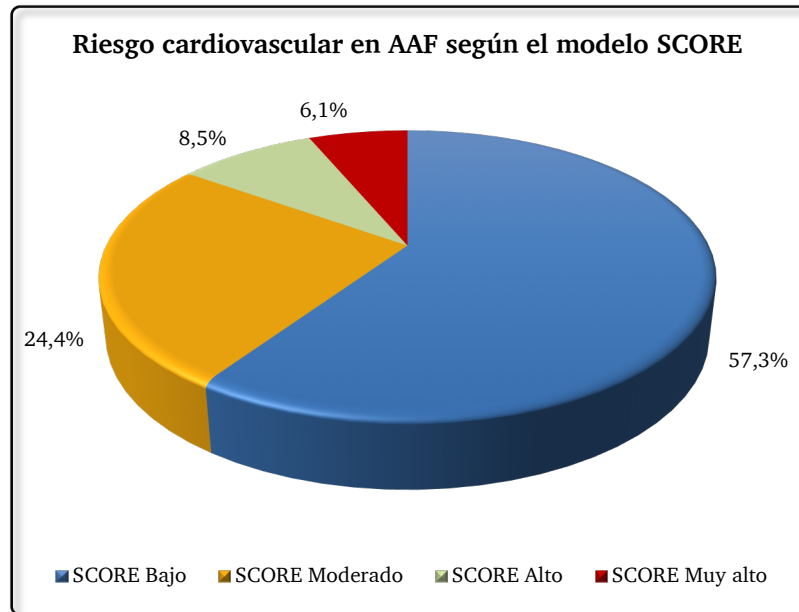


Figura 12. Clasificación de los pacientes del grupo AAF en función del riesgo cardiovascular según el modelo predictivo SCORE.

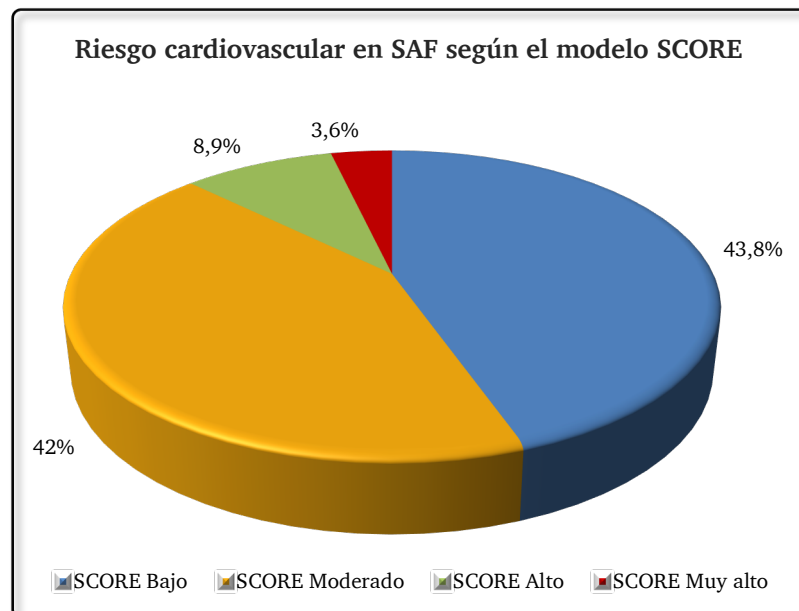


Figura 13. Clasificación de los pacientes del grupo SAF en función del riesgo cardiovascular según el modelo predictivo SCORE.

8.4. PERFIL DE ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS

El AL fue positivo en un 75% de todos los pacientes con aFL de nuestra muestra; los aCL (isotipo IgM y/o IgG) y los a β 2GP1, fueron positivos en un 32,1% y un 29,5%, respectivamente (Tabla 16).

Mediante un análisis univariante estudiamos la prevalencia de los diferentes aFL entre el grupo SAF y el grupo AAF (Tabla 16). Observamos una mayor proporción de AL en el grupo SAF en comparación con el grupo AAF, 75% Vs 61% ($p= 0,023$) (Figura 14); también la positividad aislada del AL fue más prevalente en el grupo SAF que en el grupo AAF ($p= 0,030$) (Tabla 16).

En el caso de los a β 2GP1 la prevalencia fue mayor en el grupo AAF, tanto para el isotipo IgM ($p= 0,031$) como para el isotipo IgG ($p= 0,033$) (Figura 14). En el caso de los aCL no se hallaron diferencias significativas entre ambos grupos.

El análisis del perfil de riesgo trombótico (bajo o alto riesgo trombótico) en función del perfil de aFL, no identificó diferencias significativas entre ambos grupos (Tabla 16).

Tabla 16. Análisis univariante de la prevalencia de aFL y el perfil de riesgo trombótico asociado a los aFL en los grupos de estudio con aFL.

	SAF (n: 112)	AAF (n: 82)	OR	IC95%	p
AL - n (%)	86 (75)	50 (61)	2,07	1,11 – 3,86	0,023
aCL positivo- n (%)					
Isotipo IgM	21 (18,8)	19 (23,2)	0,77	0,38 – 1,54	0,453
Isotipo IgG	17 (15,2)	18 (22)	0,64	0,31 – 1,33	0,228
Isotipo IgM y/o IgG	36 (32,1)	31 (37,8)	0,78	0,43 – 1,42	0,413
a β 2GP1 positivo- n (%)					
Isotipo IgM	12 (10,7)	19 (23,2)	0,42	0,19 – 0,92	0,031
Isotipo IgG	27 (24,1)	32 (39)	0,51	0,27 – 0,95	0,033
Isotipo IgM y/o IgG	33 (29,5)	35 (42,7)	0,58	0,32 – 1,05	0,070
Sólo AL positivo - n (%)	50 (44,6)	24 (29,3)	1,95	1,07 – 3,57	0,030
Sólo aCL positivo - n (%)	5 (4,5)	2 (2,4)	1,87	0,35 – 9,88	0,462
Sólo a β 2GP1 positivo - n (%)	3 (2,7)	4 (4,9)	1,86	0,41 – 8,56	0,424
Número de aFL positivos - n (%)					
1 aFL	57 (50,9)	28 (34,1)	1,99	1,11 – 3,59	0,021
2 aFL	16 (14,3)	13 (15,9)	1,12	0,51 – 2,48	0,782
3 aFL (triple positivo)	21 (18,8)	23 (28)	1,67	0,85 – 3,29	0,137
Perfil aFL - n (%)					
Bajo riesgo trombótico	24 (21,4)	23 (28)	1,43	0,74 – 2,77	0,289
Alto riesgo trombótico	88 (78,6)	59 (72)	1,43	0,74 – 2,77	0,289

SAF, Síndrome Antifosfolípido primario. AAF, Portadores de anticuerpos antifosfolípidos sin antecedente de evento trombótico. AL, anticoagulante lúpico. aCL, anticuerpos anti-cardiolipina. a β 2GP1, anticuerpos anti- β 2GP1. aFL, anticuerpos antifosfolípidos.

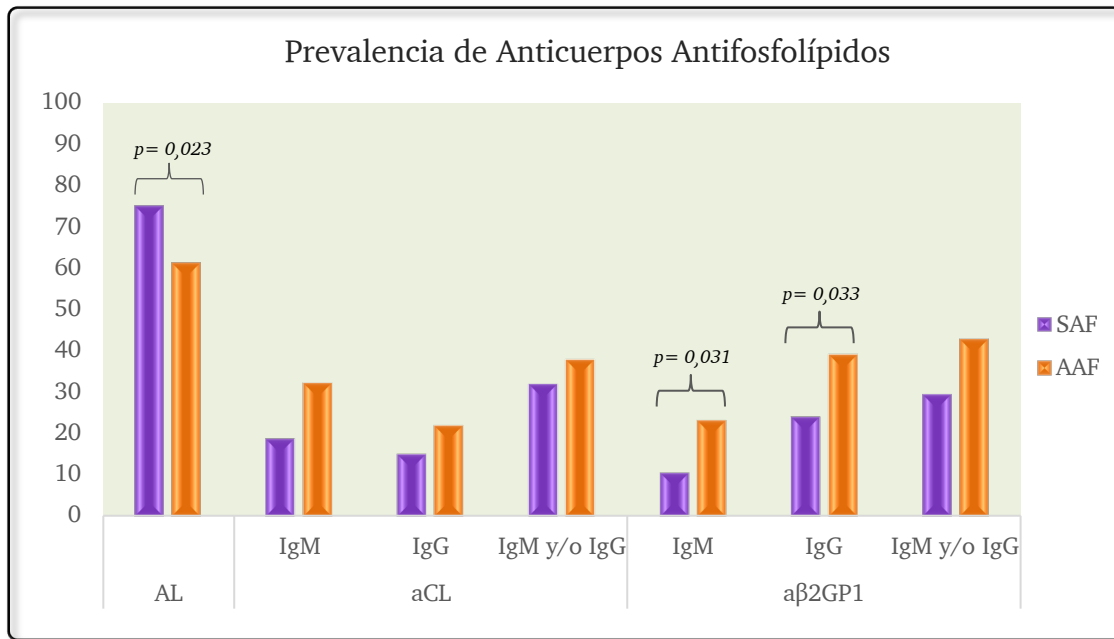


Figura 14. Análisis univariante de la prevalencia de los aFL en nuestra muestra.

8.5. DETERMINACIÓN DE FXI DE LA COAGULACIÓN

Determinamos los niveles de FXI en todos los participantes del estudio empleando los sistemas de activación y coagulométricos indicados en el apartado de material y métodos. Como ya se ha descrito previamente, la determinación de FXI:C empleando sílica (SynthASil) presentaba una distribución no normal y generó valores más bajos que cuando se emplea ácido elálgico (SynthAFax) (304)

Así, en nuestra población, la media de FXI:C (cuantificada en porcentaje) con el método de SynthAFax (SFX) fue de $114,3 \pm 31,4\%$; mientras que la mediana de FXI:C determinada con el reactivo de SynthASil (SS) fue de $105,3\%$ (RIC 36,8). Los resultados de niveles de FXI:C en cada grupo de estudio se muestran en la Tabla 17.

Para minimizar los posibles errores en la determinación de la FXI:C asociados a la sensibilidad y/o especificidad de las técnicas empleadas en nuestro estudio, consideramos como exceso o déficit de FXI:C cuando en el mismo paciente se obtenía con ambas técnicas un valor de FXI:C $>150\%$ o $<70\%$, respectivamente; parámetro que fue denominado como resultado “global”. Así, un $6,1\%$ (30/495) de nuestra muestra presentaba un exceso de FXI global, mientras que en un $3,2\%$ (16/495) se objetivó un déficit de FXI global (Tabla 17).

La prevalencia de exceso de FXI (FXI:C $>150\%$) fue mayor en los grupos con antecedentes de eventos trombóticos (grupo SAF y grupo TROM) con respecto al grupo AAF y el grupo SAN, tanto si la determinación se realizaba con SynthAFax, SynthASil o en el estudio global (Tabla 17 y figura 15).

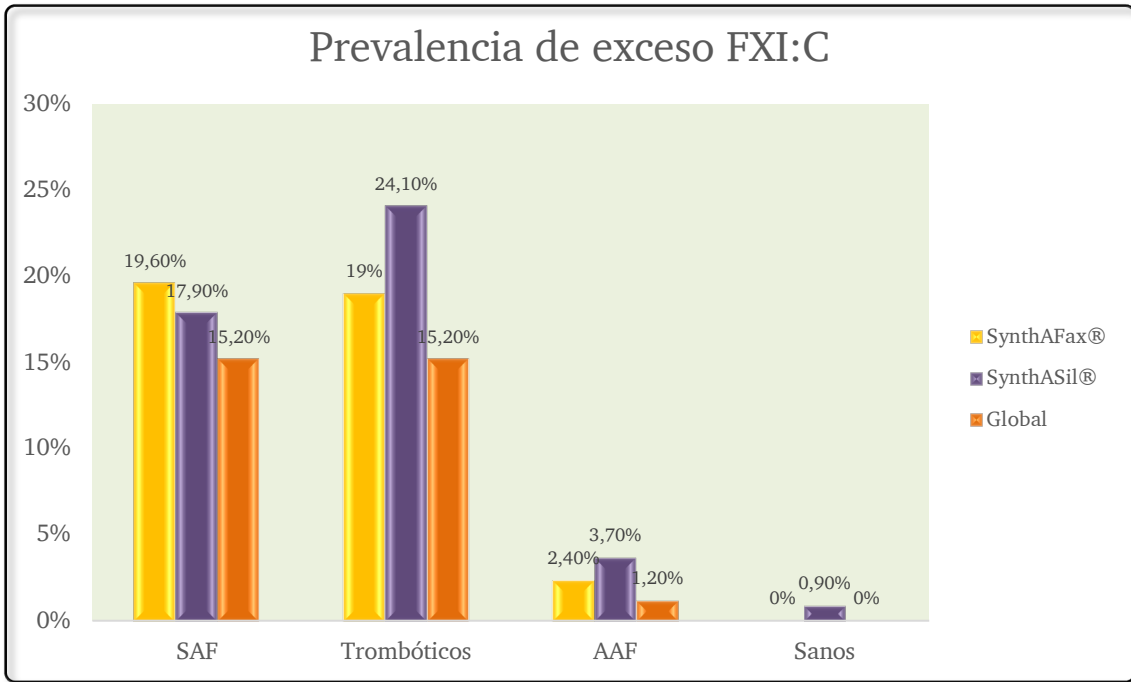
La deficiencia de FXI (FXI:C $<70\%$) solo se detectó en un sujeto incluido en el grupo SAN (Tabla 17). En el grupo TROM dos casos presentaban deficiencia de FXI. En los pacientes con aFL positivos, la incidencia de casos con deficiencia de FXI:C aumentaba, especialmente cuando se emplea sílica para su cuantificación, llegando a alcanzar una prevalencia del 19.5% en el grupo AAF.

Los resultados globales confirman la mayor prevalencia de la deficiencia de FXI en el grupo de portadores asintomáticos de aFL (grupo AAF), 12,2%, mientras que en el resto de grupos del estudio la incidencia de deficiencia de FXI fue menor del 3% (Tabla 17 y figura 16).

Tabla 17. Niveles de FXI:C determinados con dos activadores diferentes de la ruta de contacto, sílica (SS), ácido elágico (SFX). Casos con exceso o déficit de FXI con cada activador y cifra global, en cada grupo de sujetos de nuestra cohorte.

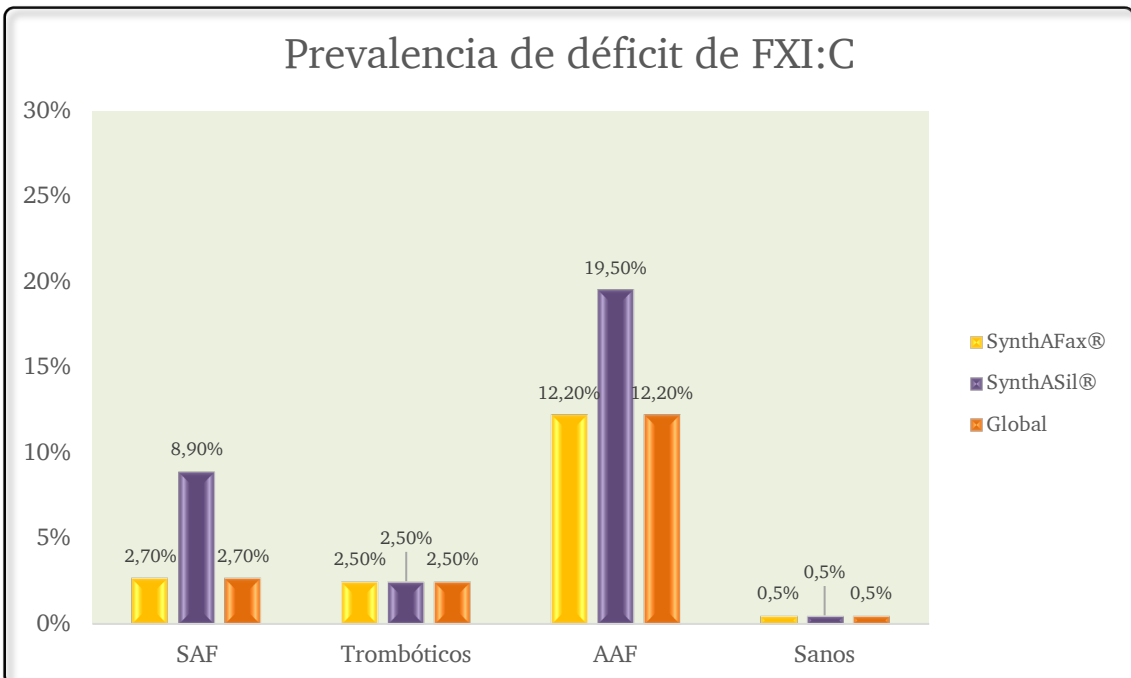
	Total (n:495)	SAF (n:112)	AAF (n:82)	TROM (n:79)	SAN (n:222)
FXI (FXI:C) (%)					
SFX – M (DE)	114,3 (31,4)	122,8 (33,4)	104,5 (27,5)	128,5 (26,9)	99,6 (19,0)
SS – Me (RIC)	105,3 (36,8)	110,9 (46,9)	99,1 (36,2)	127,9 (36,7)	100,2 (21,5)
Exceso de FXI (>150%)- n (%)					
SFX	39 (7,9)	22 (19,6)	2 (2,4)	15 (19,0)	0 (0)
SS	44 (8,9)	20 (17,9)	3 (3,7)	19 (24,1)	2 (0,9)
Global	30 (6,1)	17 (15,2)	1 (1,2)	12 (15,2)	0 (0)
Déficit de FXI (<70%)- n (%)					
SFX	16 (3,2)	3 (2,7)	10 (12,2)	2 (2,5)	1 (0,5)
SS	29 (5,9)	10 (8,9)	16 (19,5)	2 (2,5)	1 (0,5)
Global	16 (3,2)	3 (2,7)	10 (12,2)	2 (2,5)	1 (0,5)

FXI, factor XI de la coagulación. FXI:C, actividad coagulante del factor XI. SFX, SynthAFax®. SS, SynthASil®.



FXI:C, actividad coagulante del factor XI. Global, casos con FXI:C >150% con ambos métodos empleados para su determinación.

Figura 15. Prevalencia de exceso de FXI:C (FXI:C >150%) en los grupos de nuestra cohorte de acuerdo con los diferentes sistemas diagnósticos.



FXI:C, actividad coagulante del factor XI. Global, casos con FXI:C <70% con ambos métodos empleados para su determinación.

Figura 16. Prevalencia del déficit de FXI:C (FXI:C <70%) en los grupos de nuestra cohorte de acuerdo con los diferentes sistemas diagnósticos.

8.5.1. Análisis univariante de los niveles de FXI:C entre pacientes con diagnóstico de SAF y portadores asintomáticos de aFL

Los valores medios de FXI:C, determinados por ambas técnicas, fueron mayores en el grupo SAF que en el grupo AAF (SFX, $p < 0,001$; SS, $p = 0,002$) (Tabla 18 y figura 17).

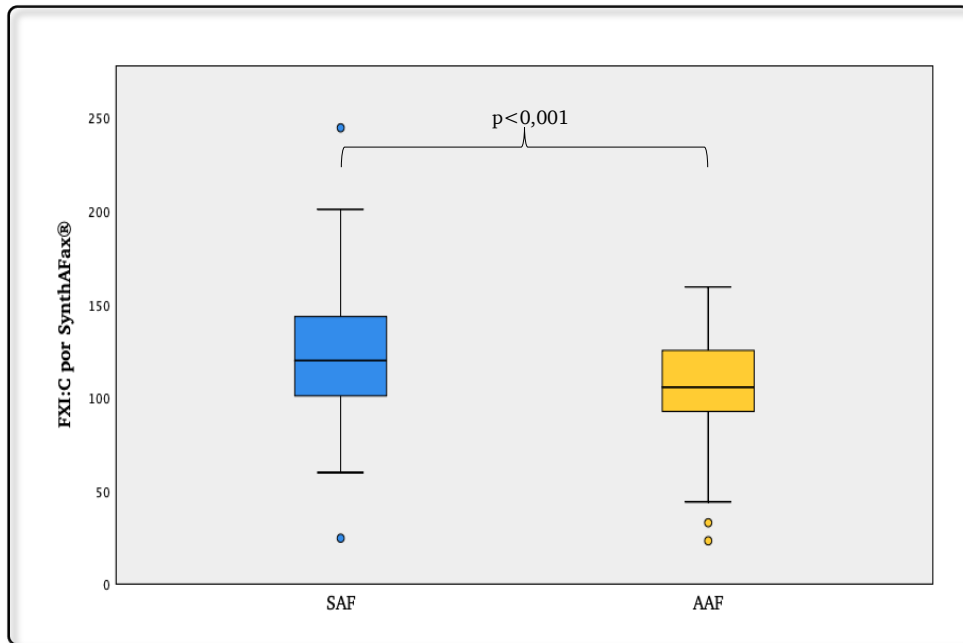
La prevalencia de casos con exceso global de FXI:C (FXI:C $> 150\%$) fue mayor en los pacientes del grupo SAF ($p = 0,009$) (Tabla 18), llegando a ser 14 veces más prevalente en los pacientes SAF que en los pacientes del grupo AAF si consideramos el resultado global (Tabla 18).

En cuanto a la prevalencia del déficit de FXI, 15 pacientes y un 1 control sano de nuestra muestra presentaron un déficit global de FXI (FXI:C $< 70\%$ con SynthAFax y SynthASil), de los cuales 10 (62,5%) pertenecían al grupo de portadores asintomáticos de aFL (Tabla 17). De este modo, la proporción de casos con deficiencia de FXI fue casi 5 veces más alta en los pacientes del grupo AAF que en el grupo SAF ($p = 0,018$) (Tabla 18).

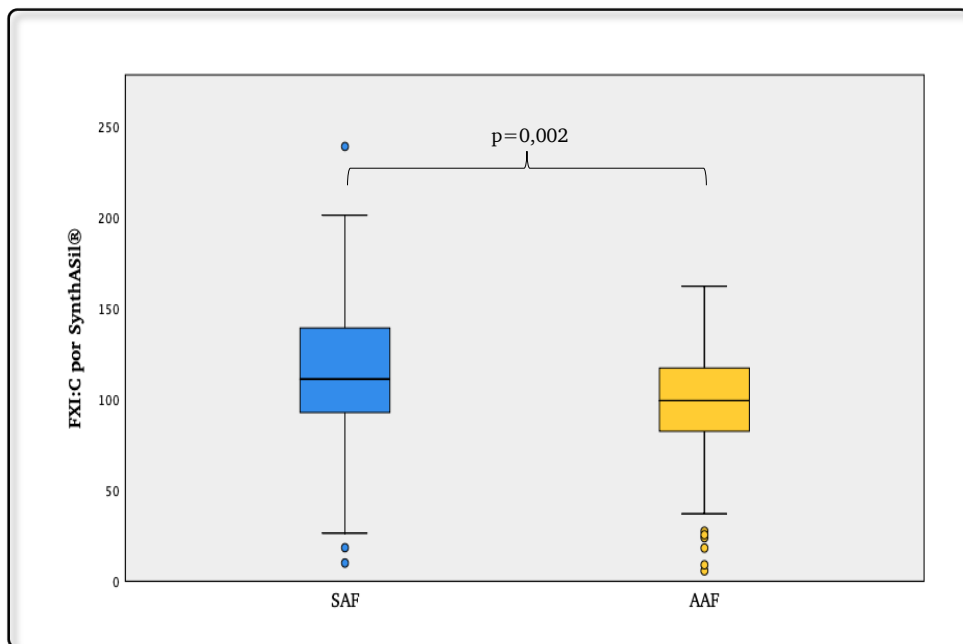
Tabla 18. Análisis univariante de los niveles de FXI:C entre pacientes con SAF y portadores asintomáticos de aFL.

	SAF (n:112)	AAF (n:82)	OR	IC95%	p
FXI (FXI:C) (%)					
SFX – M (DE)	122,8 (33,4)	104,5 (27,5)			<0,001
SS – Me (RIC)	110,9 (46,9)	99,1 (36,2)			0,002
Exceso de FXI - n (%)					
SFX	22 (19,6)	2 (2,4)	10,11	2,30 – 44,36	0,002
SS	20 (17,9)	3 (3,7)	5,91	1,69 – 20,65	0,005
Global	17 (15,2)	1 (1,2)	14,95	1,95 – 114,83	0,009
Déficit de FXI - n (%)					
SFX	3 (2,7)	10 (12,2)	4,93	1,31 – 18,54	0,018
SS	10 (8,9)	16 (19,5)	2,41	1,03 – 5,64	0,042
Global	3 (2,7)	10 (12,2)	4,93	1,31 – 18,54	0,018

FXI, factor XI de la coagulación. FXI:C, actividad coagulante del factor XI. SFX, SynthAFax®. SS, SynthASil®.



FXI:C, actividad coagulante del factor
v_r



FXI:C, actividad coagulante del factor
v_r

Figura 17. Comparación de medias de FXI:C entre pacientes del grupo SAF y el grupo AAF, empleando SynthAFax® y SynthASil®.

8.5.2. Análisis de la relación entre el perfil de aFL y el nivel de FXI:C

En nuestra cohorte los niveles de FXI:C en plasma no se correlacionaron con el perfil de aFL en ninguno de los dos grupos con aFL positivos, grupo SAF y grupo AAF.

El exceso global de FXI (FXI:C >150%) en nuestra cohorte de pacientes con aFL positivos no se relacionó con un determinado perfil de anticuerpos, de bajo o de alto riesgo trombótico ($p= 0,774$); tampoco encontramos asociación con el tipo, ni con el número de anticuerpos positivos.

La edad media de los pacientes del grupo SAF en el momento del primer evento trombótico fue significativamente mayor en los casos que presentaban un exceso global de FXI:C con respecto a los casos sin exceso de FXI, $49,75\pm 11,5$ años Vs $42,30\pm 13,4$ años, respectivamente ($p= 0,04$). Los casos con antecedente de recurrencia trombótica no presentaron una mayor prevalencia de exceso de FXI, ni encontramos relación entre los niveles de FXI:C con el tipo de evento trombótico.

El déficit global de FXI (FXI:C < 70%) en nuestra cohorte de pacientes con aFL positivos no se relacionó con un determinado perfil de anticuerpos, de bajo o de alto riesgo trombótico ($p= 0,913$); tampoco encontramos asociación con el tipo, ni con el número de anticuerpos positivos.

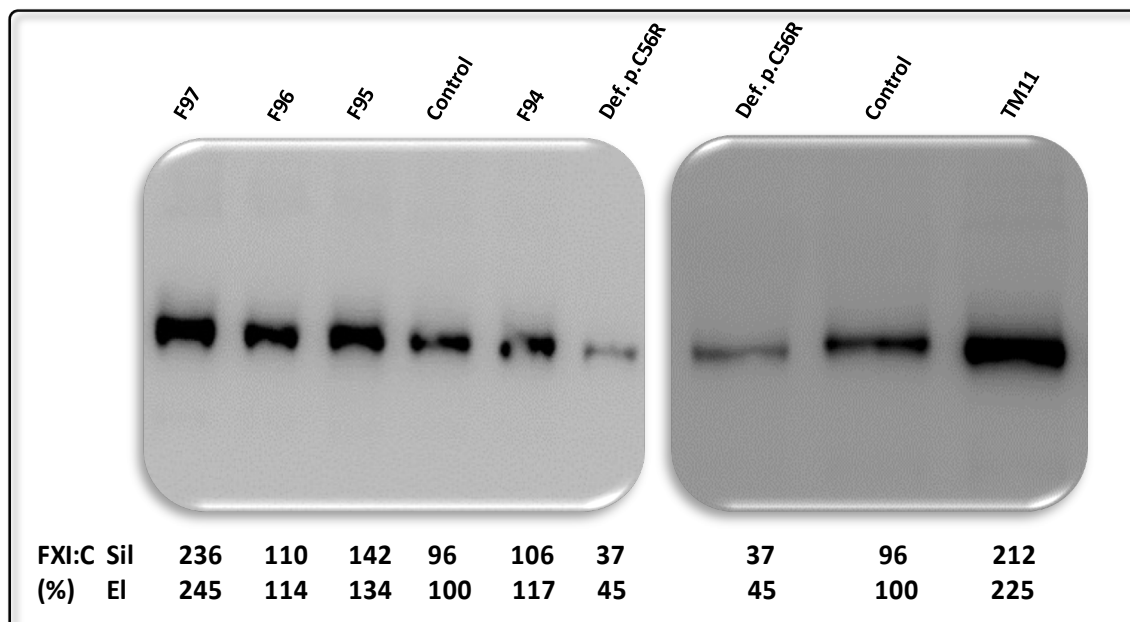
Analizamos también la relación entre los niveles de FXI:C con el perfil de aFL en cada grupo de pacientes con aFL por separado. No encontramos una relación significativa entre los niveles de FXI y el perfil de aFL, número y tipo de anticuerpos positivos en ninguno de los dos grupos.

8.6. ANÁLISIS DEL FXI PLASMÁTICO MEDIANTE WESTERN BLOT

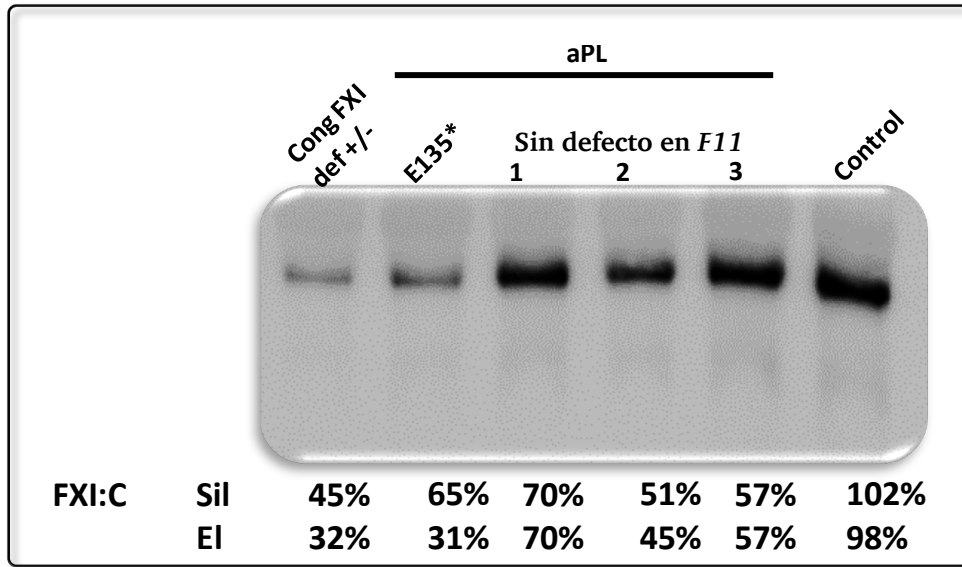
El estudio del FXI plasmático en las muestras de los casos incluidos en nuestro estudio se realizó mediante Western blot empleando un anticuerpo policlonal que detecta el dímero de FXI tras separar las proteínas del plasma en condiciones desnaturalizantes (SDS) pero sin emplear agentes reductores.

Mientras que en los casos con niveles elevados de FXI:C se confirma un incremento notable de los niveles de FXI en plasma tanto en pacientes con SAF como con trombosis (Figura 18A), los resultados eran más conflictivos cuando se evaluaron los casos con deficiencia de FXI:C, ya que en algunos casos se confirmaba la deficiencia antigénica mientras que en otros no se validaban los resultados coagulométricos con los niveles antigénicos, que eran mayores (Figura 18B).

A)



B)



aPL: anticuerpos antifosfolípido. Sil, sílica. El, ácido elágico.

Figura 18. Western blot representativo del FXI detectado en el plasma de casos de nuestra cohorte: A) exceso de FXI:C (> 150%) identificados entre pacientes con SAF (F) o trombosis (TM); B) deficiencia de FXI. Los valores coagulométricos obtenidos tanto tras activar con sílica (Sil) como con elágico (El) se muestran para cada caso en porcentaje de FXI:C. Dentro de los pacientes con deficiencia de FXI se separan un paciente portador de la variante p.Glu135Ter (E135*) en heterocigosis, y 3 pacientes sin defectos moleculares en el gen codificante. Como controles se usaron un sujeto sano (control) y un paciente con deficiencia congénita de FXI en heterocigosis portador de la variante p.Cys56Arg.

8.7. ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN *F11* EN PACIENTES Y CONTROLES CON DÉFICIT DE FXI

Con el objetivo de aclarar las discrepancias entre los valores coagulométricos y los niveles antigénicos de FXI en plasma identificados por Western blot en los casos con deficiencia de FXI, y con la finalidad de determinar si la deficiencia tuviera un componente congénito, se realizó un estudio molecular del gen *F11* en los 13 pacientes que presentaron déficit global de FXI:C y que tenían aFL positivos (10 pacientes del grupo AAF y 3 del grupo SAF), los 2 casos del grupo TROM y el sujeto control del grupo SAN.

El primer estudio consistió en una secuenciación del gen *F11*. En 12 casos se realizó un estudio mediante secuenciación de Sanger de los 15 exones y regiones flanqueantes. En los casos restantes se secuenció la totalidad del gen *F11* mediante NGS (del acrónimo en inglés, *next generation sequencing*).

En los casos en los que no se encontró una mutación como posible causa del déficit de FXI, también realizamos la búsqueda de grandes deleciones e inserciones en el gen *F11* mediante MLPA.

8.7.1. Secuenciación del gen *F11* en pacientes con déficit de FXI y aFL positivos

En 2 de los 13 pacientes con aFL analizados con déficit de FXI, el paciente F101 (del grupo SAF) y el AL28 (del grupo AAF), ambos con determinaciones positivas de AL, se identificó mediante NGS una variante génica puntual en heterocigosis localizada en el exón 5: c.403G>T, que fue validada posteriormente mediante secuenciación de Sanger (Figura 19).

Este cambio genético tiene como consecuencia la aparición de un codón terminación en el codón 135: p.Glu135Ter (Figura 20).

Esta alteración genética ya se ha identificado previamente (299,363) y se ha descrito como una de las mutaciones más frecuentes responsables de la

deficiencia de FXI en la población judía de origen Askenazí (364). Es importante indicar que esta mutación no ha sido descrita hasta ahora en nuestro país, y destacamos que, aunque los dos sujetos portadores son de la Región de Murcia, viven en ciudades diferentes y no tenían lazos familiares conocidos.

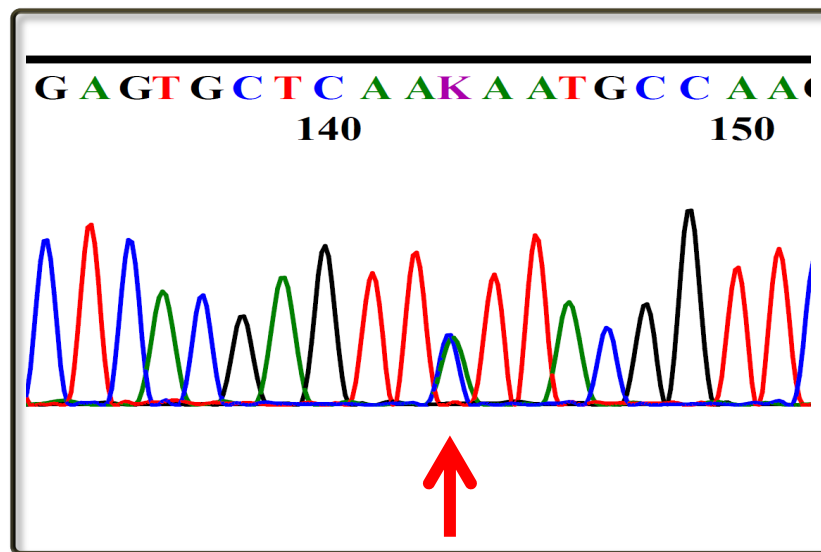


Figura 19. Electroferograma (secuencia reversa y complementaria) del exón 5 del *F11* en un paciente (F101) con deficiencia de FXI en el que se identifica la mutación c.403G>T en heterocigosis (Flecha roja).

WT:	132	133	134	135	136	137 625
	S	A	Q	E	C	Q X
	Ser	Ala	Gln	Glu	Cys	Gln Ter
	agt	gct	caa	gac	tgc	caa tga

WT, wild type.

MUT:	132	133	134	135			
	S	A	Q	X			
	Ser	Ala	Gln	Ter			
	agt	gct	caa	tac	tgc	caa tga

MUT, mutation.

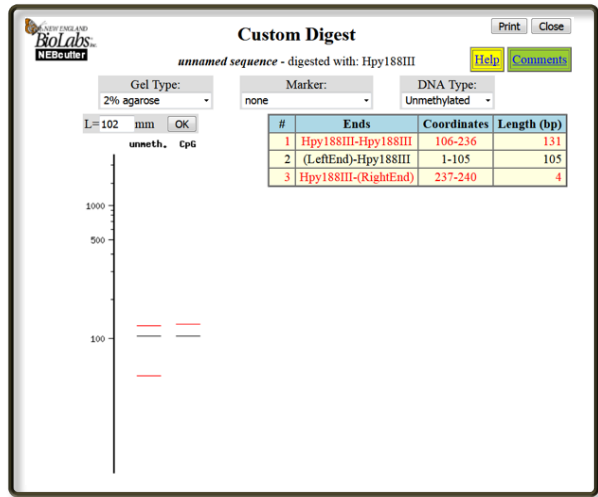
Figura 20. Consecuencia del cambio c.403G>T en la secuencia aminoacídica del FXI.

8.7.1.1. Genotipado de la mutación c.403G>T; p.Glu135Ter

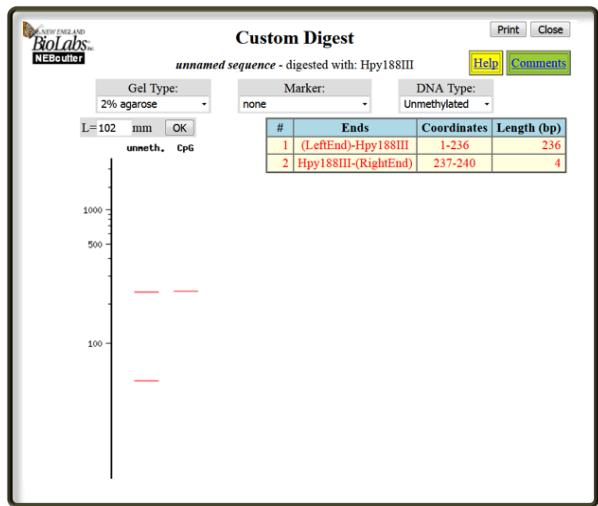
La validación y caracterización de este resultado se realizó empleando tres aproximaciones. En primer lugar, como ya hemos indicado, la mutación se verificó en una nueva amplificación y secuenciación del gen *F11*. En segundo lugar, se realizaron estudios familiares en los dos casos índices, evaluando esta alteración en los familiares de primer grado de ambos pacientes mediante genotipado, empleando una PCR y análisis del patrón de restricción o PCR-ASRA (del acrónimo inglés Allele Specific Restriction Assay), empleando la endonucleasa de restricción Hyp 188III, sensible al cambio genético (Figura 21).

A)

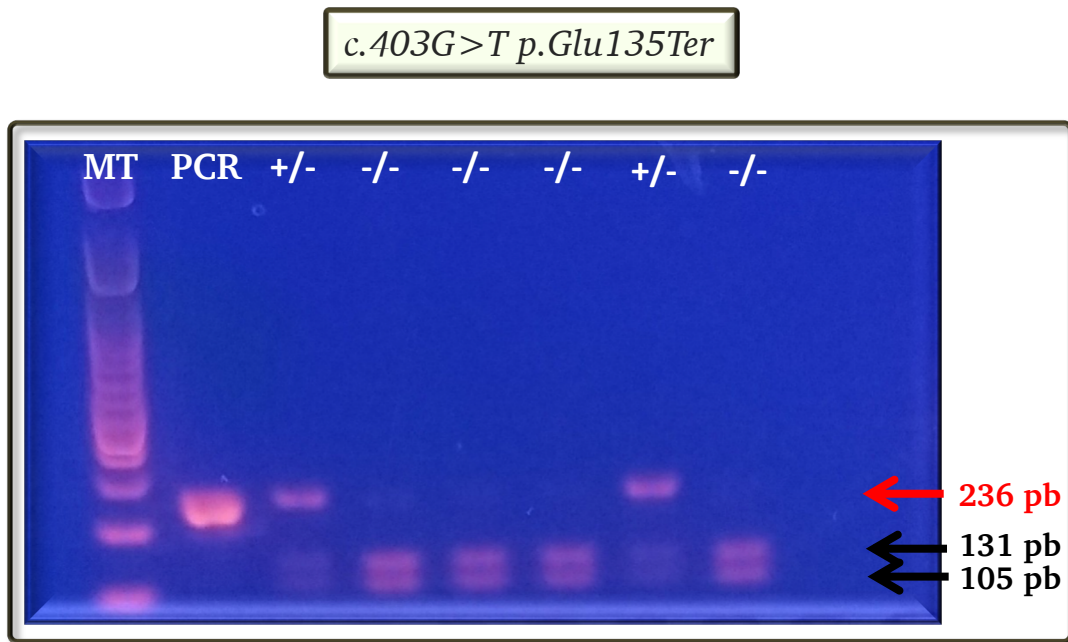
Wild type



c.403G>T CM890042



B)



MT, marcador de tamaño.

Figura 21. Patrón de restricción de la PCR del exón 5 del gen *F11* tras digestión con la endonucleasa Hpy188III: (A) Patrón de restricción en sujetos sin y con la mutación c.403G>T en heterocigosis; (B) Resultado de la digestión de la PCR con la endonucleasa de restricción en sujetos portadores de diferentes genotipos para la mutación c.403G>T que validan el uso de este método para determinar el genotipado de esta alteración genética. La flecha roja indica el fragmento de 236 pares de bases sin digerir que define la presencia de la mutación.

Como se muestra en la figura 22, el estudio de los 12 miembros disponibles de las dos familias confirmó la base molecular de la deficiencia, ya que la mutación c.403G>T (p.Glu135Ter) se identificó en un total de 10 pacientes de las dos familias, en miembros de diferentes generaciones, todos ellos con deficiencia de FXI.

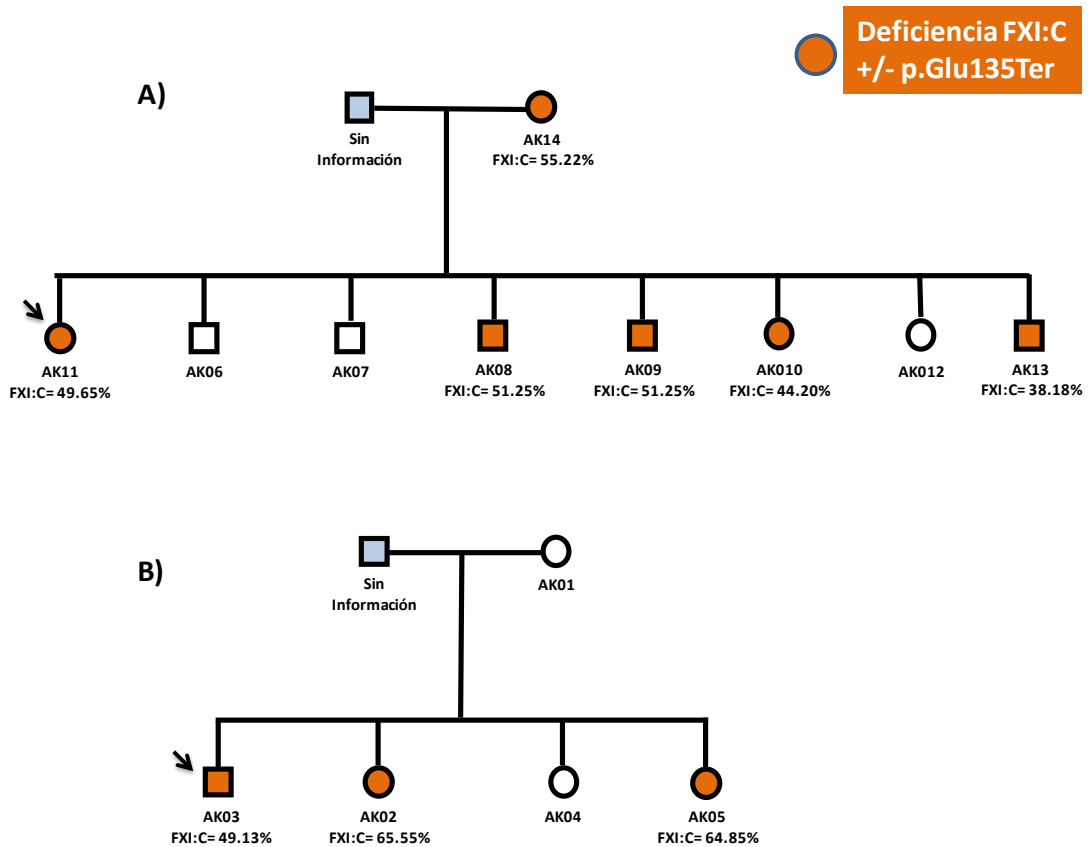


Figura 22. Árbol genealógico de los dos probandos (señalados con una flecha), portadores de la mutación del gen *F11* c.403G>T (p.Glu135Ter) en heterocigosis. Los sujetos con la alteración en heterocigosis se muestran marcados en naranja símbolos. Los valores de FXI:C determinados en cada sujeto empleando sílica como activador (SynthASil) también se indican.

Finalmente, la deficiencia de FXI asociada con esta alteración se caracterizó completamente en los miembros portadores de estas dos familias, evaluando tanto la actividad coagulante (FXI:C), empleando sílica como activador de la ruta de contacto, y estudiando los niveles de FXI en plasma mediante Western blot. Los resultados obtenidos confirman que esta alteración provoca una deficiencia CRM-, con menores niveles de FXI en plasma en los portadores (Figuras 22 y 23).

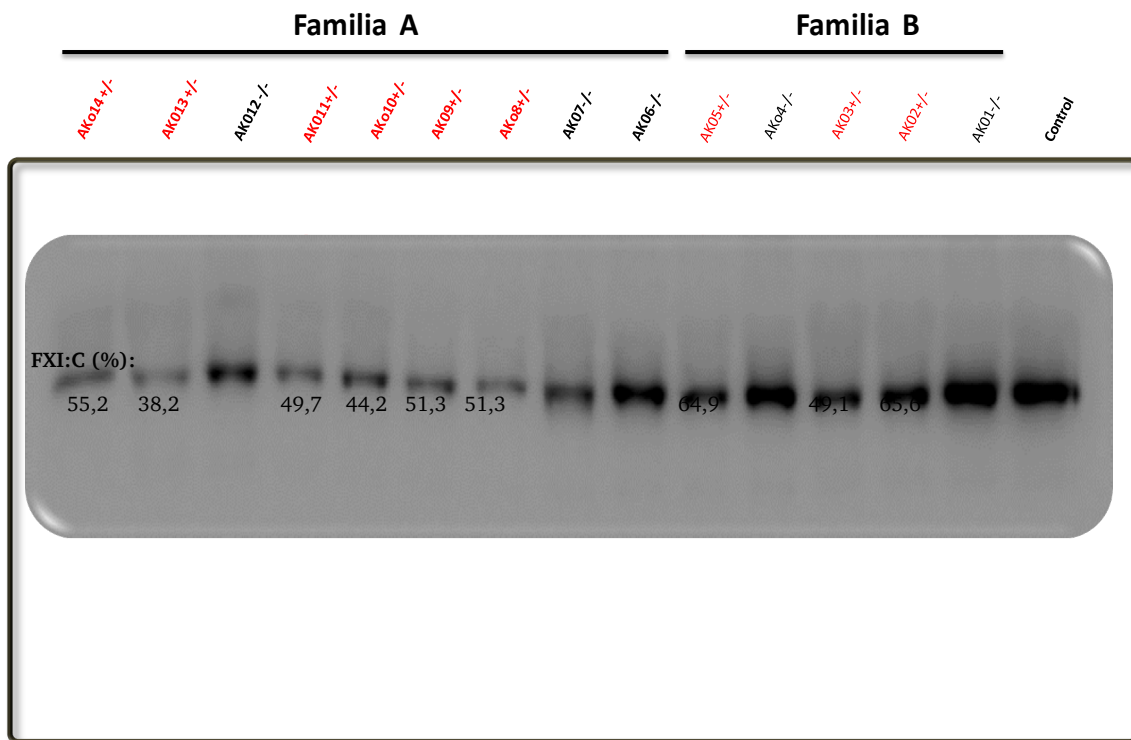
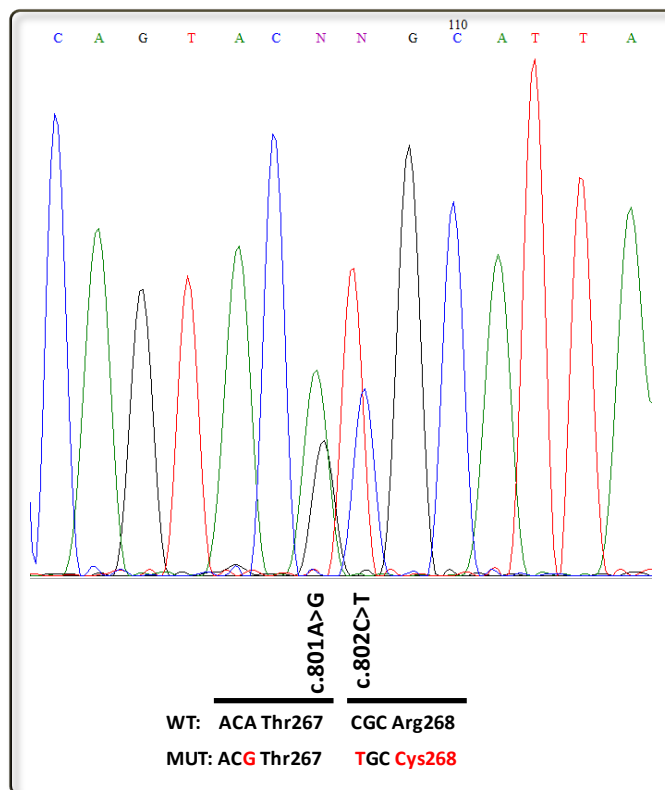


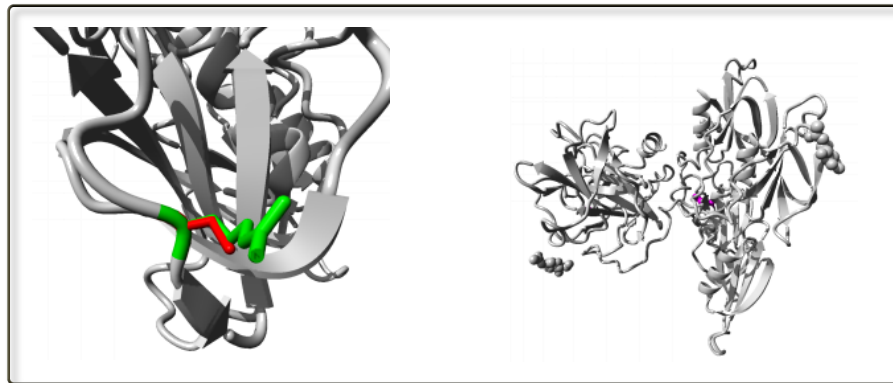
Figura 23. Niveles de FXI evaluados mediante Western blot en los miembros de las dos familias portadoras de la mutación c.403G>T, indicados en la figura 22. Los portadores de la mutación en heterocigosis se muestran con el símbolo +/--. Los sujetos sin la mutación se marcan como -/-. Como control empleamos plasma de un sujeto sano sin deficiencia de FXI.

Finalmente, en un sujeto del grupo AAF, una mujer de 28 años con un perfil de aFL triple positivo y que presentaba una deficiencia de FXI moderada (FXI:C= 44% y 42% con SyntaSyl y SyntaFax, respectivamente) se identificaron dos mutaciones contiguas en el exon 8, ambas en heterocigosis, que causan un cambio sinónimo y una mutación missense: c.801A>G (p.Thr267Thr) y c.802C>T responsable del cambio p.Arg268Cys, que afecta al dominio Apple 3 (Figura 24). Esta mutación ya ha sido descrita previamente en la base de datos HGMD (CM035499) y FXI.org. De hecho, se ha identificado en 4 pacientes con deficiencia de FXI, en dos casos en homocigosis (Figura 24) (365,366), aunque no se describe el tipo de deficiencia que causa. En nuestra cohorte de pacientes con deficiencia congénita de FXI, identificamos las dos mismas mutaciones en un paciente con deficiencia congénita (presente en madre e hija) no relacionado con el paciente con aFL. El estudio del FXI plasmático mediante Western Blot realizado en nuestros casos confirma que esta mutación causa una deficiencia CRM- (Figura 25).

A)



B)



C)

<u>Patient No. 44</u>			
FXI:C:	FXI:Ag:	Genotype:	Het
Patient:	Race:	Classification:	
Bleeding:			
Comments:			
Reference:	Bolton-Maggs et al 2003 Abstract		
<u>Patient No. 45</u>			
FXI:C:	FXI:Ag:	Genotype:	Hom
Patient:	Race:	Classification:	Severe
Bleeding:			
Comments:			
Reference:	Bolton-Maggs et al 2003 Abstract		
<u>Patient No. 238</u>			
FXI:C:	8	FXI:Ag:	Genotype: Hom
Patient:	Race:	UK Population	Classification:
Bleeding:			
Comments:			
Reference:	Mitchell et al., 2006		
<u>Patient No. 239</u>			
FXI:C:	53	FXI:Ag:	Genotype: Het
Patient:	Race:	UK Population	Classification:
Bleeding:			
Comments:			
Reference:	Mitchell et al., 2006		

Figura 24. Mutación p.Arg268Cys. A) Electroferograma del exón 8 del gen *F11* en el sujeto portador de AAF con deficiencia de FXI causado por la doble mutación c.801A>G (mutación sinónima) y c.802C>T, responsable del cambio p.Arg268Cys en heterocigosis. B) Localización estructural del residuo Arg268 en la estructura del FXI y consecuencias del cambio por Cys. C) Información de los pacientes portadores de esta mutación que están recogidos en la base de datos de mutaciones de FXI.

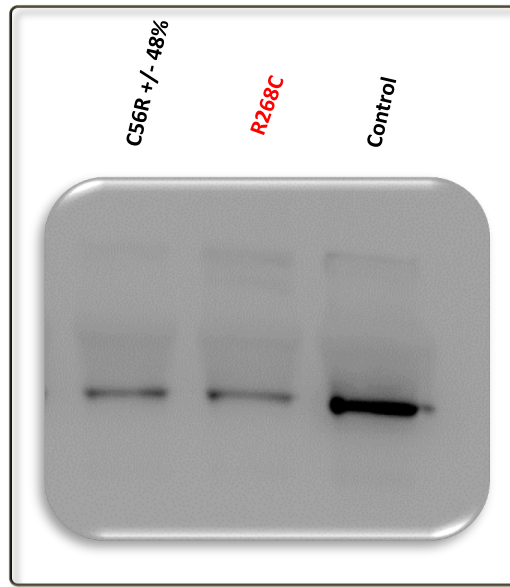
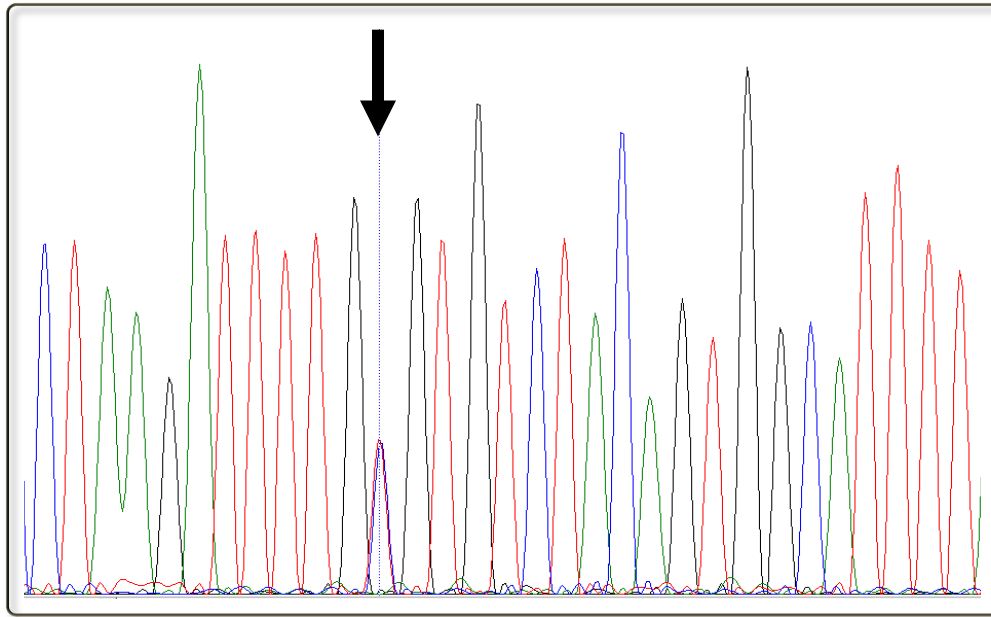


Figura 25. Niveles de FXI evaluados mediante Western blot en el sujeto portador de aFL con deficiencia de FXI causado por la mutación p.Arg268Cys (R268C) en heterocigosis. Como control empleamos plasma de un sujeto sano sin deficiencia de FXI y un sujeto con deficiencia heterocigota de FXI causado por la mutación p.Cys56Arg (C56R).

8.7.2. Secuenciación del gen *F11* en casos con déficit de FXI sin aFL positivos

Los dos casos del grupo TROM con deficiencia de FXI no presentaron ninguna alteración molecular destacable en *F11* y tampoco presentaron deficiencia significativa de los niveles de FXI en plasma por Western Blot. Por tanto, pensamos que esta deficiencia posiblemente no sea congénita, sino ocasionada por algún tipo de inhibidor y debe ser confirmada en una nueva muestra.

Sin embargo, el único sujeto control del grupo SAN con deficiencia de FXI (23% con SynthASil y 24% con SynthAFax) presentaba una alteración molecular relevante en heterocigosis localizada en el exón 12: c.1327C>T (Figura 26)



Flecha: cambio c.1327C>T en heterocigosis.

Figura 26. Electroferograma del exón 12 del gen *F11* en el control sano con deficiencia de FXI con c.1327C>T en heterocigosis.

Este cambio genético es responsable de un cambio *missense* p.Arg443Cys, variante que ya ha sido descrita previamente en HGMD (CM062624) (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=F11>).

De hecho, en la base de datos de mutaciones identificadas en pacientes con deficiencia de FXI (<http://www.factorxi.org/>), en donde siguen una numeración que excluye al péptido señal (por lo que el cambio *missense* sería p.Arg425Cys), se describen dos pacientes ingleses con deficiencia de FXI debida a esta misma mutación también en heterocigosis (365,367). De acuerdo con los

datos de la base de datos de mutaciones en FXI, el residuo afectado se localiza en una lámina beta del dominio peptidase S1 y provoca una deficiencia CRM- con valores coagulométricos similares a los identificados en el control español, y siempre con valores de FXI por debajo del 50%, lo que al ser una alteración heterocigota sugiere un efecto dominante negativo (Figura 27).

The image shows a screenshot of the 'F XI Deficiency Mutation Database' from UCL. The main entry is for the mutation 'Arg425Cys (443)' with the accession number PKILRVYSG. The mutation details are as follows:

Nucleotide:	c.1327C>T	Mutation Type:	Missense
Domain:	SP	Phenotype:	I
Position:	E (βF)	Ref Type:	Full
Comments:			
Patient Info:	-		

Below the main entry, there are two patient-specific records enclosed in a dashed box:

Patient No. 481

FXI:C:	46%	FXI:Ag:		Genotype:	Het
Patient:		Race:		Classification:	
Bleeding:					
Comments:					
Reference:	Mitchell et al., 2006				

Patient No. 482

FXI:C:	31	FXI:Ag:	39	Genotype:	Het
Patient:		Race:		Classification:	
Bleeding:					
Comments:					
Reference:	Saunders RE et al 2009				

Figura 27. Resumen de la información relativa a la mutación c.1327C>T del gen *F11* contenido en la base de datos de mutaciones identificadas en pacientes con deficiencia de FXI de la UCL.

De hecho, el análisis de los niveles de FXI en el plasma del control sano mediante Western Blot confirmó la deficiencia CRM- (Figura 28).

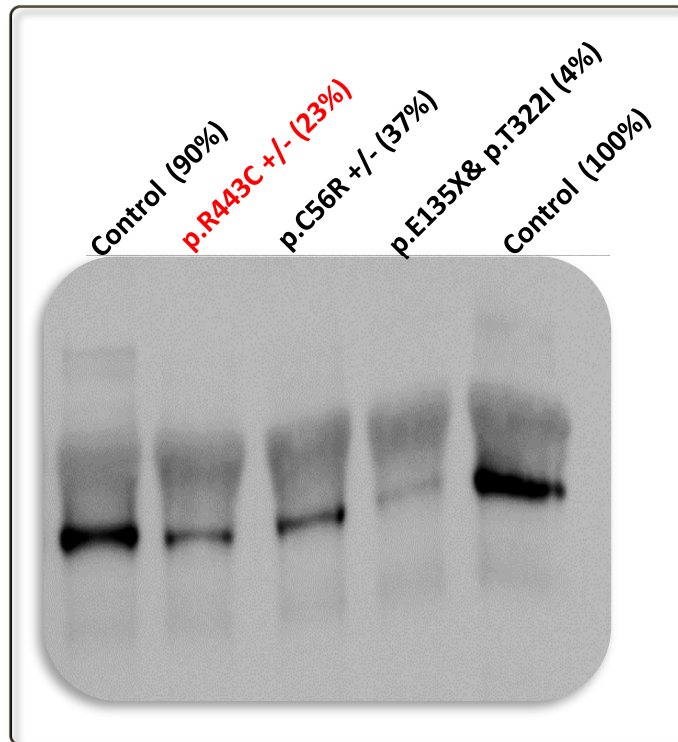
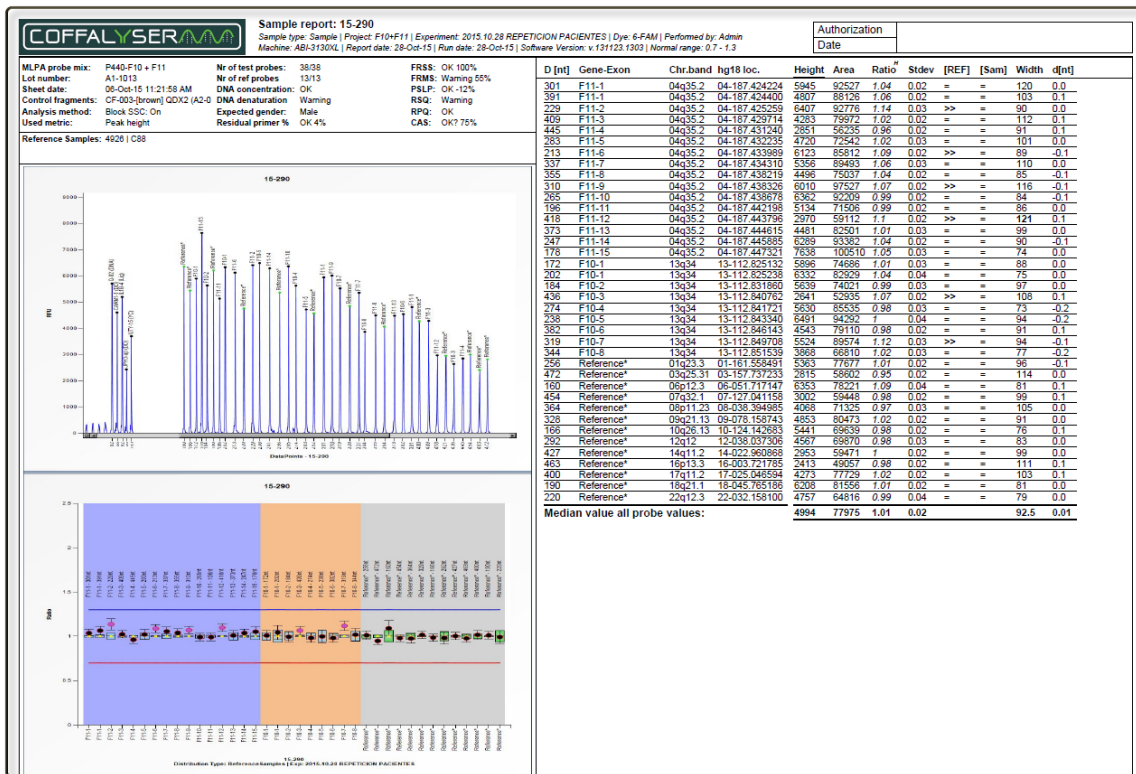


Figura 28. Niveles de FXI evaluados mediante Western blot en el sujeto sano portador de la mutación c.1327C>T (p.Arg443Cys). Como controles se emplearon plasma de dos sujetos sanos sin deficiencia de FXI, de un paciente con deficiencia moderada de FXI causada por la mutación p.Cys56Arg en heterocigosis y un paciente con deficiencia grave de FXI causada por la heterocigosis compuesta de las mutaciones p.Glu135Ter y p.Thre322Ile. Los valores de FXI:C en cada sujeto se muestran entre paréntesis.

8.7.3. Análisis de grandes deleciones y/o inserciones en el gen *F11* mediante “Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification” (MLPA)

En los 11 pacientes con aFL positivos en los que no se identificó por secuenciación ninguna variación genética responsable del déficit de FXI, se realizó la búsqueda de grandes deleciones y/o inserciones en el gen *F11* mediante MLPA.

Este método no identificó ningún caso nuevo con alteraciones moleculares que justificaran la deficiencia de FXI identificada en estos pacientes (Figura 29).



En azul se indican los exones del *F11*, en gris los del *F10*, y en naranja los controles de referencia.

Figura 29. Resultado del estudio mediante MLPA del gen *F11* en un caso representativo de los 11 casos con deficiencia de FXI que no presentaban alteración molecular en el gen tras su secuenciación.

8.8. POTENCIAL INTERFERENCIA DE LA DEFICIENCIA DE FXI EN LA DETERMINACIÓN DE ANTICOAGULANTE LÚPICO

Ante el hallazgo en nuestra cohorte de dos casos con aFL positivos y déficit congénito de FXI, nos planteamos la posible interferencia de la deficiencia congénita de FXI en general y la causada por la mutación c.403G>T (p.Glu135Ter) en particular, en el proceso del diagnóstico de aFL, más específicamente en la determinación del AL, ya que como explicamos en el apartado “3.2.1.1 Anticoagulante Lúpico”, la deficiencia de factores de la coagulación puede interferir en la determinación del AL y dar lugar a falsos positivos. En relación con esto, estudios recientes han demostrado que muchos resultados en la determinación del AL, interpretados sin la prueba del test de mezclas, dan lugar a falsos positivos de AL (368,369), con las posibles repercusiones clínicas, diagnósticas y terapéuticas asociadas a un diagnóstico erróneo.

Para evaluar esta hipótesis, analizamos la presencia de AL en 40 casos con déficit congénito de FXI caracterizados bioquímica, funcional y molecularmente; 32 casos heterocigotos, 5 homocigotos, y 3 heterocigotos compuestos. Estos pacientes procedían de una cohorte establecida de 200 casos con deficiencia congénita del factor FXI (294), los dos casos con la mutación c.403G>T; p.Glu135Ter y los 7 familiares portadores identificados en este estudio.

En 9 de los 40 sujetos con deficiencia congénita de FXI (22,5%) se objetivó un resultado positivo para el AL con la prueba VVRd. Además, uno de los casos, portador heterocigoto del cambio p.Lys536Asn, fue positivo para AL con ambos métodos (Test de VVRd y Test SCT), confirmándose en este paciente la presencia de AL mediante el test de mezclas (Tabla 19). En el resto de pacientes, entre los que se incluía a otro portador de la mutación p.Lys536Asn, no se confirmó la presencia de AL mediante test de mezclas.

Tabla 19. Sujetos con deficiencia congénita de FXI con alguna determinación positiva de AL por SCT y/o VVRd.

Mutación <i>F11</i>	Test SCT	Test VVRd	Test de Mezclas
Homocigoto p.C56R	0,85	1,65	0,95
Heterocigoto p.K536N	1,90	1,53	1,52
Heterocigoto p.Cys416Tyr	0,83	1,57	0,98
Heterocigoto p. C416Y	0,81	1,70	0,97
c.403G>T; p.Glu135Ter	1,08	1,34	1,18
Heterocigoto de p.C56R	0,88	1,31	1,05
Heterocigoto de p.C56R	0,58	1,30	1,06
Heterocigoto p.I426T	0,97	1,24	1,04
Heterocigoto p.C56R	0,79	1,24	1,04

SCT, silica clotting time. VVRd, veneno de la víbora de Russel diluido.

8.9. DEFICIENCIA ADQUIRIDA DEL FACTOR XI DE LA COAGULACIÓN

La búsqueda del mecanismo implicado en la deficiencia de FXI detectada en nuestra cohorte de pacientes con aFL positivos demostró que en 3 casos se debía a factores genéticos (dos con la mutación c.403G>T; p.Glu135Ter, y otro con la mutación c.802C>T, p.Arg268Cys, ambas causantes de una deficiencia CRM-). De hecho, estos eran los casos en los que se identificó una concordancia entre los valores coagulométricos y los niveles de FXI en plasma. Sin embargo, en los restantes 10 casos con aFL positivos y deficiencia de FXI identificada con los dos activadores de la ruta de contacto, el estudio molecular no identificó ninguna alteración genética relevante, y los niveles antigénicos de FXI en plasma eran normales o incluso elevados.

La hipótesis que planteamos para justificar estos resultados en pacientes con aFL positivos, fue la posibilidad de que el déficit fuera adquirido y asociado a la presencia de un inhibidor del FXI. Para evaluar esta hipótesis, estudiamos la presencia de un inhibidor realizando la determinación de los valores de FXI:C, empleando sílica como activador, con diluciones seriadas del plasma de cada paciente en plasma deficiente de FXI. Como controles empleamos plasma de un paciente con niveles elevados de FXI y el plasma de un paciente con deficiencia congénita de FXI portador de la mutación p.Pro538Leu en heterocigosis.

Como se observa en la figura 30, la dilución provoca la reducción de los niveles de FXI en los dos controles, mientras que en los pacientes la dilución no afecta en absoluto a los niveles de FXI, sugiriendo la presencia de inhibidores en estos pacientes (Figura 30).

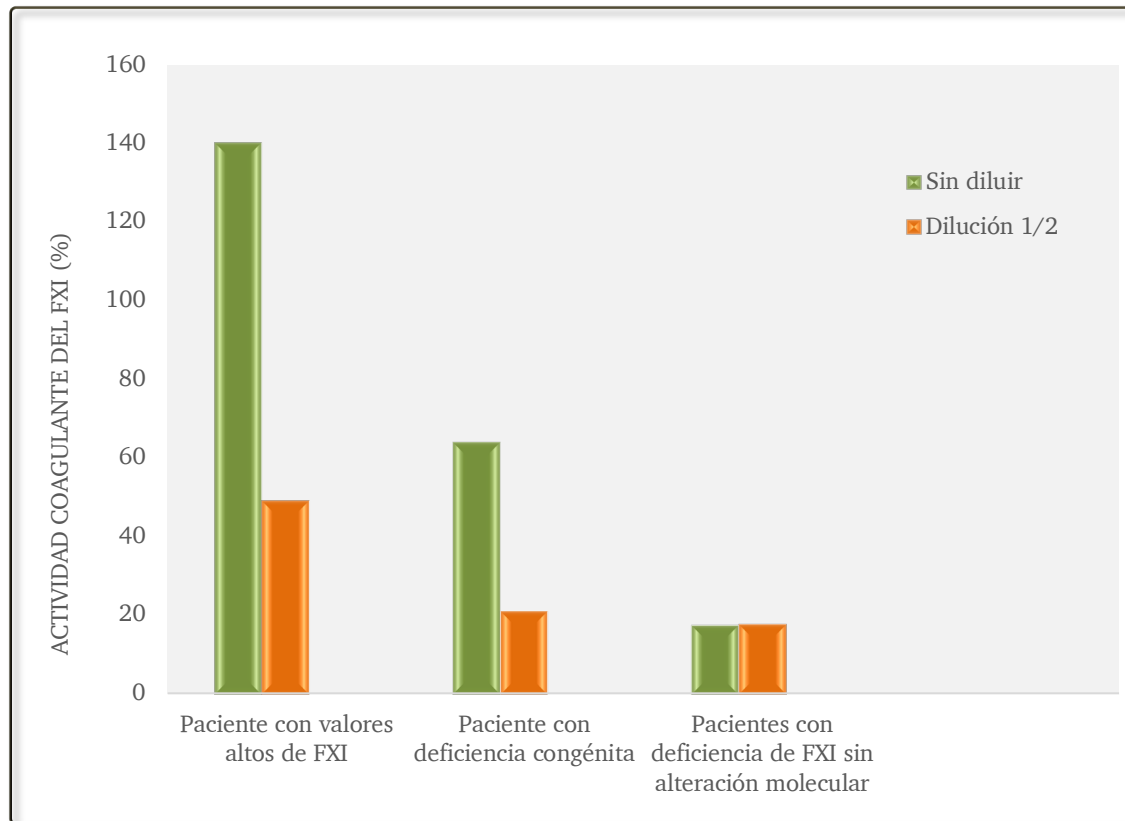


Figura 30. Evolución de los niveles de FXI:C determinados mediante SyntASil en plasma sin y con dilución con plasma deficiente en FXI.

8.10. FXI COMO MARCADOR PRONÓSTICO EN PACIENTES CON aFL POSITIVOS: ANÁLISIS ESTADÍSTICO MULTIVARIADO

Para analizar los posibles factores de riesgo independientes de evento clínico (evento tromboembólico y/o comorbilidad obstétrica) en los pacientes con aFL positivos, construimos distintos modelos estadísticos multivariados mediante regresión logística binaria (Tablas 20-23).

8.10.1. Modelo estadístico multivariable de predicción del riesgo de evento clínico en pacientes con aFL

En el modelo multivariable de regresión logística binaria, para predecir factores de riesgo independientes de evento clínico en los pacientes con aFL positivos, se incluyeron todas las variables que fueron estadísticamente significativas en el análisis univariante y aquellas clínicamente relevantes.

El modelo fue estadísticamente significativo $X^2 = 28,8$; $p < 0,001$. El modelo explica el 19,4% (R^2 de Nagelkerke) de la varianza en la presencia de evento clínico y clasifica correctamente el 65,2% de los casos.

Las variables que se asociaron de manera independiente a la presencia de evento clínico (trombótico y/u obstétrico) fueron: dislipemia (OR= 2,16; IC 95% [1,12– 4,16]; $p = 0,021$), AL (OR= 2,22; IC 95% [1,12 – 4,45]; $p = 0,025$), a β 2GP1 IgM (OR= 0,39; IC 95% [0,17 – 0,93]; $p = 0,034$), FXI:C >150% (OR= 11,57; IC 95% [1,47 – 90,96]; $p = 0,020$) (Tabla 20).

Tabla 20. Modelo multivariable de regresión logística binaria con los factores predictores independientes de evento clínico.

	B	Error estándar	OR	IC95%	p valor
Dislipemia	0,770	0,334	2,16	1,12 – 4,16	0,021
AL	0,797	0,355	2,22	1,12 – 4,45	0,025
a β 2GP1 IgM	- 0,930	0,438	0,39	0,17 – 0,93	0,034
FXI:C > 150%	2,448	1,052	11,57	1,47 – 90,96	0,020

AL, anticoagulante lúpico. aβ2GP, anticuerpos anti-β2GP1. OR, odds ratio. IC, intervalos de confianza.

8.10.2. Modelo estadístico multivariable de predicción del riesgo de evento clínico en pacientes con aFL

En el modelo multivariable de regresión logística binaria, para predecir factores de riesgo independientes de evento clínico en los pacientes con aFL positivos, se incluyeron todas las variables que fueron estadísticamente significativas en el análisis univariante y aquellas clínicamente relevantes.

El modelo multivariable de regresión logística fue estadísticamente significativo $X^2 = 26,8$; $p < 0,001$. Este modelo no se diferencia prácticamente del anterior ya que explica el 18% (R^2 de Nagelkerke) de la varianza en la presencia de evento clínico y clasifica correctamente el 65,1% de los casos.

Las variables que se asociaron de manera independiente a la presencia de evento clínico (trombótico y/u obstétrico) fueron: AL (OR= 2,54; IC 95% [1,27 – 5,08]; $p = 0,009$), β2GP1 IgG (OR= 0,38; IC 95% [0,19 – 0,76]; $p = 0,006$), FXI:C >150% (OR= 17,76; IC 95% [2,25 – 140,42]; $p = 0,006$) (Tabla 21).

Tabla 21. Modelo multivariable de regresión logística binaria con los factores predictores independientes de evento clínico.

	B	Error estándar	OR	IC95%	<i>p</i> valor
AL	0,932	0,355	2,54	1,27 – 5,08	0,009
a β 2GP1 IgG	-0,966	0,353	0,38	0,19 – 0,76	0,006
FXI:C > 150%	2,877	1,055	17,76	2,25 – 140,42	0,006

AL, anticoagulante lúpico. a β 2GP1, anticuerpos anti- β 2GP1. OR, odds ratio. IC, intervalos de confianza.

8.10.3. Modelo estadístico multivariable de predicción del riesgo de evento clínico en pacientes con aFL

En el modelo multivariable de regresión logística binaria, para predecir factores de riesgo independientes de evento clínico en los pacientes con aFL positivos, se incluyeron todas las variables que fueron estadísticamente significativas en el análisis univariante y aquellas clínicamente relevantes.

El modelo multivariable de regresión logística fue estadísticamente significativo $X^2 = 24,7$; $p < 0,001$. Este modelo es el que logra mayor grado de predicción ya que explica el 16,8% (R^2 de Nagelkerke) de la varianza en la presencia de evento clínico y clasifica correctamente el 66,3% de los casos.

Las variables que se asociaron de manera independiente a la presencia de evento clínico (trombótico y/u obstétrico) fueron: dislipemia (OR= 2,31; IC 95% [1,19– 4,45]; $p = 0,013$), AL (OR= 2,27; IC 95% [1,14 – 4,49]; $p = 0,019$), a β 2GP1 IgM (OR= 0,36; IC 95% [0,15 – 0,86]; $p = 0,021$), FXI:C < 70% (OR= 0,18; IC 95% [0,04 – 0,86]; $p = 0,020$) (Tabla 22).

Tabla 22. Modelo multivariable de regresión logística binaria con los factores predictores independientes de evento clínico.

	B	Error estándar	OR	IC95%	p valor
Dislipemia	0,836	0,335	2,31	1,19 – 4,45	0,013
AL	0,818	0,349	2,31	1,14 – 4,49	0,019
a β 2GP1 IgM	- 1,014	0,439	0,36	0,15 – 0,86	0,032
FXI:C < 70%	-1,738	0,347	0,176	0,36 – 0,86	0,032

AL, anticoagulante lúpico. a β 2GP, anticuerpos anti- β 2GP1. OR, odds ratio. IC, intervalos de confianza.

8.10.4. Modelo estadístico multivariable de predicción del riesgo de evento clínico en pacientes con aFL

En el modelo multivariable de regresión logística binaria, para predecir factores de riesgo independientes de evento clínico en los pacientes con aFL positivos, se incluyeron todas las variables que fueron estadísticamente significativas en el análisis univariante y aquellas clínicamente relevantes.

El modelo multivariable de regresión logística fue estadísticamente significativo $X^2 = 23,5$; $p < 0,001$. El modelo explica el 15,9% (R^2 de Nagelkerke) de la varianza en la presencia de evento clínico y clasifica correctamente el 66,1% de los casos.

Las variables que se asociaron de manera independiente a la presencia de evento clínico (trombótico y/u obstétrico) fueron: dislipemia (OR= 2,03; IC 95% [1,06 – 3,89]; $p= 0,033$), AL (OR= 2,4; IC 95% [1,20 – 4,79]; $p= 0,013$), a β 2GP1 IgG (OR= 0,44; IC 95% [0,22 – 0,87]; $p= 0,019$), FXI:C < 70% (OR= 0,29; IC 95% [0,05 – 0,85]; $p= 0,029$) (Tabla 23).

Tabla 23. Modelo multivariable de regresión logística binaria con los factores predictores independientes de evento clínico.

	B	Error estándar	OR	IC95%	<i>p</i> valor
Dislipemia	0,708	0,333	2,03	1,06 – 3,89	0,033
AL	0,875	0,352	2,40	1,20 – 4,79	0,013
a β 2GP1 IgG	-0,823	0,351	0,44	0,22 – 0,87	0,019
FXI:C < 70%	-1,530	0,700	0,29	0,05 – 0,85	0,029

AL, anticoagulante lúpico. a β 2GP, anticuerpos anti- β 2GP1. OR, odds ratio. IC, intervalos de confianza.

8.11. ESCALA aGAPSS

Savino Sciascia y su equipo de investigación elaboraron en 2013 la escala GAPSS con el fin de mejorar la predicción de eventos trombóticos y/o comorbilidad obstétrica en pacientes con LES (144). Unos años más tarde fue validada la escala aGAPSS, una versión ajustada del GAPSS (148,149), resultado de excluir la determinación de aPS/PT, al tratarse de una determinación poco frecuente en la práctica clínica diaria (146,148).

8.11.1. Determinación de la escala aGAPSS en nuestra cohorte

Calculamos el valor de la escala aGAPSS en cada uno de los pacientes de nuestro estudio. Como explicamos en el apartado “7.7.2.1 Escala de riesgo trombótico en pacientes con SAF: GAPSS ajustado o aGAPSS, de Material y métodos”, las variables a puntuar en esta escala son: hiperlipidemia (3 puntos), hipertensión arterial (1 punto), aCL IgG/IgM (5 puntos), a β 2GP1 IgG/IgM (4 puntos) y AL (4 puntos). La puntuación que puede obtener un paciente variaría entre de 0 y 17. En nuestra serie el valor medio fue de 5,51, aunque encontramos pacientes con los valores extremos de la escala: mínimo (0) y máximo (17).

8.11.1.1. Análisis del poder discriminativo de evento clínico de la escala aGAPSS en los pacientes de nuestra cohorte

Comparamos el valor obtenido de la escala aGAPSS entre los casos con antecedente de algún evento clínico (pacientes del grupo SAF y grupo TROM) y los pacientes sin antecedente de evento trombótico ni obstétrico (pacientes del grupo AAF y grupo SAN).

Los pacientes del grupo SAF y del grupo TROM mostraron valores de aGAPSS más altos ($6.519 \pm DE 4,61$) en comparación con los pacientes sin antecedentes de eventos trombóticos ni obstétricos ($4.69 \pm DE 5,09$) ($p < 0,001$) (Figura 31). Mediante curvas ROC analizamos el poder discriminativo de la escala aGAPSS para detectar evento clínico en nuestra muestra: Área bajo la

curva (AUC, del inglés *area under curve*) = 0,62; IC 95% [0,56 – 0,68]; $p < 0,001$ (Figura 32).

El cálculo del AUC para diferentes puntos de corte de la escala aGAPSS demostró que un valor ≥ 4 tenía una mejor precisión discriminativa de evento clínico (AUC = 0,62; IC 95% [0,56 – 0,68]; $p < 0,001$) en nuestra población.

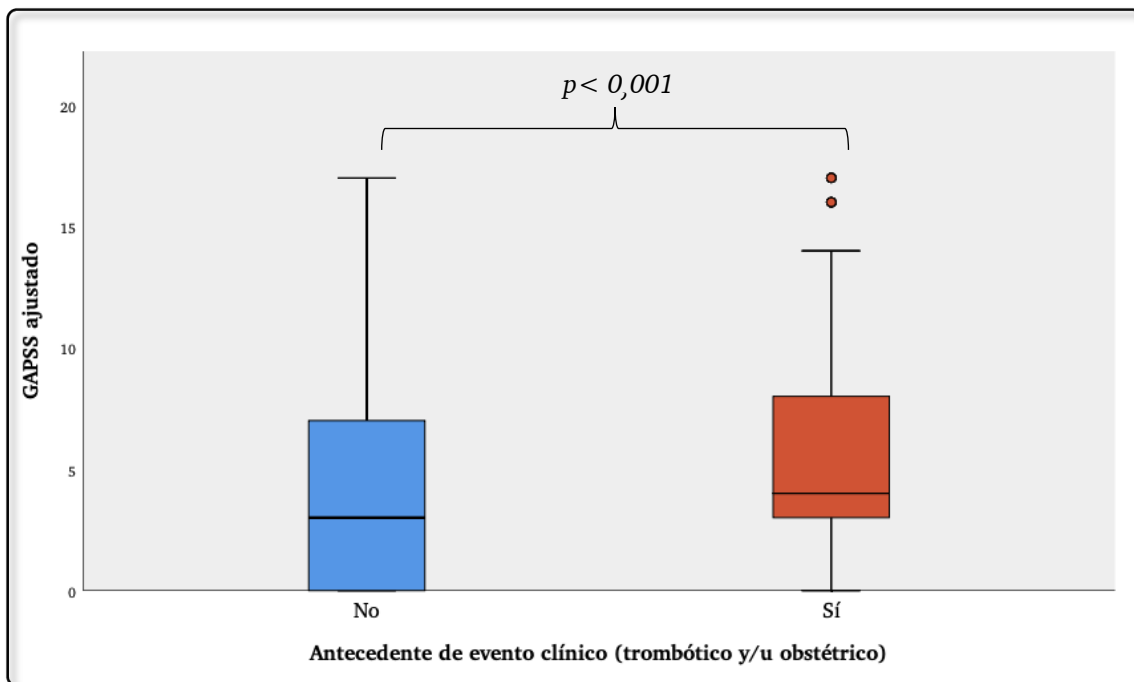


Figura 31. Comparación de medias de la escala aGAPSS entre los pacientes con antecedente de evento clínico y pacientes sin antecedentes de evento tromboembólico ni de comorbilidad obstétrica de nuestra cohorte.

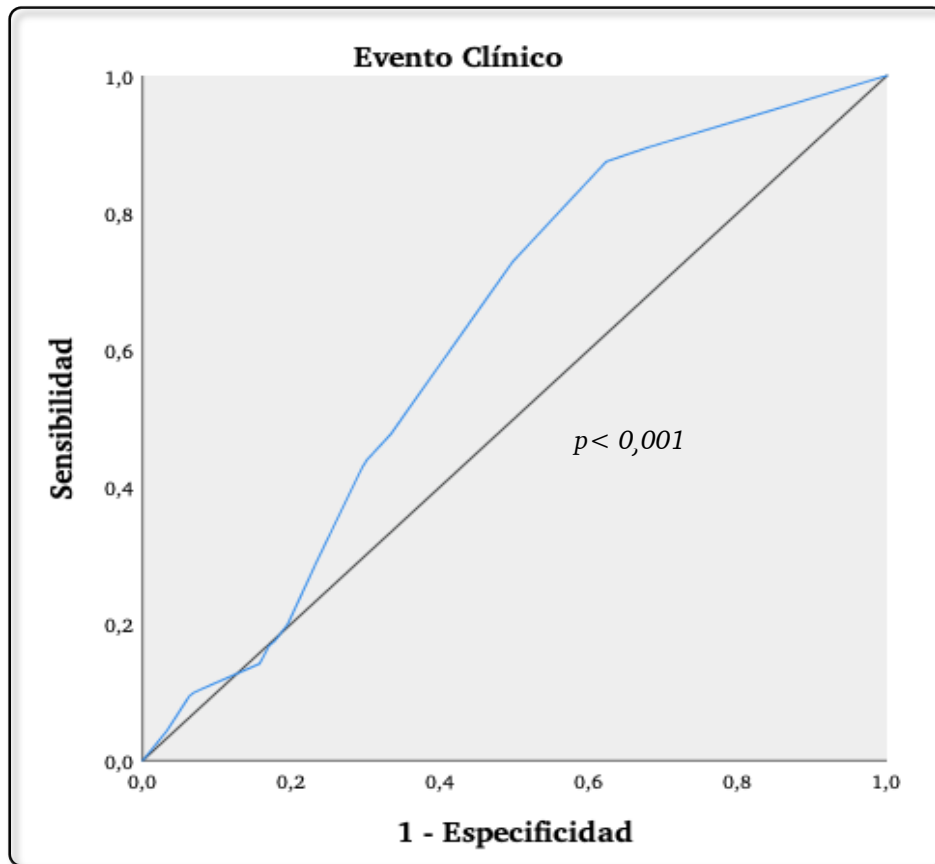


Figura 32. Curva ROC que muestra la capacidad discriminativa de la escala aGAPPS para evento clínico en nuestra muestra.

8.11.1.2. Análisis del poder discriminativo de evento clínico de la escala aGAPSS entre nuestros pacientes con aFL positivos

No hallamos diferencias significativas en el valor de aGAPSS entre los pacientes con diagnóstico de SAF (trombótico y/u obstétrico) y los portadores asintomáticos de aFL (Mann-Whitney $U= 4.206$; $Z= -1,01$; $p= 0,314$) (Figura 33). Mediante curvas ROC analizamos el poder discriminativo de la escala aGAPSS para detectar evento clínico en los pacientes de nuestra muestra con aFL positivos (AUC= 0,542; IC 95% [0,46 – 0,63]; $p= 0,318$) (Figura 34)

También comparamos el valor de la escala aGAPSS entre SAF trombóticos, excluyendo los pacientes con SAF puramente obstétrico, y los pacientes del grupo AAF, sin encontrar diferencias significativas (Mann-Whitney $U= 3.890$; $Z= -1,14$; $p= 0,255$).

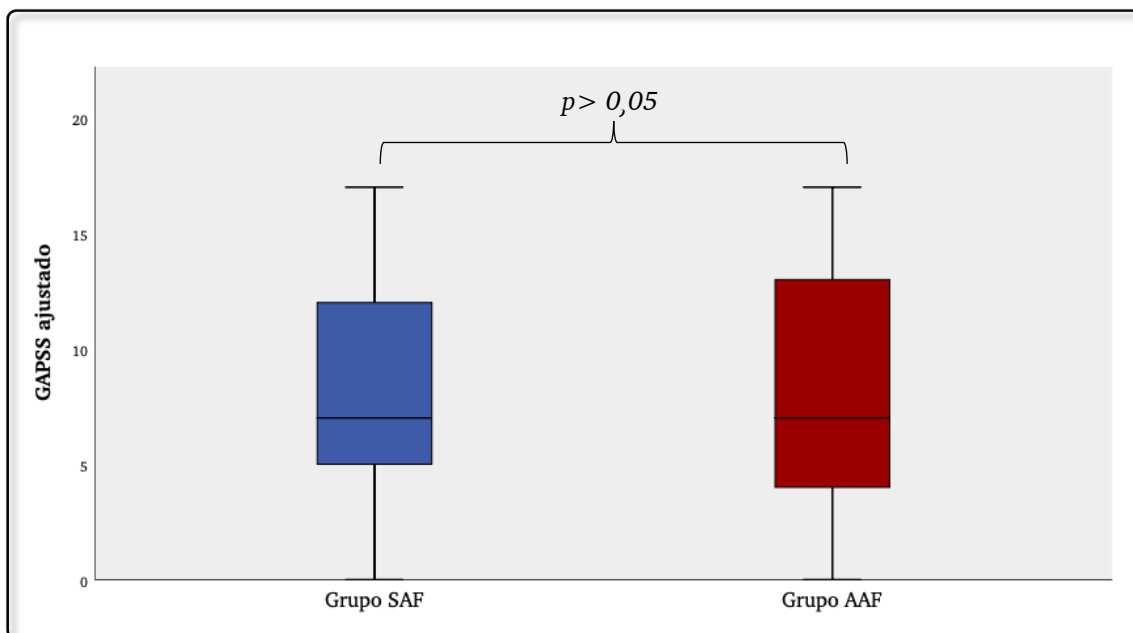


Figura 33. Comparación de medias de la escala aGAPSS entre los pacientes del grupo SAF y los portadores asintomáticos de aFL.

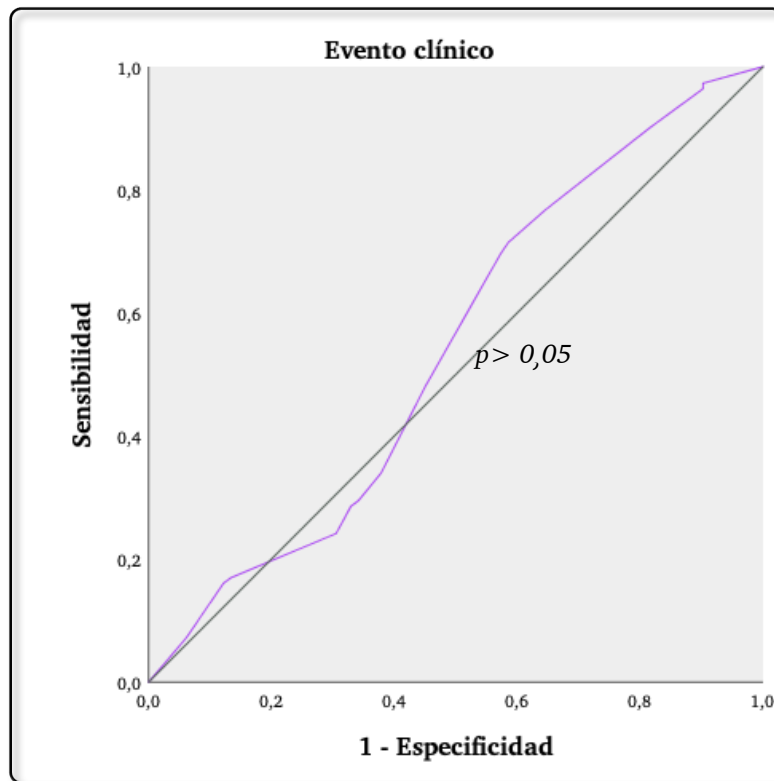


Figura 34. Análisis de la capacidad discriminativa de evento clínico de la escala aGAPPS en nuestros pacientes con anticuerpos antifosfolípidos positivos.

8.12. ESCALA APS-FXI

Con los datos observados en los pacientes de nuestra serie y los resultados obtenidos en el análisis multivariado, nos planteamos, basándonos en un modelo estadístico similar al de Sciascia y col., la elaboración de una nueva herramienta para la estimación de riesgo de evento clínico (trombótico y/u obstétrico) en pacientes con aFL positivos, y en el que se incluyera, por primera vez, la actividad coagulante del FXI de la coagulación. Una escala que pudiera ser empleada como herramienta diagnóstica y pronóstica en pacientes con aFL positivos, a la que denominamos escala *Antiphospholipid Syndrome-FXI* (APS-FXI).

Siguiendo la misma metodología que la empleada para la elaboración de la escala GAPSS, realizamos un puntaje predictivo basado en el coeficiente B de cada variable obtenido en el análisis multivariado. De esto modo, asignamos a cada variable un valor: (+1) en el caso de la dislipemia, (+1) para el AL positivo, (-1) para el isotipo IgG del a β 2GP1, (+3) para el exceso de FXI (FXI:C >150) y (-2) en caso de deficiencia de FXI (FXI:C < 70%) (Tabla 24).

Tabla 24. Puntuación asignada a cada variable según su coeficiente B obtenido en el análisis multivariado.

Variable	Puntuación
Dislipemia	+1
AL	+1
aβ2GP1 IgM	-1
aβ2GP1 IgG	-1
FXI > 150%	+3
FXI < 70%	-2

AL, anticoagulante lúpico. a β 2GP, anticuerpos anti- β 2GP1. FXI, factor XI de la coagulación.

8.12.1. Evaluación del poder predictivo de la escala APS-FXI

Para obtener la escala APS-FXI con mejor poder predictivo de evento clínico, elaboramos cuatro posibles modelos de la escala (Tabla 25). En cada modelo incluimos las variables obtenidas como factores de riesgo independiente de evento clínico en cada modelo estadístico multivariable (Tablas 20-23).

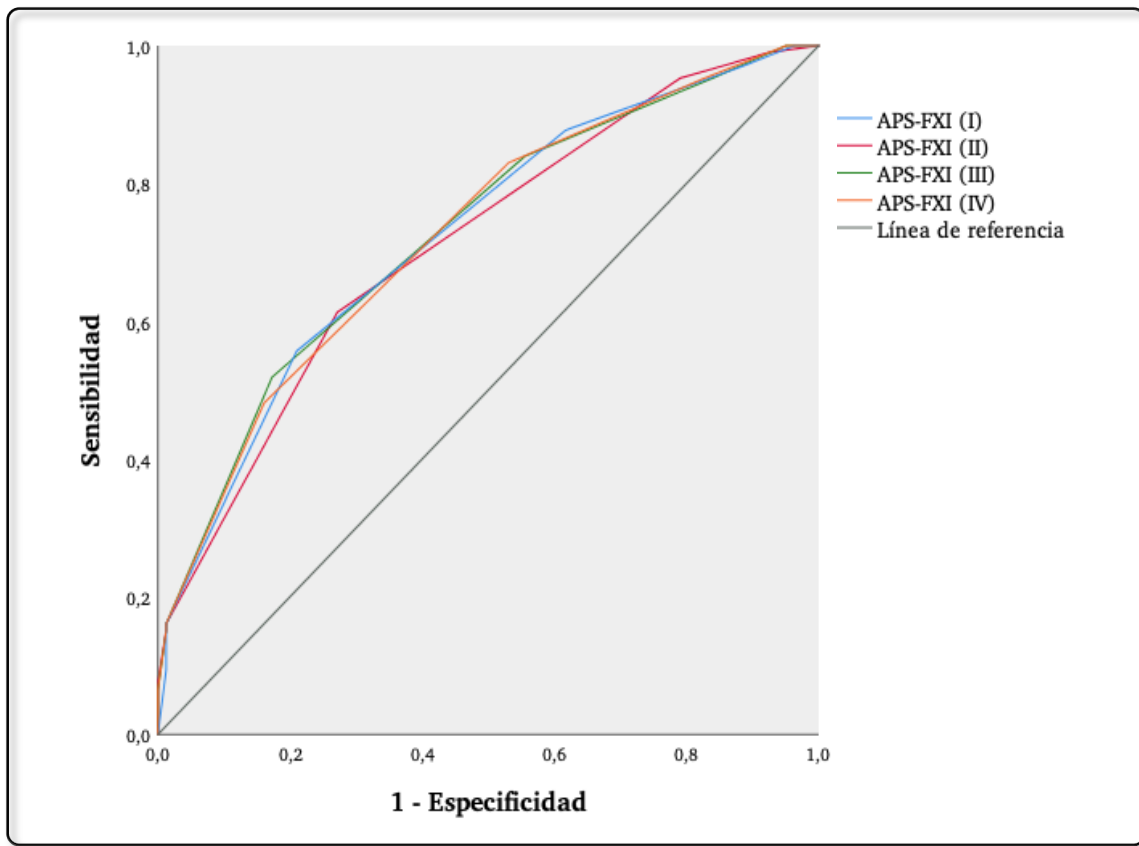
Tabla 25. Modelos evaluados para determinar la capacidad predictiva de la escala APS-FXI.

APS-FXI (I)	APS-FXI (II)	APS-FXI (III)	APS-FXI (IV)
Dislipemia		Dislipemia	Dislipemia
AL	AL	AL	AL
aβ2GP1 IgM	aβ2GP1 IgG	aβ2GP1 IgG	aβ2GP1 (IgM y/o IgG)
FXI > 150%	FXI > 150%	FXI > 150%	FXI > 150%
FXI < 70%	FXI < 70%	FXI < 70%	FXI < 70%

AL, anticoagulante lúpico. aβ2GP, anticuerpos anti-β2GP1. FXI, factor XI de la coagulación.

Calculamos el valor obtenido para cada modelo de la escala APS-FXI en todos los pacientes con aFL positivos de nuestra muestra. En todos los modelos se detectaron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre los pacientes con y sin antecedente de evento clínico.

Mediante curvas ROC determinamos que la escala APS-FXI (III) fue el modelo con mayor capacidad predictiva de evento clínico (Figura 35).



Escala	AUC	IC 95%	p
APS-FXI (I)	0,725	0,65 – 0,79	<0,001
APS-FXI (II)	0,713	0,64 – 0,79	<0,001
APS-FXI (III)	0,728	0,66 – 0,80	<0,001
APS-FXI (IV)	0,726	0,65 – 0,79	<0,001

Figura 35. Curvas ROC de los modelos propuestos en la escala APS-FXI para determinar la capacidad predictiva de evento clínico en pacientes con aFL.

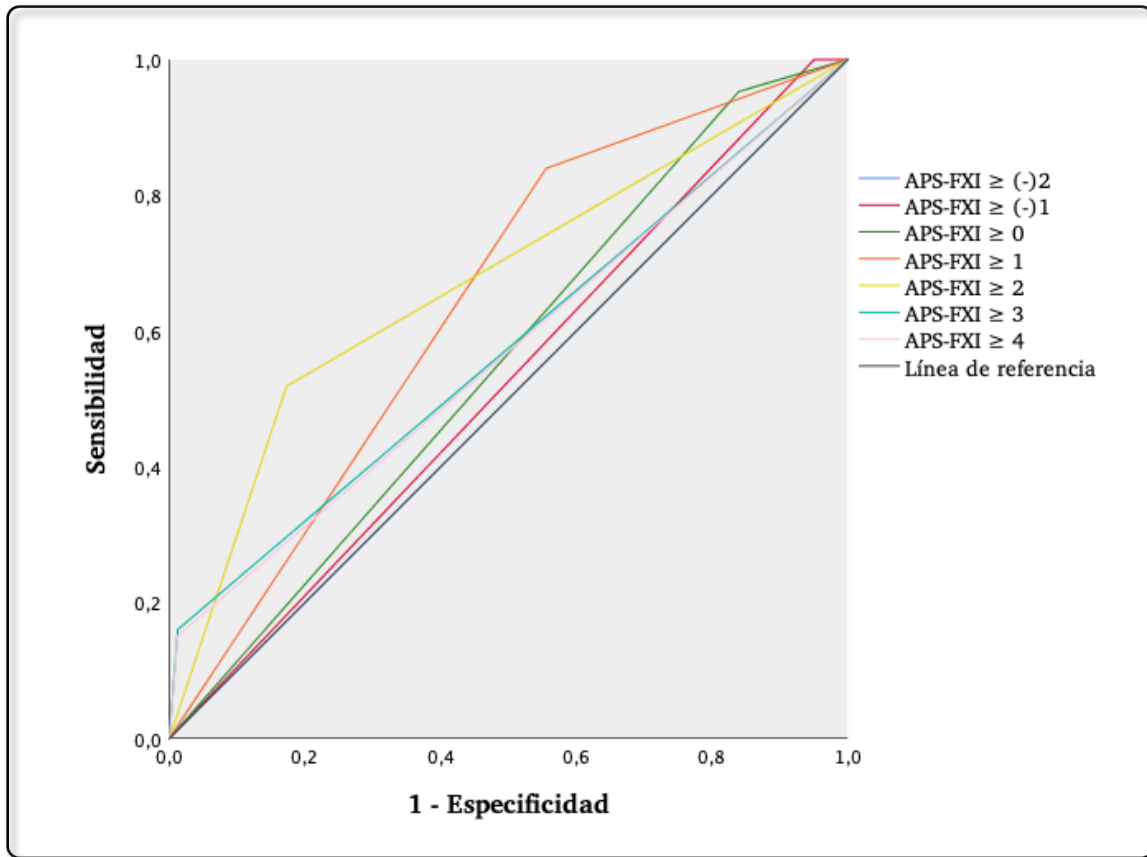
En la tabla 26 se muestra el modelo final de la escala APS-FXI, con las variables incluidas en la escala y su puntuación. El valor de la escala puede variar entre -3 y +5 (Tabla 26).

Tabla 26. Escala APS-FXI, escala para estimar el riesgo de evento clínico en pacientes con aFL positivo.

APS-FXI	Puntuación
Dislipemia	+1
AL	+1
aβ2GP1 IgG	-1
FXI > 150%	+3
FXI < 70%	-2

AL, anticoagulante lúpico. aβ2GP, anticuerpos anti-β2GP1. FXI, factor XI de la coagulación.

El cálculo del AUC para distintos puntos de corte de la escala APS-FXI demostró que un valor ≥ 2 tenía una mayor precisión discriminativa de evento clínico (AUC= 0,673, IC 95% [0,59-0,75]; $p < 0,001$ (Figura 36).



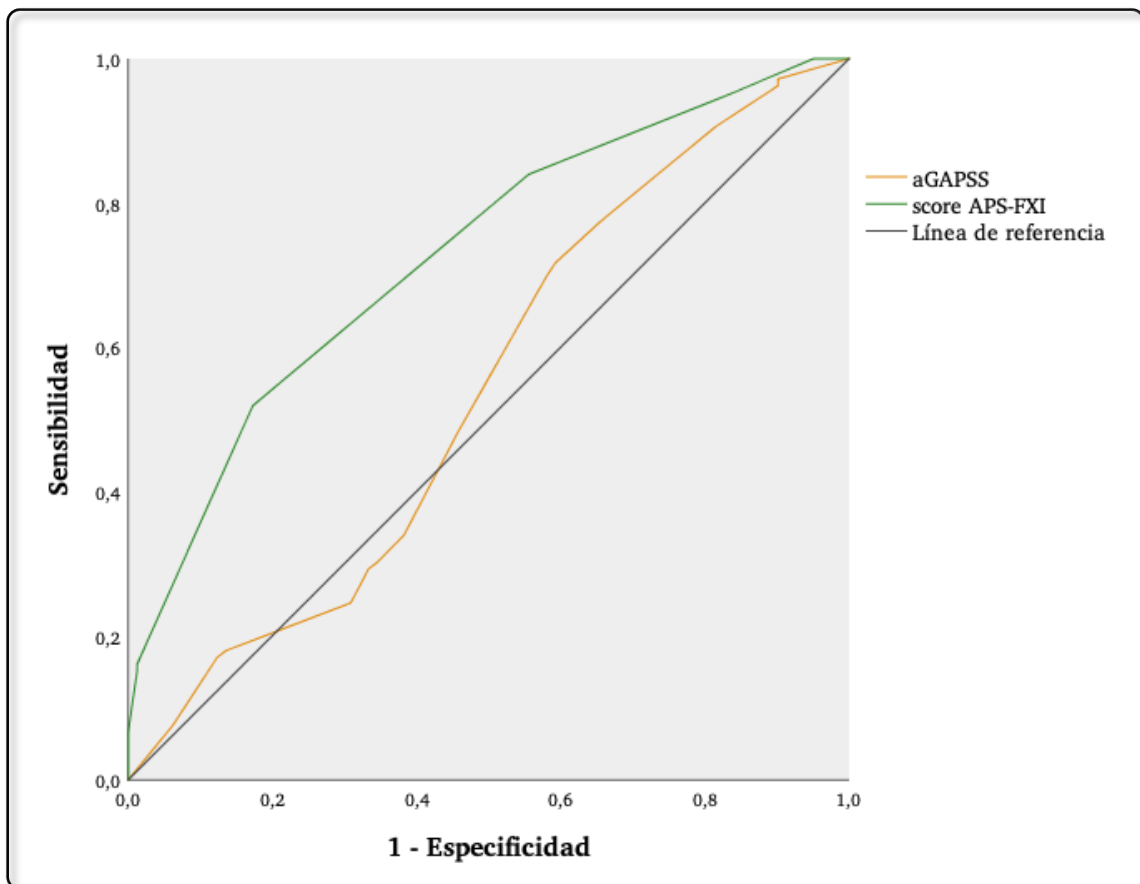
Cuts off score APS-FXI	AUC	IC 95%	p valor
APS-FXI \geq (-)1	0,525	0,44 – 0,61	0,563
APS-FXI \geq 0	0,557	0,47 – 0,64	0,185
APS-FXI \geq 1	0,642	0,56 – 0,72	0,001
APS-FXI \geq 2	0,673	0,59 – 0,75	<0,001
APS-FXI \geq 3	0,574	0,49 – 0,66	0,083

Figura 36. Análisis de los puntos de corte de la escala APS-FXI para determinar el de mayor precisión predictiva de evento clínico en pacientes con aFL.

8.13. ANÁLISIS COMPARATIVO DEL PODER PREDICTIVO DE EVENTO CLÍNICO EN NUESTRA MUESTRA ENTRE LA ESCALA AGAPSS Y DE LA ESCALA APS-FXI

Realizamos un análisis comparativo mediante curvas ROC del poder discriminativo de evento clínico de la escala aGAPSS y de la escala APS-FXI, entre nuestros pacientes con aFL positivos.

La curva ROC confirma un mejor ajuste para la escala APS-FXI en nuestra cohorte (Figura 37).



	AUC	IC 95%	<i>p</i>
Escala APS-FXI	0,728	0,66 – 0,80	<0,001
Escala aGAPSS	0,542	0,46 – 0,63	0,329

Figura 37. Análisis por curvas ROC. Escala APS-FXI *versus* aGAPSS en la predicción de evento clínico en nuestros pacientes con aFL.

9. DISCUSIÓN

9. DISCUSIÓN

En los últimos 10 años hemos asistido a un renacimiento de la ruta de contacto. De no tener prácticamente relevancia fisiológica, los factores de la coagulación FXI y FXII han emergido como elementos claves en el riesgo trombótico, con apasionantes perspectivas terapéuticas (315).

Nuestro estudio, realizado en una cohorte destacada de pacientes con aFL, muestra nuevas evidencias que soportan, en un nuevo contexto, el de la enfermedad autoinmune en general y en el de los aFL en particular, el papel relevante que puede jugar el FXI en las complicaciones trombóticas asociadas al SAF. De hecho, hemos desarrollado un modelo de estimación de riesgo trombótico en pacientes con aFL positivos, en el que el nivel de FXI tiene un gran peso, que puede servir como herramienta que ayude al médico en la práctica clínica diaria para un mejor abordaje diagnóstico y terapéutico de estos pacientes. Nuestro estudio es un nuevo certificado del efecto antitrombótico que tiene la reducción de los niveles de FXI, mostrando por primera vez su potencial eficacia en pacientes con aFL positivos y pacientes con diagnóstico de SAF, y cuyas posibilidades terapéuticas deben ser exploradas en estudios futuros.

Además, este estudio aporta nuevas pruebas de que la deficiencia congénita de FXI se encuentra subestimada, precisamente porque no tiene grandes implicaciones clínicas negativas y existen importantes limitaciones diagnósticas.

Finalmente, nuestro trabajo plantea dudas sobre la interferencia que la deficiencia de FXI pudiera tener en la determinación del AL y ofrece resultados que avalan la necesidad de realizar el test de mezclas en los casos con AL positivo.

9.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y ANALÍTICAS DE NUESTRA POBLACIÓN

Las características clínicas y analíticas de nuestra cohorte de pacientes son similares a las descritas en otros estudios.

9.1.1. Características generales de los pacientes del grupo SAF

El SAF es una enfermedad autoinmune-sistémica, con un perfil trombótico e inflamatorio, que se caracteriza por cumplir, al menos, un criterio clínico (presentar un evento trombótico en territorio venoso, arterial y/o de pequeño vaso, y/o antecedente de comorbilidad obstétrica) y un criterio de laboratorio (positividad persistente de alguno de los tres tipos de aFL incluidos en los criterios clasificatorios de SAF: AL, aCL, a β 2GP1) (1).

El diagnóstico de SAF suele realizarse en individuos relativamente jóvenes. En *The Euro-Phospholipid Project*, que incluía un total de 1000 pacientes con SAF, de los cuales 531 estaban diagnosticados de SAFp, la edad media a la inclusión en el estudio fue de 42 ± 14 años (2,92). En el estudio de Girón-González y colaboradores, la edad media de los pacientes con SAFp fue de $44,6 \pm 15,2$ (370). En nuestra población la edad media observada en los pacientes con diagnóstico de SAF a la inclusión en el proyecto fue $51,3 \pm 12,8$ años, ligeramente superior a la observada en otros estudios. En los dos trabajos mencionados, los criterios empleados en el diagnóstico de SAF fueron los criterios preliminares de SAF establecidos en Sapporo en 1999 (41), pudiendo ser esta una de las razones de la diferencia observada. En el estudio de la Dra. Fernández Mosteirín, en el que se emplearon los criterios de Sidney de 2006, como en nuestra población, la edad media en el grupo de pacientes con SAFp fue de $53,15 \pm 15,32$, similar a la observada en nuestra serie.

En cuanto a la proporción de hombres y mujeres en el grupo SAF de nuestra muestra, observamos una ratio mujer:hombre de 0,93:1; similar a la observada en otros estudios en los que se analizaron grupos de pacientes con SAFp (7,38,371).

Entre las manifestaciones “no criterio” de SAF, se ha descrito que la aparición de trombocitopenia, leucopenia, artritis y *livedo reticularis*, son más frecuentes en pacientes con SAFs, sobre todo en los casos asociados al LES (7).

La prevalencia de estas entidades es muy baja en nuestra cohorte debido a que no incluimos casos de SAFs.

9.1.2. Prevalencia de factores de riesgo cardiovascular clásicos

Los fenómenos trombóticos son una patología multifactorial en la que intervienen numerosos factores (372). Se ha demostrado que los aFL incrementan el riesgo de sufrir un evento trombótico (13,71,372), y el riesgo trombótico en pacientes con aFL positivos aumenta en presencia de FRCV clásicos como tabaquismo, HTA y DLP (72,370,373,374).

Es relativamente frecuente identificar uno o más FRCV entre los pacientes con aFL positivos y que además tienen antecedentes de haber presentado algún evento tromboembólico. Podemos encontrar varios estudios en los que se ha identificado a la HTA como un factor de riesgo independiente de trombosis arterial en pacientes portadores de aFL (97,137,373). En una de las escalas para estimación del riesgo trombótico y diagnóstico de SAF en pacientes con LES, el *score* GAPSS, se incluyeron la HTA y la DLP, junto con la presencia de aFL, como factores de riesgo independiente de trombosis (144).

En nuestra población, la dislipemia fue el FRCV más prevalente, presente en un 60% de toda la muestra, seguida del tabaquismo (55,7%), sedentarismo (51,7%), HTA (38,3%), obesidad (29,4%) y DM (12%). El 92,6% de los participantes en el estudio tenían al menos un FRCV. El diagnóstico de HTA, DLP y obesidad fue más frecuente entre los pacientes con antecedentes de patología trombótica (grupo SAF y grupo TROM) en comparación con los pacientes sin antecedentes de evento clínico (grupo SAN y grupo AAF), y la presencia de al menos un FRCV fue significativamente mayor en los pacientes con algún antecedente trombótico.

Al analizar en nuestra muestra la prevalencia de FRCV entre los pacientes del grupo SAF y los portadores asintomáticos de aFL, la HTA, la DLP y un $IMC > 30 \text{ Kg/m}^2$, tuvieron una proporción significativamente mayor en el grupo SAF, como está descrito en otros trabajos. En el análisis multivariante, la dislipemia

fue el único factor de riesgo cardiovascular que se mantuvo como factor de riesgo independiente de trombosis.

En cuanto al perfil de riesgo cardiovascular en nuestra población observamos, mediante el empleo de la tabla SCORE de riesgo cardiovascular, calibrada para población española, que los pacientes del grupo SAF presentaban un SCORE de mayor riesgo en comparación con los portadores asintomáticos de aFL.

9.1.3. Factores de riesgo asociados con trombosis venosa

La aparición de un primer evento tromboembólico venoso en portadores de aFL es más frecuente en presencia de factores de riesgo adicionales para trombosis venosa (69). En nuestra población, un 35,6% de los pacientes con antecedente trombótico (grupo SAF y grupo TROM) presentaban un factor de riesgo asociado a trombosis venosa. Los más frecuentes fueron la inmovilización prolongada (8,4%), el antecedente de fractura y/o traumatismo reciente (8,4%) y el tratamiento hormonal en el momento del evento clínico (8,4%).

El tratamiento hormonal en el momento del evento clínico se mantuvo como factor de riesgo independiente para trombosis en territorio venoso tras el análisis multivariado; resultados comparables a los que podemos encontrar en estudios anteriores (371,375).

9.1.4. Tipo y localización de los eventos trombóticos

La trombosis en territorio venoso es la manifestación clínica de debut más prevalente en el SAF, y la TVP es la localización más frecuente (2,44,376). En cuanto a las trombosis en lecho arterial en pacientes con SAF, el SNC es el más afectado, siendo la manifestación más común el ictus isquémico y el ataque isquémico transitorio (2,8,102).

En nuestra muestra de pacientes con diagnóstico de SAF la localización más frecuente del primer evento trombótico fue similar a la descrita en estudios

previos. La trombosis venosa fue la más prevalente (73,3%), en particular la TVP (49,5%). En cuanto a las trombosis en territorio arterial, el ictus no cardioembólico fue el más frecuente (19%).

9.1.5. Supervivencia libre de trombosis

En el SAF la edad de aparición del primer evento tromboembólico suele estar en torno a la 4ª década de la vida (97,375,377,378). En nuestro trabajo la edad media de aparición del primer evento clínico en los pacientes con diagnóstico de SAF fue de $43,2 \pm 13,4$ años.

En un estudio muy reciente en el que se compara la edad de aparición de un primer evento trombótico venoso idiopático entre pacientes con diagnóstico de SAF y pacientes sin aFL, la edad de aparición del primer evento trombótico en pacientes con SAF fue significativamente menor en comparación con el grupo de pacientes con aFL negativos (378). Al igual que en este trabajo de Yong Sub y colaboradores, la edad media de aparición del primer evento trombótico en nuestro grupo de pacientes con SAF fue significativamente menor a la observada en el grupo de pacientes con antecedente de trombosis y aFL negativos.

9.1.6. Recurrencia trombótica

Se ha descrito que los pacientes con SAF que debutan con un evento tromboembólico en territorio arterial tienen un mayor riesgo de recurrencia trombótica en comparación con aquellos en los que el primer evento clínico se produjo en lecho venoso (131,138). En cuanto a la localización de las recurrencias trombóticas, suelen producirse en el mismo lecho vascular que el primer evento trombótico (130,131).

En nuestra cohorte de pacientes con SAF, un 35,2% presentaron al menos una recurrencia trombótica, porcentaje similar al descrito en otros estudios, como el de Pengo y colaboradores, con una tasa de recurrencia del 34,4% (379,380). Sin embargo, en otras cohortes de pacientes SAF, como la de *The Euro-Phospholipid Project*, la tasa de recurrencia trombótica fue menor. En la

cohorte de Cervera y su equipo de investigación, durante un período de seguimiento de 10 años, la tasa de recurrencia trombótica fue del 16,6% durante los primeros 5 años, y del 15,3% durante el segundo período (2). Probablemente, el hecho de que en esta cohorte se incluyeran pacientes con SAF asociado a otras conectivopatías, y el mayor tiempo de seguimiento, puedan explicar la diferencia observada en la tasa de recurrencia trombótica.

En nuestro grupo SAF la mayoría de las recurrencias trombóticas se produjeron sobre territorio venoso; resultado descrito anteriormente en otros grupos de pacientes con SAFp (371). Por otro lado, en nuestra población, el territorio vascular (arterial o venoso) del primer evento clínico en pacientes con SAF no se asoció con una mayor o menor proporción de recurrencia trombótica.

En cuanto a localización de la recurrencia trombótica, la mayoría se produjeron sobre el mismo lecho vascular que la primera trombosis, como se ha observado en otros trabajos (130,131). En los pacientes con un primer evento clínico en territorio arterial, el 100% de las recurrencias trombóticas se produjeron sobre territorio arterial; y en los casos que debutaron con una trombosis venosa y presentaron una recurrencia trombótica, el 86,2% de las recurrencias se produjeron en lecho vascular venoso.

9.2. PERFIL DE ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS DE NUESTRA POBLACIÓN

9.2.1. Papel de los aFL en el SAF

Existe un grupo muy heterogéneo de anticuerpos relacionados con el SAF; sin embargo, solo tres están incluidos en los criterios actuales empleados para el diagnóstico de la enfermedad (1). Estos anticuerpos son el anticoagulante lúpico (AL), los anticuerpos anti-cardiolipina (aCL) y los anticuerpos anti- β 2GP1 (a β 2GP1). Los pacientes positivos para más de un tipo de aFL suelen tener niveles de anticuerpos más estables en el tiempo (72,183).

Los aFL constituyen el factor etiológico del SAF (1,79), aunque aún no existe un consenso definitivo sobre cuáles son los mecanismos implicados en la patología trombótica mediada por los aFL. Actualmente, una de las teorías más defendidas por la comunidad científica en el proceso patogénico del SAF, es la teoría del “*Second Hit*”, en la cual, los aFL actuarían como un factor inicial necesario o “*first hit*”, creando una situación protrombótica y proinflamatoria, que en presencia de un desencadenante o “*second hit*” podría dar lugar a un evento tromboembólico y/u obstétrico (71,72). Esta hipótesis está sustentada en los numerosos estudios experimentales con distintos modelos animales. La infusión de aFL (*first hit*) en modelos murinos no fue suficiente para desencadenar eventos trombóticos espontáneos; y era necesaria la generación de una pequeña lesión vascular o la inyección de una dosis baja de LPS (*second hit*), para provocar la respuesta trombótica (381,382).

Una de las principales limitaciones con la que nos encontramos al comparar los resultados obtenidos en diferentes estudios relacionados con el SAF es la gran heterogeneidad de: 1) los criterios empleados para la clasificación de los pacientes, y 2) diferentes ensayos, no estandarizados, utilizados para la determinación de los aFL. Además, se han empleado diferentes modelos experimentales en los distintos ensayos clínicos con anticuerpos.

9.2.2. aFL y trombosis

De acuerdo con los resultados de diferentes estudios, que en su mayoría incluyen pacientes con antecedente de LES, los pacientes asintomáticos portadores de aFL positivos tienen un riesgo anual de trombosis entre 0 y un 3,8% (97,383), que asciende al 5.3% en los casos de pacientes con triple positividad (AL, aCL y a β 2GP1 positivos) (384). Entre los diferentes aFL, se ha descrito al AL como factor de riesgo independiente de trombosis, y su positividad persistente como factor de alto riesgo para un primer evento trombótico y de recurrencia trombótica (95,96,142,385).

9.2.2.1. Anticoagulante lúpico

En nuestro estudio hemos confirmado la asociación del AL con los eventos tromboticos del SAF. En el análisis multivariante de nuestra cohorte de pacientes con aFL positivos, el AL fue el único de los anticuerpos que se mantuvo como factor de riesgo independiente de evento clínico en los pacientes con SAF. También se ha demostrado que el AL tiene una asociación más fuerte con la patología trombotica en comparación con el resto de aFL (96). Nuestro análisis también fue consistente con estos resultados, encontrando una asociación más fuerte entre AL y la trombosis, que en el caso de los aCL y los a β 2GP1.

Aunque la presencia de un AL positivo se asocia con un mayor riesgo de patología tromboembólica (96) es necesario conocer el perfil completo de aFL de cada paciente. En los criterios de clasificación del SAF se incluyen el isotipo IgM e IgG de aCL y a β 2GP1, sin embargo, el valor clínico de los anticuerpos IgM en SAF es un tema en continua revisión y debate (203). En el estudio de Chayoua y colaboradores, el isotipo IgM no agregó ningún valor en la asociación trombotica en pacientes con AL positivo e IgG negativos (376). Por otro lado, la positividad para los anticuerpos AL, aCL y a β 2GP1 (con sus dos isotipos IgM e IgG) supuso la correlación más fuerte con la clínica trombotica; concluyendo que los isotipos IgM e IgG tienen un valor agregado en la estratificación del riesgo trombotico en el SAF (376).

9.2.2.2. Anticuerpos anti-cardiolipina

Los aCL y a β 2GP1 son considerados patogénicos y asociados a las manifestaciones clínicas del SAF cuando se presentan a títulos moderados-altos (1). Se ha observado en distintos estudios que la asociación entre los aCL y los eventos clínicos de SAF es más débil en comparación con el resto de aFL (96,100,101).

En nuestra serie, al igual que en la revisión de Galli y colaboradores, no encontramos una clara asociación entre los aCL y la trombosis (96). La discrepancia observada entre los estudios analizados, en relación con la

asociación de los aCL con los eventos trombóticos en el SAF, podría ser el resultado del uso de diferentes ensayos para la determinación de los aCL, y estar asociado también a la heterogeneidad de los criterios empleados para la selección de pacientes en cada estudio.

9.2.2.3. Anticuerpos anti- β 2GP1

El efecto patogénico de los a β 2GP1 en el SAF se ha demostrado en modelos animales *in vivo* (386) y se han descrito como factor de riesgo independiente de trombosis (99,100). Una de las hipótesis sobre el mecanismo de acción de los a β 2GP1 en la patogénesis del SAF plantea que la unión del anticuerpo al complejo formado por la unión de la β 2GP1 a fosfolípidos aniónicos de la membrana celular desencadena diferentes procesos de señalización intracelular que dan lugar un estado procogulante. Se ha relacionado a los a β 2GP1 con la activación de células endoteliales, plaquetas, monocitos, neutrófilos, fibroblastos y trofoblastos, que como resultado da lugar la expresión y liberación de diferentes marcadores de activación (67).

A pesar de que la β 2GP1 se ha descrito como una de las principales dianas de los aFL, con un importante papel en la patogénesis del SAF, su función fisiológica sigue siendo una incógnita, y el mecanismo por el cual los a β 2GP1 se asocian con un mayor riesgo trombótico y de comorbilidad obstétrica no se conoce por completo. Como en el caso de los aCL, se ha observado una asociación más fuerte entre el isotipo IgG de los a β 2GP1 y las manifestaciones clínicas del SAF en comparación con el isotipo IgM (100).

Al igual que en nuestra serie, en algunos estudios no se ha podido demostrar un incremento del riesgo de trombosis (arterial y/o venosa) en pacientes con a β 2GP1 positivos (387,388). Un reciente meta-análisis no pudo demostrar la asociación entre estos anticuerpos y los eventos trombóticos en territorio venoso (389). Los estudios en los que se observa un incremento del riesgo trombótico asociado a los a β 2GP1 este varía entre una OR de 1.6 (IC95%: 1.0–2.6) y 2.4 (IC 95%: 1.3–4.2) en el caso de trombosis venosas (59,99), y una OR entre 2,3 (IC 95%: 1.4–3.7) y 2,5 (IC 95% CI: 1.8– 3.4) en el caso de

trombosis de territorio arterial (9). La ausencia de asociación entre a β 2GP1 y los eventos clínicos del SAF en nuestra población, podría estar relacionado con una prevalencia significativamente mayor de estos anticuerpos en el grupo de portadores asintomáticos de aFL.

En relación con la comorbilidad obstétrica, los datos disponibles muestran resultados contradictorios con respecto a la utilidad de a β 2GP1 en el SAF obstétrico. En un meta-análisis sobre la asociación entre aFL y complicaciones placentarias se concluyó que no se disponían de datos suficientes para establecer una asociación significativa entre el a β 2GP1 y la morbilidad del embarazo en pacientes con SAF (390). Al igual que en el caso de los estudios sobre el SAFt, la evidencia disponible sobre los aFL en el SAFo se ve obstaculizada por los diferentes criterios clínicos empleados para la clasificación de los pacientes, así como por las diferencias metodológicas en los ensayos empleados para la determinación de los anticuerpos.

9.3. FXI DE LA COAGULACIÓN

El proceso de la coagulación se basa en un modelo en cascada descrito por Macfarlane y Earl Davie en 1964 (391,392), que implica la activación secuencial de diferentes zimógenos a su formas enzimáticas activas. La coagulación sanguínea puede iniciarse mediante la exposición del FT al torrente sanguíneo o mediante la activación del FXII al entrar en contacto con superficies con carga negativa, que pueden ser artificiales (como el ácido elárgico y el caolín) o de origen natural (como los polifosfatos y el colágeno) (393,394).

El FXI es el elemento que unifica ambas rutas de activación de la coagulación, ya que es sustrato del FXII pero también de la trombina, y por tanto juega un papel clave en la amplificación de la generación de trombina, en la fase de estabilización del coágulo; función que parece ser particularmente importante en tejidos con alta actividad fibrinolítica, como la orofaringe y el tracto urinario, sitios comunes de hemorragia en pacientes con deficiencia de FXI (260,268). Además, como hemos comentado, el FXI también participa como factor

regulador de la respuesta inflamatoria (272,287), actuando como enlace molecular entre la cascada de la coagulación y el complejo proceso de la inflamación (270–272)

9.3.1. Métodos de determinación de los niveles de FXI y diagnóstico de la deficiencia de FXI

La determinación de los niveles de FXI en plasma se realiza rutinariamente empleando sistemas coagulométricos. En nuestro estudio hemos empleado dos ensayos diferentes para cuantificar la actividad coagulante del FXI en el plasma. En estos tests se emplea plasma citratado del paciente diluido en plasma deficiente de FXI, y dos agentes activadores de la ruta de contacto, los mismos que se usan en la determinación del TTPa: uno de ellos emplea sílice como activador (SynthASil™) y otro se realiza a base de ácido elágico (SynthAFax™). En el estudio de Salloum-Asfar y colaboradores, se demuestra la importante limitación que conlleva el empleo del TTPa como método para el diagnóstico de la deficiencia de FXI, y se objetiva que el test que emplea sílice (SynthASil™) como activador de la ruta de contacto tiene una mayor sensibilidad que el que emplea ácido elágico (SynthAFax™), detectando mayor número de casos con deficiencia congénita de FXI (304).

En nuestro trabajo, al igual que en el estudio de Salloum-Asfar, el reactivo SynthASil™ empleado para determinar los niveles de FXI en los pacientes, demostró ser más sensible en la detección de niveles inferiores del factor en comparación al otro reactivo utilizado a base de ácido elágico, SynthAFax™. El FXI plasmático también se estudió con un método inmunológico (Western blot) que permitió analizar tanto niveles como características del FXI de estos pacientes.

9.3.2. FXI de la coagulación y la patología trombótica

En los últimos años ha cobrado especial interés el estudio del FXI y su participación en la patología trombótica.

Clásicamente se ha considerado, en base a los resultados de diferentes estudios, que los niveles elevados de FXI actúan como factor de riesgo trombótico, tanto en territorio arterial como venoso (273,395,396). Lo más novedoso es la doble cara del FXI en la patología trombótica, ya que recientes estudios realizados en pacientes con deficiencia congénita de FXI muestran una menor incidencia de eventos trombóticos, especialmente en territorio venoso, sugiriendo que la deficiencia de FXI es un factor protector de trombosis (310). En 2019 se publicó un estudio en el que se analiza el papel del FXI en la recurrencia trombótica después de un primer evento tromboembólico venoso idiopático. Los resultados obtenidos sugieren un papel relevante de protección frente a la recurrencia trombótica en los pacientes con niveles bajos de FXI (275). En cuanto a las trombosis en territorio arterial, en un estudio en el que se incluían 115 pacientes con deficiencia grave de FXI (FXI:C <20%), se demostró que el déficit de este factor de la coagulación podría proteger frente a los eventos trombóticos del SNC (310). La influencia del FXI en el IAM es menos clara y está sujeta a controversia (311,313).

En el estudio de Salomon y colaboradores publicado en 2011, trabajo en el que se incluyeron 219 casos con déficit grave de FXI, ninguno de ellos presentó eventos trombóticos venosos (309), y concluyó que los pacientes con deficiencia grave de FXI podrían estar protegidos frente a la TVP, incluso en circunstancias de alto riesgo trombótico, como una cirugía mayor (309).

Sin duda el trabajo de Preis y su equipo de investigación, publicado en la revista *Blood* en 2017, es el más robusto ya que incluye un total de 10193 pacientes, de los cuales 1235 tienen deficiencia de FXI. En este estudio demostraron que la deficiencia de FXI está significativamente asociada con una menor incidencia de eventos cardiovasculares (ictus, AIT e IAM) y también con un menor riesgo de tromboembolismo venoso (311). Es importante indicar que el RR de eventos trombóticos no guardaba relación con el grado de deficiencia, ya que fue similar, y siempre protector, tanto para los pacientes con deficiencia moderada/grave como para los pacientes con deficiencia moderada. Así, el RR para eventos cardiovasculares fue de 0,57 (IC 95%: 0,35-0,93) en pacientes con

deficiencia moderada-grave, y de 0,52 (IC 95%: 0,31-0,87) en pacientes con deficiencia leve de FXI. Además, ninguno de los pacientes con actividad del FXI $\leq 30\%$ presentó un evento tromboembólico venoso durante el seguimiento. Cuando analizaron los casos de trombosis en territorio venoso, el RR en pacientes con FXI $\leq 50\%$ fue de 0,26 (IC 95%: 0,08-0,84) en comparación con los casos con actividad normal, y en los casos con una FXI:C entre un 30% y un 50%, el RR fue de 0,39 (IC 95%: 0,12-1,27).

Es importante destacar que los datos observados en pacientes se validan en todos los modelos experimentales evaluados. Así, independientemente del modelo animal empleado (murino, rata, conejo, primate) y del mecanismo que provoca la deficiencia de FXI: genético (con eliminación de una copia o las dos copias del gen, o con el uso de oligonucleótidos antisentido o siRNA) o con inhibidores del FXI (anticuerpos, pequeñas moléculas, etc), la deficiencia de FXI supone una importante protección antitrombótica en cualquier territorio y empleando diferentes modelos de trombosis (314,318,322,335,345).

Finalmente debemos resaltar el desarrollo de ensayos clínicos que ya han demostrado la eficacia antitrombótica de tratamientos que provocan una deficiencia de FXI (338,352–354,397).

9.3.3. FXI de la coagulación y trombosis en aFL

El papel que el FXI juega en patología trombótica, junto al hecho de que este factor es una proteína que se une a fosfolípidos y por tanto pudiera ser diana de los aFL, fue lo que animó a realizar nuestro estudio y evaluar los niveles de FXI en pacientes con aFL positivos.

Los primeros resultados obtenidos mostraron que había significativamente mayor porcentaje de pacientes con niveles patogénicamente altos de FXI (FXI:C $>150\%$) en el grupo SAF en comparación con el grupo de pacientes portadores asintomáticos de aFL ($p = 0,001$). Así, la detección de niveles de FXI:C $>150\%$ en un paciente con aFL positivos incrementa más de 14 veces el riesgo de padecer un evento trombótico (OR= 14,95; IC95%: 1,95-114,83).

El valor pronóstico de niveles elevados de FXI por tanto se extendería al SAF, pero al igual que ocurre con los pacientes con trombosis causada por otros mecanismos y confirmada en este estudio, queda por determinar cuál es el mecanismo que provoca el aumento de los niveles de FXI en estos pacientes, ya que la búsqueda de elementos genéticos responsables de estos niveles no son concluyentes (273,398–401)

Mucho más sorprendente fue la identificación de una alta prevalencia de casos con déficit de FXI (FXI:C <70%) en los pacientes portadores de aFL sin historia previa de trombosis, 12.2%, superior, con diferencias estadísticamente significativas, a la identificada en pacientes SAF (2.7%) ($p = 0,016$). Estos resultados incorporan otro elemento pronóstico, también relacionado con el FXI pero con signo completamente opuesto, ya que la deficiencia de FXI protegería casi 5 veces de sufrir eventos tromboticos en pacientes con aFL (OR=4,93; IC95%: 1,31 – 18,54).

La deficiencia de FXI identificada en pacientes con aFL era mayoritariamente adquirida, como probaron los estudios de dilución, pero no exclusivamente ya que también identificamos deficiencias congénitas como discutiremos posteriormente.

Nuestra hipótesis es que ciertos tipos de aFL o en ciertos pacientes, son capaces de neutralizar el FXI provocando una deficiencia adquirida, que tendría el mismo efecto funcional y de protección antitrombótica que el de otros anticuerpos anti-FXI (347,348). Quizás los $\alpha\beta 2\text{GP1}$ sean los anticuerpos con más probabilidad de estar implicados en esta deficiencia adquirida. De hecho, la $\beta 2\text{GP1}$ tiene un importante papel en la cascada de la coagulación, siendo una de sus principales acciones anticoagulantes la atenuación de la vía intrínseca, inhibiendo la activación del FXI (229).

La regulación de la activación de la vía de contacto fue la primera función fisiológica que se asignó a la $\beta 2\text{GP1}$ (402). Años más tarde, se demostró que esta proteína era capaz de unirse directamente al FXI e impedir su activación por el factor XIIa y por trombina (243,244,403). Además de la asociación de la $\beta 2\text{GP1}$

con el FXI, y su papel en la coagulación, un estudio *in vitro* mostró que los a β 2GP1 potencian la inhibición de la β 2GP1 sobre el FXI (244). Por tanto, los a β 2GP1 podrían ser elementos implicados en la deficiencia adquirida de FXI observada en este estudio (Figura 28). Es importante destacar que en el grupo AAF de nuestra cohorte observamos un mayor porcentaje de a β 2GP1 IgM ($p=0,031$) y de a β 2GP1 IgG ($p=0,033$) en comparación con el grupo SAF. Este hallazgo podría estar relacionado con la alta prevalencia de déficit de FXI en este grupo. Sin embargo, parece que este no es el único elemento implicado, y por lo tanto es necesario realizar estudios adicionales que permitan validar nuestra hipótesis e identificar los aFL y/o los factores que facilitan esta deficiencia adquirida de FXI. El interés de esta determinación radica en su potencial uso terapéutico.

Finalmente, la identificación del carácter protector del déficit de FXI (congénito o adquirido) en el contexto de una patología tan grave como es el SAF, para la que contamos con un arsenal terapéutico antitrombótico limitado y que además es insuficiente en muchos casos para garantizar la prevención de recurrencia trombótica (2,130,159), plantea la posibilidad de explorar el uso de los nuevos anticoagulantes basados en la inhibición o silenciamiento del FXI en estos pacientes.

9.4. NUEVO MODELO DE ESTRATIFICACIÓN DE RIESGO TROMBÓTICO EN PACIENTES CON aFL POSITIVOS: ESCALA APS_FXI

9.4.1. Modelos de predicción para el diagnóstico de SAF y estimación del riesgo trombótico

En los últimos años se han publicado distintas herramientas y modelos de predicción que ayudan en la estimación del riesgo trombótico en pacientes con diagnóstico de SAF. Entre los trabajos más recientes, en 2012 Otomo colaboradores publicaron el *APL-Score* (143), un modelo predictivo en el que incluyeron la determinación de diferentes y múltiples aFL, ideado para realizar una estimación de riesgo de trombótico y de diagnóstico de SAF. Aunque esta

escala demostró ser una herramienta eficaz en el diagnóstico de SAF, no se incluyó en su elaboración el análisis de los distintos FRCV, asociados al proceso etiológico de la trombosis.

Un año después de la publicación del *APL-Score*, Sciascia y su equipo de investigación, elaboraron *the Global Anti-Phospholipid Syndrome Score* (GAPSS) (144). La escala GAPSS fue diseñada en una población de pacientes con LES, y ha demostrado ser una herramienta válida en la estratificación del riesgo trombotico en pacientes con SAFp, SAFs y pacientes portadores de aFL con antecedente de LES (145,146).

9.4.1.1. *The Global Anti-Phospholipid Syndrome Score* (GAPSS)

La escala GAPSS es uno de los sistemas de puntuación más recientes para cuantificar el riesgo de eventos tromboticos en pacientes con LES y aFL positivos. En su diseño se incluyeron diferentes factores de riesgo asociados a trombosis: FRCV clásicos, perfil de autoinmunidad y positividad de aFL.

El GAPSS está constituido por 6 ítems: 1. HTA; 2. DLP; 3. AL positivo; 4. aCL IgM/IgG positivos; 5. a β 2GP1 IgG/IgM; 6. aPT/aPS IgM/IgG positivos. A cada ítem se le asigna una determinada puntuación, pudiendo alcanzar un máximo de 20 puntos, y cuanto mayor es la puntuación obtenida, mayor es el riesgo trombotico. En el estudio de Sciascia se determinó que un valor de GAPSS ≥ 10 era el que ofrecía una mayor precisión en el diagnóstico de SAF y/o riesgo de evento trombotico.

Más tarde, se validó el GAPSS ajustado (aGAPSS) (146), una forma simplificada de la escala GAPSS en el que se eliminó de los ítems la determinación del complejo formado por aPT/aPS, al no ser empleada de manera rutinaria en el laboratorio, y que ayudó a que este modelo predictivo fuera ampliamente aplicable en la práctica clínica diaria. En el aGAPSS las variables a puntuar serían: DLP (3 puntos), HTA (1 punto), aCL IgG/IgM (5 puntos), a β 2GP1 IgG/IgM (4 puntos) y AL (4 puntos). Por lo tanto, la

puntuación que puede obtener un paciente al aplicar el aGPASS variaría entre de 0 y 17.

Este modelo modificado del GAPSS ha sido validado para estratificar a los pacientes en función de su riesgo trombótico (146,148). En el año 2017, la Dra. Nuria Fernández y su equipo de investigación evaluaron la validez del score aGAPSS como herramienta en la predicción de trombosis en pacientes con SAF y/u otra enfermedad autoinmune sistémica, en un estudio de cohortes retrospectivo (148). En su estudio concluyeron que la escala aGAPSS, con un punto de corte ≥ 5 , constituía un factor de riesgo independiente de trombosis (148).

Como parte de nuestro trabajo, validamos la escala aGAPSS en nuestra población. Una vez aplicado la escala en el total de nuestra población observamos que, de los 350 pacientes de nuestra cohorte, los casos con antecedente trombótico (grupo SAF y grupo TROM) presentaron unos valores de aGAPSS significativamente mayores con respecto a los pacientes sin eventos tromboembólicos conocidos ($p < 0,001$).

Mediante curvas ROC analizamos el poder discriminativo del modelo aGAPSS para detectar evento clínico en nuestra muestra, obteniendo un área bajo la curva o AUC = 0,62; $p < 0,001$. Un punto de corte ≥ 4 demostró la mejor capacidad discriminativa de evento clínico en nuestra muestra; un valor menor que el descrito en el trabajo de Sciascia (≥ 10). Con estos datos pudimos concluir que, al igual que en la serie de pacientes con LES descrita por Sciascia y su equipo (144,146), la escala aGAPSS tiene capacidad discriminativa de evento trombótico.

La Dra. Fernández, en su validación del aGAPSS, obtuvo un punto de corte con un valor ≥ 5 , más aproximado al obtenido en nuestro estudio. En este caso, en su población de estudio se incluyeron a pacientes con diagnóstico de SAFp, aproximándose más a las características de nuestra cohorte. Probablemente los diferentes criterios empleados en la selección de pacientes sea

la razón de los distintos resultados obtenidos al validar la escala aGAPSS en cada estudio.

9.4.1.2. Escala aGAPSS en nuestros pacientes aFL positivos

El modelo aGAPSS demostró tener un valor discriminatorio de evento clínico al analizar el total de los pacientes de nuestra muestra.

Sin embargo, cuando estudiamos los resultados obtenidos al calcular el aGAPSS únicamente en los pacientes portadores de aFL (grupo SAF y grupo AAF), este modelo predictivo no fue capaz de alcanzar la significación estadística y no demostró capacidad discriminativa de evento clínico (AUC= 0,54; $p=0,32$). Este resultado probablemente se explique por las diferencias entre nuestra cohorte y la población en la que se elaboró esta escala. El GAPSS fue diseñado en una muestra de pacientes en la que todos los casos incluidos tenían antecedente de LES, y por lo tanto, todos los casos SAF incluidos eran SAFs. En nuestro estudio, únicamente se incluyeron a pacientes con diagnóstico de SAFp.

Por ello, y basándonos en un modelo estadístico similar al empleado por Sciascia y su equipo, decidimos elaborar un modelo predictivo de trombosis en pacientes con aFL positivos, analizando variables clínicas y analíticas, e incluyendo, por primera vez, al FXI de la coagulación, dado que los resultados observados daban un gran peso predictivo a este factor.

9.4.2. Modelo de estimación de riesgo trombótico: APS-FXI

El modelo se nutre de los elementos que mostraron diferencias estadísticamente significativas en el análisis univariante entre el grupo de pacientes con SAFp y los portadores asintomáticos de aFL: sexo (varón), IMC >30 Kg/m², HTA, DLP, positividad de aβ2GP1 IgM, positividad aβ2GP1 IgG, presencia de AL, FXI>150% y FXI<70%.

A cada uno de estos ítems (DLP, AL positivo, FXI:C> 150%, FXI< 70% y positividad para aβ2GP1 IgG) le otorgamos un valor numérico siguiendo el mismo modelo estadístico descrito por Sciascia en la elaboración del GAPSS. De

este modo, el valor otorgado a cada variable fue: (+1) en el caso de la DLP, (+1) para el AL positivo, (-1) para el isotipo IgG del $\alpha\beta$ 2GP1 IgG, (+3) para el exceso de FXI (FXI:C > 150) y (-2) en caso de deficiencia de FXI (FXI:C < 70%).

Tras aplicar la escala APS-FXI en nuestra cohorte de pacientes con aFL positivos detectamos diferencias significativas entre los pacientes con y sin antecedente de evento tromboembólico (AUC = 0,73, IC 95%:0,66-0,8; $p < 0,001$). Mediante curvas ROC, observamos que un valor ≥ 2 tenía una mayor precisión discriminativa de evento clínico.

Esta escala, a la que hemos denominado APS-FXI, es el primer modelo de estimación de riesgo trombótico en pacientes con aFL que incluye entre sus variables al FXI, un factor con gran relevancia en la patología trombótica, y que convierte a este modelo en una posible herramienta de gran valor para la estimación del riesgo trombótico en pacientes con aFL positivos.

En cuanto a las limitaciones de este modelo nos encontramos en primer lugar con el tamaño muestral y la falta de una cohorte de validación en el que comprobar los resultados obtenidos en nuestro estudio. Además, el empleo de variables continuas, y no únicamente dicotómicas como en nuestro caso, podría proporcionar una mayor información.

Por todo ello, la escala APS-FXI debe validarse en nuevos estudios, prospectivos, que otorguen a este modelo validez para su uso en la práctica clínica diaria, como herramienta pronóstica que ayude al clínico a orientar el diagnóstico y manejo terapéutico de los pacientes con aFL positivos.

9.5. DÉFICIT CONGÉNITO DE FXI: UN DESORDEN SUBESTIMADO

El déficit de FXI es considerado como el más frecuente de los trastornos hemorrágicos raros, con una incidencia de 1 de cada 1.000.000 de personas en todo el mundo (296,297). Esta proporción es mayor en algunos grupos étnicos como los judíos de origen Askenazí, en los que se ha descrito una frecuencia de déficit moderado (heterocigotos) de hasta un 8% (298). Aproximadamente, en

un 95% de los casos de deficiencia de FXI en este grupo étnico se han identificado dos mutaciones responsables de la deficiencia del FXI: p.Glu135Ter y p.Phe299Leu (299).

En nuestra población hemos analizado el gen *F11* en todos los casos con déficit de FXI para estudiar y descartar una posible etiología congénita de la deficiencia del factor. Además de la deficiencia adquirida, probablemente como consecuencia de los aFL, nuestro estudio identificó tres casos con alteraciones moleculares en *F11* causantes de la deficiencia de FXI. En 2 casos no relacionados, que viven en localidades diferentes, aunque de la misma provincia (Murcia y Lorca), que presentaban la misma mutación patogénica responsable de la deficiencia de FXI. Sorprendentemente, la mutación identificada es la más prevalente en los judíos Askenazís: p.Glu135Ter, en el exón 5 del gen *F11*. En los dos casos, la mutación estaba en heterocigosis, y provocaba, como ya está descrito, una deficiencia cuantitativa de FXI (CRM-). La mutación se verificó en todos los miembros de las dos familias con deficiencia de FXI. Se trata por tanto de la primera descripción de esta mutación en España.

Debemos recordar que en España la población judía expulsada en el s. XV era sefardí y no Askenazí, por lo que la aparición de esta mutación en España es importada, o alternativamente podría ser una mutación *de novo* que afecte el mismo residuo que la mutación fundadora de la población judía. Son necesarios estudios adicionales que evalúen el haplotipo asociado con esta mutación en los dos casos identificados en este estudio y compararlo con el haplotipo de la población judía para aclarar esta duda.

Pero, además, nuestro estudio identificó otros dos sujetos con deficiencia congénita de FXI. El primero pertenece a la población control, grupo SAN. Se trata de un sujeto sano con una deficiencia CRM- moderada de FXI, causada por la mutación c.1327C>T, p.Arg443Cys, ya descrita previamente (CM062624) en heterocigosis en dos pacientes ingleses con deficiencia de FXI similar a la descrita en el control (297,365).

El modelado generado con la aplicación HOPE (<https://www3.cmbi.umcn.nl/hope/>) confirma la relevancia estructural de este cambio (Figura 38), y además, la nueva cisteína generada por la mutación posiblemente distorsione los puentes disulfuro claves no solo en el proceso de plegamiento y función correcta del FXI, sino también en la dimerización, lo que podría justificar el carácter dominante negativo y los valores menores del 50% observados en los portadores (404).

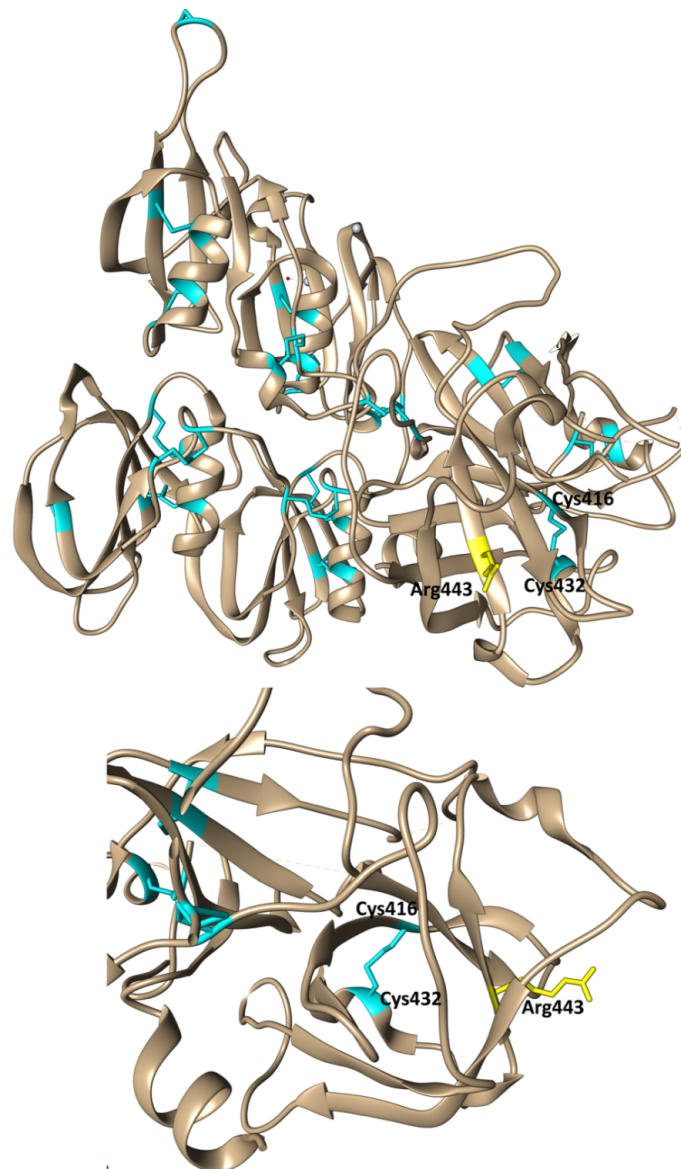


Figura 38. Localización del residuo Arg443 afectado por la mutación p.Arg443Cys en la estructura cristalográfica del FXI. También se muestran las cisteínas más cercanas implicadas en un puente disulfuro intracatenario.

Todos estos resultados, junto con los obtenidos también por nuestro grupo recientemente (405), las limitaciones observadas en el TTPa para identificar sujetos con deficiencia moderada de FXI (304) y el escaso riesgo hemorrágico que presentan los sujetos con deficiencia de FXI (406), son nuevas evidencias que avalan que la deficiencia congénita de FXI es un desorden subestimado y su prevalencia en la población sea mucho más elevada de lo pensado.

El segundo caso, perteneciente al grupo de portadores, presentaba una mutación puntual en heterocigosis en el exón 8, responsable del cambio p.Arg268Cys. Esta mutación ya estaba descrita, pero sus efectos no se habían caracterizado. El sujeto portador de esta alteración en nuestro estudio presentaba una deficiencia CRM- (Figura 39)

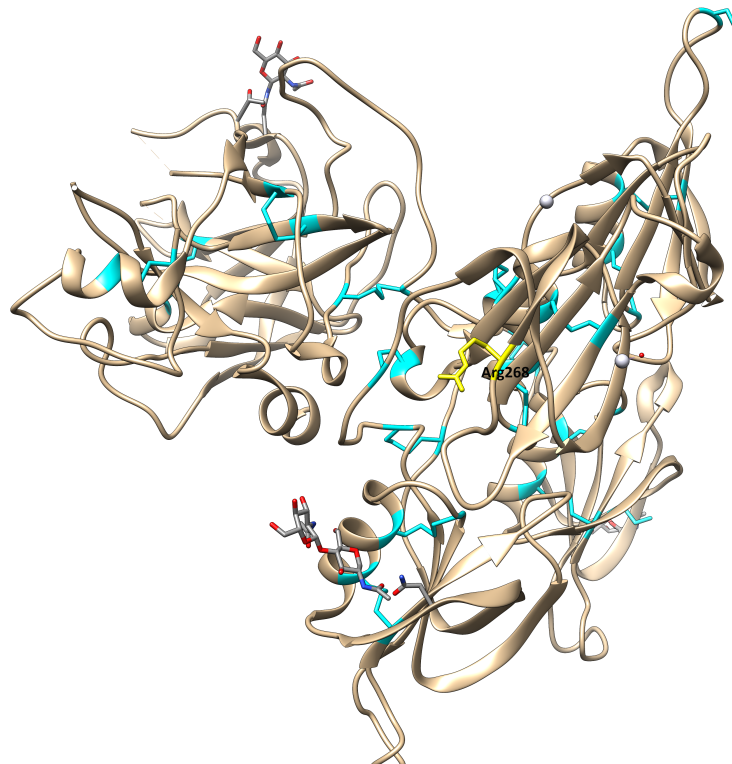


Figura 39. Localización del residuo Arg268 afectado por la mutación p.Arg268Cys en la estructura cristalográfica del FXI. También se muestran las cisteínas más cercanas implicadas en un puente disulfuro intracatenario.

En este segundo caso, de nuevo la aparición de una cisteína puede alterar el complejo entramado de 17 puentes disulfuro que existe en cada monómero de FXI, propiciando un plegamiento aberrante y por tanto la deficiencia CRM-.

9.6. DÉFICIT DE FXI Y DETERMINACIÓN DE ANTICOAGULANTE LÚPICO: TEST DE MEZCLAS

La Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (ISTH) estableció unos criterios para confirmar la presencia de AL (184):

- Detectar una prolongación de los tiempos de coagulación dependiente de fosfolípidos.
- Confirmar la presencia de un inhibidor de la coagulación mediante test de mezclas, que demuestre la falta de corrección de los tiempos de coagulación.
- Descartar la presencia de otras coagulopatías, en particular el déficit de factores de la coagulación.

La prueba del test de mezclas se emplea principalmente para discriminar entre la presencia de un inhibidor y la deficiencia de factores de la coagulación, como las que ocurren en pacientes que reciben anticoagulantes orales convencionales, como los AVK. Actualmente, existe una falta de consenso en cuanto a la realización de este test en el diagnóstico del AL.

Algunos autores defienden que la realización del test de mezclas se asocia a un factor de dilución que puede dar lugar a falsos negativos, reduciendo las tasas de detección de AL (184,191–193). Esto ha impulsado la adopción de los modelos integrados como una nueva estrategia en la detección del AL, más

rápida y rentable, mediante la realización únicamente del test de *screening* y el test de confirmación. Por otro lado, otros investigadores recomiendan la realización del test de mezclas, argumentando que esta determinación aumenta la especificidad diagnóstica del proceso de detección del AL, disminuyendo el número de falsos positivos (369,407). Con respecto a la importancia clínica, un reciente estudio sugirió que un test de mezclas positivo indicaba un AL más potente y confería un mayor riesgo trombótico que en los casos en que esta prueba era negativa (408).

Para la determinación de AL, según el algoritmo clásico de la ISTH, el test de mezclas se realiza cuando con el test de *screening* se obtiene un tiempo de coagulación prolongado, con cualquiera de los ensayos empleados en la detección del AL, test de VVRd o test de SCT. Según este esquema, se considera que un AL es positivo cuando en el test de *screening* se observa un prolongación de los tiempos de coagulación, con acortamiento en presencia de una alta concentración de fosfolípidos en el test confirmatorio, y ausencia de corrección de los tiempos de coagulación en el test de mezclas (184).

En la guía de la Sociedad Británica de Hematología (BSH) de 2012 se describe un posible efecto dilucional del test de mezclas, con el riesgo de falsos negativos en la determinación del AL, sobre todo en los casos de AL débil, en los que el efecto inhibitor del anticuerpo puede desaparecer al mezclar el plasma del paciente con el plasma normal. Según la guía de la BSH, en ausencia de otras anormalidades, las muestras con un test de *screening* y confirmatorio positivos deben considerarse como positivos para la detección de AL, a pesar de un test de mezclas negativo (185). También en la guía publicada por “*the Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI)*” recomienda llevar a cabo el test de mezclas sólo en aquellos casos en los que con el test de *screening* y/o el test confirmatorio no se obtenga un resultado claro, o en los casos en los que se sospeche la presencia de otras anomalías (195).

9.6.1. Interferencia entre la deficiencia de FXI y la determinación del AL

Dada la relación entre el FXI y los aFL que hemos descrito en nuestro estudio, y planteando la posibilidad de que la deficiencia congénita de FXI pudiera interferir en el diagnóstico de los aFL, generando falsos positivos, decidimos analizar la presencia de AL en una muestra de 49 pacientes con déficit congénito de FXI, confirmados por estudio molecular del gen *F11* (294).

De los 49 pacientes analizados, en 9 (13.4%) obtuvimos un AL positivo con la prueba VVRd, una proporción mayor de lo esperado en la población general (entre el 1 y el 5%). De los 9 casos sólo uno fue positivo para AL con ambos métodos (test de VVRd y test de SCT), y además, fue el único caso en el que se confirmó la presencia de un AL mediante el test de mezclas.

Estos resultados son pruebas adicionales que recomiendan la realización del test mezclas en el proceso diagnóstico del AL, con el fin de aumentar la especificidad de la determinación de este aFL, y evitar en la medida de lo posible, falsos positivos. Además, la realización del test de mezclas podría ayudar a identificar otras entidades, en algunos casos infradiagnosticadas, como el déficit de factores de la coagulación.

10. CONCLUSIONES

10. CONCLUSIONES

- La prevalencia de HTA, DLP, $IMC > 30 \text{ Kg/m}^2$, $FXI:C > 150\%$ y AL positivo fue significativamente mayor en el grupo SAF en comparación con el grupo AAF. La edad de aparición del primer evento trombótico en pacientes con SAF fue significativamente menor en comparación con el grupo de pacientes con antecedente de trombosis y aFL negativos.
- Niveles elevados de FXI ($FXI:C > 150\%$) se asocian con 14.95 veces mayor riesgo de padecer un evento trombótico en pacientes con aFL positivos, mientras que la deficiencia de FXI ($FXI:C < 70\%$) disminuye el riesgo de sufrir eventos clínicos casi 4 veces en estos pacientes.
- La mayoría de casos con AAF y $FXI:C < 70\%$ eran de etiología adquirida, aunque en 3 casos se identificó una base congénita, describiendo por primera vez en España dos casos portadores de una mutación característica de la población judía Askenazí (p.Glu135Ter).
- No encontramos una relación significativa entre los niveles extremos de FXI ($FXI:C < 70\%$ o $> 150\%$) con el perfil de aFL, tipo y titulación de anticuerpos.
- Hemos desarrollado la escala APS-FXI, que pudiera predecir y estimar de manera sencilla, el riesgo trombótico en pacientes con aFL positivos.
- La prevalencia de AL positivo en nuestra cohorte de pacientes con déficit congénito de FXI fue superior a la esperada en población general. Sólo en uno de los casos se confirmó la presencia del aFL al realizar el test de mezclas. Este resultado apoya la necesidad de realizar el test mezclas en el proceso diagnóstico del AL, con el fin de aumentar la especificidad en la determinación de este aFL y ayudar a identificar entidades infradiagnosticadas como el déficit de factores de la coagulación.

11. BIBLIOGRAFÍA

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost.* 2006;4(2):295–306.
2. Cervera R, Serrano R, Pons-Estel GJ, Ceberio-Hualde L, Shoenfeld Y, de Ramón E, et al. Morbidity and mortality in the antiphospholipid syndrome during a 10-year period: a multicentre prospective study of 1000 patients. *Ann Rheum Dis.* 2015 Jun;74(6):1011–8.
3. Hughes GRV. Thrombosis, abortion, cerebral disease, and the lupus anticoagulant. *Br Med J.* 1983;287(6399):1088–9.
4. Sontheimer RD. The Anticardiolipin Syndrome. *Arch Dermatol.* 1987 May 1;123(5):590.
5. Garcia D, Erkan D. Diagnosis and management of the antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med.* 2018;378(21):2010–110.
6. Boey ML, Colaco CB, Gharavi AE, Elkon KB, Loizou S, Hughes GR. Thrombosis in systemic lupus erythematosus: Striking association with the presence of circulating lupus anticoagulant. *Br Med J.* 1983;287(6398):1021–3.
7. Cervera R, Boffa MC, Khamashta MA, Hughes GRV. The Euro-Phospholipid project: Epidemiology of the antiphospholipid syndrome in Europe. *Lupus.* 2009;18(10):889–93.
8. Cervera R, Khamashta MA, Shoenfeld Y, Camps MT, Jacobsen S, Kiss E, et al. Antiphospholipid syndrome: Clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Curr Rheumatol Rep.* 2002;46(4):504–7.

9. Meroni PL, Raschi E, Grossi C, Pregnolato F, Trespidi L, Acaia B, et al. Obstetric and vascular APS: Same autoantibodies but different diseases? *Lupus*. 2012;21(7):708–10.
10. Antovic A, Sennström M, Bremme K, Svenungsson E. Obstetric antiphospholipid syndrome. *Lupus Sci Med*. 2018 Sep 25;5(1):e000197.
11. Alijotas-Reig J, Ferrer-Oliveras R, EUROAPS Study Group. The European Registry on Obstetric Antiphospholipid Syndrome (EUROAPS): a preliminary first year report. *Lupus*. 2012 Jun;21(7):766–8.
12. De Jesus GR, Agmon-Levin N, Andrade CA, Andreoli L, Chighizola CB, Flint Porter T, et al. 14th International Congress on Antiphospholipid Antibodies Task Force Report on Obstetric Antiphospholipid Syndrome. Vol. 13, *Autoimmunity Reviews*. Elsevier; 2014. p. 795–813.
13. Giannakopoulos B, Passam F, Rahgozar S, Krilis SA. Current concepts on the pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2007;109(2):422–30.
14. Pierangeli SS, Chen PP, Raschi E, Scurati S, Grossi C, Borghi MO, et al. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome: Pathogenic mechanisms. *Semin Thromb Hemost*. 2008;34(3):236–50.
15. Bertolaccini ML, Amengual O, Andreoli L, Atsumi T, Chighizola CB, Forastiero R, et al. 14th International Congress on Antiphospholipid Antibodies Task Force. Report on antiphospholipid syndrome laboratory diagnostics and trends. Vol. 13, *Autoimmunity Reviews*. Elsevier B.V.; 2014. p. 917–30.
16. Högdén A, Antovic A, Berg E, Bremme K, Chaireti R. Obstetric outcomes in patients with primary thrombotic and obstetric antiphospholipid syndrome and its relation to the antiphospholipid antibody profile. *Lupus*. 2019;28(7):868–77.

17. Cervera R, Bucciarelli S, Plasín MA, Gómez-Puerta JA, Plaza J, Pons-Estel G, et al. Catastrophic antiphospholipid syndrome (CAPS): Descriptive analysis of a series of 280 patients from the “CAPS Registry.” *J Autoimmun.* 2009 May;32(3–4):240–5.
18. Article S. Catastrophic antiphospholipid syndrome: task force report summary R Cervera, I Rodríguez-Pinto G Espinosa on behalf of the Task Force on Catastrophic Antiphospholipid Syndrome. *Lupus.* 2014;23:1283–5.
19. Cervera R, Rodríguez-Pintó I, Espinosa G. The diagnosis and clinical management of the catastrophic antiphospholipid syndrome: A comprehensive review. Vol. 92, *Journal of Autoimmunity.* Academic Press; 2018. p. 1–11.
20. Harris EN, Englert H, Derve G, Hughes GR, Gharavi A. Antiphospholipid antibodies in acute Guillain-Barré syndrome. *Lancet (London, England).* 1983 Dec 10;2(8363):1361–2.
21. Bialynicki-Birula R. The 100th anniversary of Wassermann-Neisser-Bruck reaction. *Clin Dermatol.* 2008;26(1):79–88.
22. Alarcón-segovia IMD, Font J, Gharavi AE, Por RAA, Iglesias-gamarra A, Restrepo JF, et al. Historiografía de los diferentes eventos que entrelazan la estructuración del síndrome antifosfolípídico. *Rev Colomb Reumatol.* 2008;15(4):229–70.
23. Pangborn MC. A New Serologically Active Phospholipid from Beef Heart. *Exp Biol Med.* 1941 Nov 1;48(2):484–6.
24. Moore JE, Mohr CF. Biologically false positive serologic tests for syphilis: Type, incidence, and cause. *J Am Med Assoc.* 1952 Oct 4;150(5):467–73.
25. MOORE JE, MOHR CF. The incidence and etiologic background of chronic biologic false-positive reactions in serologic tests for syphilis. *Ann Intern*

- Med. 1952;37(6):1156–61.
26. Conley C, Hartman R. A hemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus. 1952.
 27. Bowie EJW, Thompson JH, Pascuzzi CA, Owen CA. Thrombosis in systemic lupus erythematosus despite circulating anticoagulants. *J Lab Clin Med.* 1963 Sep;62(3):416–30.
 28. Nilsson IM, Åstedt B, Hedner U, Berezin D. INTRAUTERINE DEATH AND CIRCULATING ANTICOAGULANT (“ANTITHROMBOPLASTIN”). *Acta Med Scand.* 1975 Apr 24;197(1–6):153–9.
 29. Lechner K. Acquired inhibitors in nonhemophilic patients. Vol. 3, *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis.* 1974. p. 65–93.
 30. Mueh JR, Herbst KD, Rapaport SI. Thrombosis in patients with the lupus anticoagulant. *Ann Intern Med.* 1980;92(2 I):156–9.
 31. Boey ML, Colaco CB, Gharavi AE, Elkon KB, Loizou S, Hughes GR. Thrombosis in systemic lupus erythematosus: striking association with the presence of circulating lupus anticoagulant. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1983 Oct 8;287(6398):1021–3.
 32. Elias M, Eldor A. Thromboembolism in patients with the 'lupus'-type circulating anticoagulant. *Arch Intern Med.* 1984 Mar;144(3):510–5.
 33. Hughes GR. The anticardiolipin syndrome. *Clin Exp Rheumatol.* 1985;3(4):285–6.
 34. Hughes GR. The Prosser-White oration 1983. Connective tissue disease and the skin. *Clin Exp Dermatol.* 1984 Nov;9(6):535–44.
 35. Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K, Koike T. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. Vol. 336, *The Lancet.* Lancet; 1990. p. 177–8.

36. Galli M, Barbui T, Comfurius P, Maassen C, Hemker HC, Zwaal RFA, et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet*. 1990 Jun 30;335(8705):1544–7.
37. McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: β 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(11):4120–4.
38. Asherson RA, Khamashta MA, Ordi-Ros J, Derksen RHW, Machin SJ, Barquinero J, et al. The “primary” antiphospholipid syndrome: Major clinical and serological features. *Med (United States)*. 1989;68(6):366–74.
39. Mackworth-Young CG, Loizou S, Walport MJ. Primary antiphospholipid syndrome: Features of patients with raised anticardiolipin antibodies and no other disorder. *Ann Rheum Dis*. 1989;48(5):362–7.
40. Alarcón-Segovia D, Sanchez-Guerrero J. Primary antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol*. 1989 Apr;16(4):482–8.
41. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Ware Branch D, Piette JC, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: Report of an International Workshop. *Arthritis Rheum*. 1999;42(7):1309–11.
42. Gómez-Puerta JA, Cervera R. Diagnosis and classification of the antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun*. 2014;48–49:20–5.
43. Durcan L, Petri M. Epidemiology of the Antiphospholipid Syndrome. Vol. 12, *Handbook of Systemic Autoimmune Diseases*. Elsevier B.V.; 2016. 17–30 p.
44. Duarte-García A, Pham MM, Crowson CS, Amin S, Moder KG, Pruthi RK, et al. The Epidemiology of Antiphospholipid Syndrome: A Population-Based Study. *Arthritis Rheumatol*. 2019;71(9):1545–52.

45. Andreoli L, Chighizola CB, Banzato A, Pons-Estel GJ, De Jesus GR, Erkan D. Estimated frequency of antiphospholipid antibodies in patients with pregnancy morbidity, stroke, myocardial infarction, and deep vein thrombosis: A critical review of the literature. *Arthritis Care Res.* 2013;65(11):1869–73.
46. Chighizola CB, Andreoli L, De Jesus GR, Banzato A, Pons-Estel GJ, Erkan D. The association between antiphospholipid antibodies and pregnancy morbidity, stroke, myocardial infarction, and deep vein thrombosis: A critical review of the literature. *Lupus.* 2015;24(9):980–4.
47. Erkan D, Sciascia S, Bertolaccini ML, Cohen H. Antiphospholipid Syndrome Alliance for Clinical Trials and International Networking (APS ACTION): 10-Year Update. Vol. 23, *Current Rheumatology Reports.* Springer; 2021.
48. Miranda S, Park J, Le Gal G, Piran S, Kherani S, Rodger MA, et al. Prevalence of confirmed antiphospholipid syndrome in 18-50 years unselected patients with first unprovoked venous thromboembolism. *J Thromb Haemost.* 2019 Dec 23;jth.14720.
49. Manukyan D, Rossmann H, Schulz A, Zeller T, Pfeiffer N, Binder H, et al. Distribution of antiphospholipid antibodies in a large population-based German cohort. *Clin Chem Lab Med.* 2016 Oct 1;54(10):1663–70.
50. Meroni PL, Mari D, Monti D, Coppola R, Capri M, Salvioli S, et al. Anti-beta 2 glycoprotein I antibodies in centenarians. 2004.
51. Biggioggero M, Meroni PL. The geoepidemiology of the antiphospholipid antibody syndrome. *Autoimmun Rev.* 2010;9(5):A299–304.
52. Sène D, Piette JC, Cacoub P. Antiphospholipid antibodies, antiphospholipid syndrome and infections. Vol. 7, *Autoimmunity Reviews.* 2008. p. 272–7.

53. Willis R, Harris EN, Pierangeli SS. Pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *Semin Thromb Hemost*. 2012;38(4):305–21.
54. Merashli M, Noureldine MH a, Uthman I, Khamashta M. Antiphospholipid syndrome: An update. *Eur J Clin Invest*. 2015;45(6):653–62.
55. Pusterla S, Previtali S, Marziali S, Cortelazzo S, Rossi A, Barbui T, et al. Antiphospholipid antibodies in lymphoma: Prevalence and clinical significance. *Hematol J*. 2004;5(4):341–6.
56. Petri M. Epidemiology of the antiphospholipid antibody syndrome. *J Autoimmun*. 2000;15(2):145–51.
57. Bruce IN, Clark-Soloninka CA, Spitzer KA, Gladman DD, Urowitz MB, Laskin CA. Prevalence of antibodies to beta2-glycoprotein I in systemic lupus erythematosus and their association with antiphospholipid antibody syndrome criteria: a single center study and literature review. *J Rheumatol*. 2000 Dec; 27(12):2833–7.
58. Daugas E, Nochy D, Huong DLT, Duhaut P, Beaufils H, Caudwell V, et al. Antiphospholipid syndrome nephropathy in systemic lupus erythematosus. *J Am Soc Nephrol*. 2002 Jan;13(1):42–52.
59. Petri M. Update on anti-phospholipid antibodies in SLE: The Hopkins Lupus Cohort. Vol. 19, *Lupus*. 2010. p. 419–23.
60. Mehrani T, Petri M. Chapter 2 Epidemiology of the Antiphospholipid Syndrome. In 2009. p. 13–34.
61. Uthman I, Khamashta M. Ethnic and geographical variation in antiphospholipid (Hughes) syndrome. Vol. 64, *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2005. p. 1671–6.
62. Sebastiani GD, Iuliano A, Cantarini L, Galeazzi M. Genetic aspects of the antiphospholipid syndrome: An update. *Autoimmun Rev*. 2016;1–7.

63. Domenico Sebastiani G, Minisola G, Galeazzi M. HLA class II alleles and genetic predisposition to the antiphospholipid syndrome. *Autoimmun Rev.* 2003 Oct; 2(6):387–94.
64. Arnett FC, Olsen ML, Anderson KL, Reveille JD. Molecular analysis of major histocompatibility complex alleles associated with the lupus anticoagulant. *J Clin Invest.* 1991;87(5):1490–5.
65. Mehdi AA, Uthman I, Khamashta M. Antiphospholipid syndrome: Pathogenesis and a window of treatment opportunities in the future. *Eur J Clin Invest.* 2010;40(5):451–64.
66. Uthman I, Noureldine MHA, Ruiz-Irastorza G, Khamashta M. Management of antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2019;78(2):155–61.
67. Meroni PL, Borghi MO, Raschi E, Tedesco F. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: Understanding the antibodies. *Nat Rev Rheumatol.* 2011;7(6):330–9.
68. Lackner KJ, Müller-Calleja N. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: recent insights and emerging concepts. Vol. 15, *Expert Review of Clinical Immunology.* 2019. p. 199–209.
69. Pengo V, Ruffatti A, Legnani C, Testa S, Fierro T, Marongiu F, et al. Incidence of a first thromboembolic event in asymptomatic carriers of high-risk antiphospholipid antibody profile: A multicenter prospective study. *Blood.* 2011;118(17):4714–8.
70. Schreiber K, Sciascia S, de Groot PG, Devreese K, Jacobsen S, Ruiz-Irastroza G, et al. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: recent insights and emerging concepts. *Expert Rev Clin Immunol.* 2018 Jan 11;44(2):483–92.
71. Lackner KJ, Müller-Calleja N. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: recent insights and emerging concepts. *Expert Rev Clin Immunol.*

- 2019;15(2):199–209.
72. Giannakopoulos B, Krilis SA. The Pathogenesis of the Antiphospholipid Syndrome. *N Engl J Med*. 2013.
 73. Willis R, Gonzalez EB, Brasier AR. The Journey of Antiphospholipid Antibodies From Cellular Activation to Antiphospholipid Syndrome. *Curr Rheumatol Rep*. 2015;17(3).
 74. Reverter JC, Tàssies D, Font J, Khamashta MA, Ichikawa K, Cervera R, et al. Effects of human monoclonal anticardiolipin antibodies on platelet function and on tissue factor expression on monocytes. *Arthritis Rheum*. 1998 Aug;41(8):1420–7.
 75. Betts NA, Ahuja KDK, Adams MJ. Anti- β 2GP1 antibodies have variable effects on platelet aggregation. *Pathology*. 2013;45(2):155–61.
 76. Vega-Ostertag M, Harris EN, Pierangeli SS. Intracellular events in platelet activation induced by antiphospholipid antibodies in the presence of low doses of thrombin. *Arthritis Rheum*. 2004 Sep;50(9):2911–9.
 77. De Groot PG, Urbanus RT, Derksen RHW. Pathophysiology of thrombotic APS: Where do we stand? In: *Lupus*. 2012. p. 704–7.
 78. Yasuda S, Atsumi T, Ieko M, Koike T. β 2 -glycoprotein I, anti- β 2 -glycoprotein I, and fibrinolysis. *Thromb Res*. 2004;114(5-6 SPEC. ISS.):461–5.
 79. Ruiz-Irastorza G, Crowther M, Branch W, Khamashta M a. Antiphospholipid syndrome. *Lancet*. 2010;376(9751):1498–509.
 80. Meng H, Yalavarthi S, Kanthi Y, Mazza LF, Elflin MA, Luke CE, et al. In Vivo Role of Neutrophil Extracellular Traps in Antiphospholipid Antibody–Mediated Venous Thrombosis. *Arthritis Rheumatol*. 2017 Mar 1;69(3):655–67.

81. Krone KA, Allen KL, McCrae KR. Impaired fibrinolysis in the antiphospholipid syndrome. *Curr Rheumatol Rep.* 2010;12(1):53–7.
82. Vega-Ostertag M, Liu X, Kwan-Ki H, Chen P, Pierangeli S. A human monoclonal antiprothrombin antibody is thrombogenic in vivo and upregulates expression of tissue factor and E-selectin on endothelial cells. *Br J Haematol.* 2006;135(2):214–9.
83. Liestøl S, Sandset PM, Jacobsen EM, Mowinckel MC, Wisløff F. Decreased anticoagulant response to tissue factor pathway inhibitor type 1 in plasmas from patients with lupus anticoagulants. *Br J Haematol.* 2007;136(1):131–7.
84. Yang Y-H, Chien D, Wu M, FitzGerald J, Grossman JM, Hahn BH, et al. Novel Autoantibodies against the Activated Coagulation Factor IX (FIXa) in the Antiphospholipid Syndrome That Interpose the FIXa Regulation by Antithrombin. *J Immunol.* 2009;182(3):1674–80.
85. Arachchillage DRJ, Efthymiou M, Mackie IJ, Lawrie AS, Machin SJ, Cohen H. Anti-protein C antibodies are associated with resistance to endogenous protein C activation and a severe thrombotic phenotype in antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost.* 2014;12(11):1801–9.
86. Vega-Ostertag M, Casper K, Swerlick R, Ferrara D, Harris EN, Pierangeli SS. Involvement of p38 MAPK in the up-regulation of tissue factor on endothelial cells by antiphospholipid antibodies. *Arthritis Rheum.* 2005 May;52(5):1545–54.
87. Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* 2010 Jan;20(1):34–50.
88. Oku K, Atsumi T, Bohgaki M, Amengual O, Kataoka H, Horita T, et al. Complement activation in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2009;68(6):1030–5.

89. Oku K, Amengual O, Hisada R, Ohmura K, Nakagawa I, Watanabe T, et al. Autoantibodies against a complement component 1 q subcomponent contribute to complement activation and recurrent thrombosis/pregnancy morbidity in anti-phospholipid syndrome. *Rheumatol (United Kingdom)*. 2016 Aug 1;55(8):1403–11.
90. Rus H, Cudrici C, Niculescu F. The role of the complement system in innate immunity. Vol. 33, *Immunologic Research*. 2005. p. 103–12.
91. Cervera R. Lessons from the “Euro-Phospholipid” project. Vol. 7, *Autoimmunity Reviews*. 2008. p. 174–8.
92. Cervera R, Khamashta MA, Shoenfeld Y, Camps MT, Jacobsen S, Kiss E, et al. Morbidity and mortality in the antiphospholipid syndrome during a 5-year period: a multicentre prospective study of 1000 patients. *Ann Rheum Dis*. 2009 Sep;68(9):1428–32.
93. Cervera R, Piette JC, Font J, Khamashta MA, Shoenfeld Y, Camps MT, et al. Antiphospholipid syndrome: Clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis Rheum*. 2002;46(4):1019–27.
94. Mateo J, Oliver A, Borrell M, Sala N, Fontcuberta J. Laboratory evaluation and clinical characteristics of 2,132 consecutive unselected patients with venous thromboembolism--results of the Spanish Multicentric Study on Thrombophilia (EMET-Study). *Thromb Haemost*. 1997 Mar;77(3):444–51.
95. Pengo V, Testa S, Martinelli I, Ghirarduzzi A, Legnani C, Gresele P, et al. Incidence of a first thromboembolic event in carriers of isolated lupus anticoagulant. *Thromb Res*. 2015;135(1):46–9.
96. Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T. Lupus anticoagulants are stronger risk factors for thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature. *Blood*. 2003 Mar 1;101(5):1827–32.

97. Ruffatti A, Del Ross T, Ciprian M, Bertero MT, Sciascia S, Scarpato S, et al. Risk factors for a first thrombotic event in antiphospholipid antibody carriers: a prospective multicentre follow-up study. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(6):1083–6.
98. Garcia D, Akl EA, Carr R, Kearon C. Antiphospholipid antibodies and the risk of recurrence after a first episode of venous thromboembolism: A systematic review. *Blood.* 2013;122(5):817–24.
99. De Groot PG, Lutters B, Derksen RHWM, Lisman T, Meijers JCM, Rosendaal FR. Lupus anticoagulants and the risk of a first episode of deep venous thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2005;3(9):1993–7.
100. Zoghalmi-Rintelen C, Vormittag R, Sailer T, Lehr S, Quehenberger P, Rumpold H, et al. The presence of IgG antibodies against β 2-glycoprotein I predicts the risk of thrombosis in patients with the lupus anticoagulant. *J Thromb Haemost.* 2005;3(6):1160–5.
101. Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T. Anti- β 2-glycoprotein I, antiprothrombin antibodies, and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. Vol. 102, *Blood.* 2003. p. 2717–23.
102. Finazzi G. The epidemiology of the antiphospholipid syndrome: who is at risk? Vol. 3, *Current rheumatology reports.* 2001. p. 271–6.
103. Nojima J, Kuratsune H, Suehisa E, Kitani T, Iwatani Y, Kanakura Y. Strong correlation between the prevalence of cerebral infarction and the presence of anti-cardiolipin/ β 2-glycoprotein I and anti-phosphatidylserine/prothrombin antibodies. *Thromb Haemost.* 2004 Dec 1;91(05):967–76.
104. Urbanus RT, Siegerink B, Roest M, Rosendaal FR, de Groot PG, Algra A. Antiphospholipid antibodies and risk of myocardial infarction and ischaemic stroke in young women in the RATIO study: a case-control study. *Lancet Neurol.* 2009;8(11):998–1005.

105. Rai RS, Regan L, Clifford K, Pickering W, Dave M, Mackie I, et al. Immunology: Antiphospholipid antibodies and β 2-glycoprotein-i in 500 women with recurrent miscarriage: Results of a comprehensive screening approach. *Hum Reprod.* 1995;10(8):2001–5.
106. Danza A, Ruiz-Irastorza G, Khamashta M. Antiphospholipid syndrome in obstetrics. Vol. 26, *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology.* 2012. p. 65–76.
107. Schreiber K, Hunt BJ. Pregnancy and Antiphospholipid Syndrome. *Semin Thromb Hemost.* 2016 Oct 1;42(7):780–8.
108. Meroni PL, Tedesco F, Locati M, Vecchi A, Di Simone N, Acaia B, et al. Anti-phospholipid antibody mediated fetal loss: Still an open question from a pathogenic point of view. *Lupus.* 2010;19(4):453–6.
109. Chighizola CB, Andreoli L, De Jesus GR, Banzato A, Pons-Estel GJ, Erkan D. The association between antiphospholipid antibodies and pregnancy morbidity, stroke, myocardial infarction, and deep vein thrombosis: A critical review of the literature. Vol. 24, *Lupus.* SAGE Publications Ltd; 2015. p. 980–4.
110. Yelnik CM, Laskin CA, Porter TF, Branch DW, Buyon JP, Guerra MM, et al. Lupus anticoagulant is the main predictor of adverse pregnancy outcomes in aPL-positive patients: Validation of PROMISSE study results. *Lupus Sci Med.* 2016 Jan 1;3(1).
111. Opatrny L, David M, Kahn SR, Shrier I, Rey E. Association between antiphospholipid antibodies and recurrent fetal loss in women without autoimmune disease: A metaanalysis. *J Rheumatol.* 2006 Nov;33(11):2214–21.
112. Lockshin MD, Kim M, Laskin CA, Guerra M, Branch DW, Merrill J, et al. Prediction of adverse pregnancy outcome by the presence of lupus anticoagulant, but not anticardiolipin antibody, in patients with

- antiphospholipid antibodies. *Arthritis Rheum.* 2012 Jul;64(7):2311–8.
113. Nodler J, Moolamalla SR, Ledger EM, Nuwayhid BS, Mulla ZD. Elevated antiphospholipid antibody titers and adverse pregnancy outcomes: Analysis of a population-based hospital dataset. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2009 Mar 16;9.
114. Ruffatti A, Calligaro A, Hoxha A, Trevisanuto D, Ruffatti AT, Gervasi MT, et al. Laboratory and clinical features of pregnant women with antiphospholipid syndrome and neonatal outcome. *Arthritis Care Res.* 2010 Mar;62(3):302–7.
115. Boffa MC, Boinot C, De Carolis S, Rovere-Querini P, Aurousseau MH, Allegri F, et al. Laboratory criteria of the obstetrical antiphospholipid syndrome: Data from a multicentric prospective European women cohort. *Thromb Haemost.* 2009 Jul;102(1):25–8.
116. Ruffatti A, Tonello M, Cavazzana A, Bagatella P, Pengo V. Laboratory classification categories and pregnancy outcome in patients with primary antiphospholipid syndrome prescribed antithrombotic therapy. *Thromb Res.* 2009 Jan;123(3):482–7.
117. Wong LF, Porter TF, de Jesús GR. Recurrent early pregnancy loss and antiphospholipid antibodies: where do we stand? *Lupus.* 2014;23(12):1226–8.
118. Ruffatti A, Tonello M, Hoxha A, Sciascia S, Cuadrado MJ, Latino JO, et al. Effect of Additional Treatments Combined with Conventional Therapies in Pregnant Patients with High-Risk Antiphospholipid Syndrome: A Multicentre Study. *Thromb Haemost.* 2018 Apr 1;118(4):639–46.
119. Asherson RA, Cervera R, De Groot PG, Erkan D, Boffa MC, Piette JC, et al. Catastrophic antiphospholipid syndrome: International consensus statement on classification criteria and treatment guidelines. In: *Lupus.* 2003. p. 530–4.

120. Conti F, Priori R, Alessandri C, Misasi R, Capozzi A, Pendolino M, et al. Diagnosis of catastrophic anti-phospholipid syndrome in a patient tested negative for conventional tests. *Clin Exp Rheumatol*. 2017;35(4):678–80.
121. Cervera R, Font J, Gómez-Puerta JA, Espinosa G, Cucho M, Bucciarelli S, et al. Validation of the preliminary criteria for the classification of catastrophic antiphospholipid syndrome. Vol. 64, *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2005. p. 1205–9.
122. Rodríguez-García JL, Bertolaccini ML, Cuadrado MJ, Sanna G, Ateka-Barrutia O, Khamashta M a. Clinical manifestations of antiphospholipid syndrome (APS) with and without antiphospholipid antibodies (the so-called 'seronegative APS'). *Ann Rheum Dis*. 2012;71(2):242–4.
123. Nayfe R, Uthman I, Aoun J, Aldin ES, Merashli M, Khamashta MA. Seronegative antiphospholipid syndrome. Vol. 52, *Rheumatology (United Kingdom)*. 2013. p. 1358–67.
124. Rodríguez-Pintó I, Espinosa G, Cervera R. Catastrophic APS in the Context of Other Thrombotic Microangiopathies. Vol. 17, *Current Rheumatology Reports*. Current Medicine Group LLC 1; 2015.
125. Rodríguez-Pintó I, Espinosa G, Erkan D, Shoenfeld Y, Cervera R, Piette JC, et al. The effect of triple therapy on the mortality of catastrophic antiphospholipid syndrome patients. *Rheumatol (United Kingdom)*. 2018 Jul 1;57(7):1264–70.
126. Sciascia S, Amigo MC, Roccatello D, Khamashta M. Diagnosing antiphospholipid syndrome: “extra-criteria” manifestations and technical advances. *Nat Rev Rheumatol*. 2017;13(9):548–60.
127. Erkan D, Lockshin MD. Non-criteria manifestations of antiphospholipid syndrome. Vol. 19, *Lupus*. 2010. p. 424–7.
128. Cervera R, Piette JC, Font J, Khamashta MA, Shoenfeld Y, Camps MT, et

- al. Antiphospholipid syndrome: Clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis Rheum.* 2002 Apr; 46(4):1019–27.
129. Chighizola CB, Raimondo MG, Meroni PL. Management of Thrombotic Antiphospholipid Syndrome. *Semin Thromb Hemost.* 2018 Jul 1;44(5):419–26.
130. Ruiz-Irastorza G, Khamashta MA, Hunt BJ, Escudero A, Cuadrado MJ, Hughes GR V. Bleeding and Recurrent Thrombosis in Definite Antiphospholipid Syndrome. *Arch Intern Med.* 2002 May 27;162(10):1164.
131. Tektonidou MG. Prognostic factors and clustering of serious clinical outcomes in antiphospholipid syndrome. *QJM.* 2000 Aug 1;93(8):523–30.
132. Neville C, Rauch J, Kassis J, Solymoss S, Joseph L, Belisle P, et al. Antiphospholipid antibodies predict imminent vascular events independently from other risk factors in a prospective cohort. *Thromb Haemost.* 2009;101(1):100–7.
133. Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. *Thromb Haemost.* 1995;74(4):1185–90.
134. Wisløff F, Jacobsen EM, Liestøl S. Laboratory diagnosis of the antiphospholipid syndrome. *Thromb Res.* 2002 Dec;108(5–6):263–71.
135. Reber G, Tincani A, Sanmarco M, de Moerloose P, Boffa MC, Standardization group of the European Forum on Antiphospholipid Antibodies. Proposals for the measurement of anti-beta2-glycoprotein I antibodies. Standardization group of the European Forum on Antiphospholipid Antibodies. *J Thromb Haemost.* 2004 Oct;2(10):1860–2.

136. Damilola A, Roberto F. Thrombosis - StatPearls - NCBI Bookshelf. 2019.
137. Ruiz-Irastorza G, Crowther M, Branch W, Khamashta MA. Antiphospholipid syndrome. *Lancet* (London, England). 2010;376(9751):1498–509.
138. Tektonidou MG, Andreoli L, Limper M, Amoura Z, Cervera R, Costedoat-Chalumeau N, et al. EULAR recommendations for the management of antiphospholipid syndrome in adults. *Ann Rheum Dis*. 2019;78(10):1296–304.
139. Ruiz-Irastorza G, Cuadrado MJ, Ruiz-Arruza I, Brey R, Crowther M, Derksen R, et al. Evidence-based recommendations for the prevention and long-term management of thrombosis in antiphospholipid antibody-positive patients: report of a task force at the 13th International Congress on antiphospholipid antibodies. *Lupus*. 2011;20(2):206–18.
140. Somers E, Magder LS, Petri M. Antiphospholipid antibodies and incidence of venous thrombosis in a cohort of patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2002 Dec 1;29(12):2531–6.
141. Mustonen P, Lehtonen K V, Javela K, Puurunen M. Persistent antiphospholipid antibody (aPL) in asymptomatic carriers as a risk factor for future thrombotic events: a nationwide prospective study. *Lupus*. 2014;23(2014):1468–76.
142. Saidi S, Mahjoub T, Almawi WY. Lupus anticoagulants and antiphospholipid antibodies as risk factors for a first episode of ischemic stroke. *J Thromb Haemost*. 2009;7(7):1075–80.
143. Otomo K, Atsumi T, Amengual O, Fujieda Y, Kato M, Oku K, et al. Efficacy of the antiphospholipid score for the diagnosis of antiphospholipid syndrome and its predictive value for thrombotic events. *Arthritis Rheum*. 2012 Feb;64(2):504–12.

144. Sciascia S, Sanna G, Murru V, Roccatello D, Khamashta MA, Bertolaccini ML. GAPSS: The global anti-phospholipid syndrome score. *Rheumatol (United Kingdom)*. 2013;52(8):1397–403.
145. Zuily S, de Laat B, Mohamed S, Kelchtermans H, Shums Z, Albesa R, et al. Validity of the global anti-phospholipid syndrome score to predict thrombosis: A prospective multicentre cohort study. *Rheumatol (United Kingdom)*. 2015;54(11):2071–5.
146. Sciascia S, Sanna G, Murru V, Roccatello D, Khamashta MA, Bertolaccini ML. The global anti-phospholipid syndrome score in primary APS. *Rheumatol (United Kingdom)*. 2014;54(1):134–8.
147. Oku K, Amengual O, Bohgaki T, Horita T, Yasuda S, Atsumi T. An independent validation of the Global Anti-Phospholipid Syndrome Score in a Japanese cohort of patients with autoimmune diseases. *Lupus*. 2015 Jun 3;24(7):774–5.
148. Fernandez Mosteirín N, Saez Comet L, Salvador Osuna C, Calvo Villas JM, Velilla Marco J. Independent validation of the adjusted GAPSS: Role of thrombotic risk assessment in the real-life setting. *Lupus*. 2017 Oct 1;26(12):1328–32.
149. Bertolaccini ML, Amengual O, Andreoli L, Atsumi T, Chighizola CB, Forastiero R, et al. 14th International Congress on Antiphospholipid Antibodies Task Force. Report on antiphospholipid syndrome laboratory diagnostics and trends. *Autoimmun Rev*. 2014;13(9):917–30.
150. Teruel R, Pérez-Sánchez C, Corral J, Herranz MT, Pérez-Andreu V, Saiz E, et al. Identification of miRNAs as potential modulators of tissue factor expression in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost*. 2011;9(10):1985–92.
151. Bertero M. Primary prevention in antiphospholipid antibody carriers. *Lupus*. 2012;21(7):751–4.

152. Khamashta MA, Cuadrado MJ, Mujic F, Taub NA, Hunt BJ, Hughes GR. The management of thrombosis in the antiphospholipid-antibody syndrome. *N Engl J Med.* 1995 Apr 13;332(15):993–7.
153. Crowther M a, Ginsberg JS, Julian J, Denburg J, Hirsh J, Douketis J, et al. A comparison of two intensities of warfarin for the prevention of recurrent thrombosis in patients with the antiphospholipid antibody syndrome. *N Engl J Med.* 2003;349(12):1133–8.
154. Finazzi G, Marchioli R, Brancaccio V, Schinco P, Wisloff F, Musial J, et al. A randomized clinical trial of high-intensity warfarin vs. conventional antithrombotic therapy for the prevention of recurrent thrombosis in patients with the antiphospholipid syndrome (WAPS). *J Thromb Haemost.* 2005;3(5):848–53.
155. Pengo V, Denas G, Banzato a., Bison E, Bracco a., Facchinetti M, et al. Secondary prevention in thrombotic antiphospholipid syndrome. *Lupus.* 2012;21(7):734–5.
156. Kearon C, Akl EA, Ornelas J, Blaivas A, Jimenez D, Bounameaux H, et al. Antithrombotic therapy for VTE disease: CHEST guideline and expert panel report. *Chest.* 2016 Feb 1;149(2):315–52.
157. Cohen H, Hunt BJ, Efthymiou M, Arachchillage DRJ, Mackie IJ, Clawson S, et al. Rivaroxaban versus warfarin to treat patients with thrombotic antiphospholipid syndrome, with or without systemic lupus erythematosus (RAPS): a randomised, controlled, open-label, phase 2/3, non-inferiority trial. *Lancet Haematol.* 2016 Sep 1;3(9):e426–36.
158. Pengo V, Denas G, Zoppellaro G, Jose SP, Hoxha A, Ruffatti A, et al. Rivaroxaban vs warfarin in high-risk patients with antiphospholipid syndrome. *Blood.* 2018 Sep 27;132(13):1365–71.
159. Jackson WG, Oromendia C, Unlu O, Erkan D, DeSancho MT. Recurrent thrombosis in patients with antiphospholipid antibodies and arterial

- thrombosis on antithrombotic therapy. *Blood Adv.* 2017 Nov 28;1(25):2320–4.
160. Dufrost V, Risse J, Reshetnyak T, Satybaldyeva M, Du Y, Yan XX, et al. Increased risk of thrombosis in antiphospholipid syndrome patients treated with direct oral anticoagulants. Results from an international patient-level data meta-analysis. Vol. 17, *Autoimmunity Reviews*. Elsevier B.V.; 2018. p. 1011–21.
161. Jajoria P, Murthy V, Papalardo E, Romay-Penabad Z, Gleason C, Pierangeli SS. Statins for the treatment of antiphospholipid syndrome. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. Blackwell Publishing Inc.; 2009. p. 736–45.
162. Andrade D, Tektonidou M. Emerging Therapies in Antiphospholipid Syndrome. *Curr Rheumatol Rep.* 2016;18(4):22.
163. Ruiz-Irastorza G, Ramos-Casals M, Brito-Zeron P, Khamashta MA. Clinical efficacy and side effects of antimalarials in systemic lupus erythematosus: A systematic review. Vol. 69, *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2010. p. 20–8.
164. Laskin CA, Spitzer KA, Clark CA, Crowther MR, Ginsberg JS, Hawker GA, et al. Low molecular weight heparin and aspirin for recurrent pregnancy loss: results from the randomized, controlled HepASA Trial. *J Rheumatol.* 2009 Feb;36(2):279–87.
165. Espinosa G, Cervera R. Current treatment of antiphospholipid syndrome: lights and shadows. *Nat Rev Rheumatol.* 2015;11(1):1–11.
166. Schreiber K, Sciascia S, de Groot PG, Devreese K, Jacobsen S, Ruiz-Irastorza G, et al. Antiphospholipid syndrome. *Nat Rev Dis Prim.* 2018 Jan 11;4:17103.
167. Bramham K, Thomas M, Nelson-Piercy C, Khamashta M, Hunt BJ. First-

- trimester low-dose prednisolone in refractory antiphospholipid antibody - related pregnancy loss. *Blood*. 2011 Jun 23;117(25):6948–51.
168. Vaqueiro M, Baré M, Anton E, Andreu E, Avis DD. Hipovitaminosis D asociada a exposición solar insuficiente en la población mayor de 64 años. *Med Clin*. 2007;129(8):287–91.
169. Mekinian A, Lazzaroni MG, Kuzenko A, Alijotas-Reig J, Ruffatti A, Levy P, et al. The efficacy of hydroxychloroquine for obstetrical outcome in antiphospholipid syndrome: Data from a European multicenter retrospective study. Vol. 14, *Autoimmunity Reviews*. Elsevier; 2015. p. 498–502.
170. Ruffatti A, Favaro M, Hoxha A, Zambon A, Marson P, Del Ross T, et al. Apheresis and intravenous immunoglobulins used in addition to conventional therapy to treat high-risk pregnant antiphospholipid antibody syndrome patients. A prospective study. *J Reprod Immunol*. 2016 Jun 1;115:14–9.
171. de Jesús GR, Sciascia S, Andrade D, Barbhaiya M, Tektonidou M, Banzato A, et al. Factors associated with first thrombosis in patients presenting with obstetric antiphospholipid syndrome (APS) in the APS Alliance for Clinical Trials and International Networking Clinical Database and Repository: a retrospective study. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 2019 Apr 1;126(5):656–61.
172. Yurdakök M. Fetal and neonatal effects of anticoagulants used in pregnancy: A review. Vol. 54, *Turkish Journal of Pediatrics*. 2012. p. 207–15.
173. Xarelto 20mg film-coated tablets - Summary of Product Characteristics (SmPC) - (emc).
174. Lixiana 60mg Film-Coated Tablets - Summary of Product Characteristics (SmPC) - (emc).

175. Pradaxa 150 mg hard capsules - Summary of Product Characteristics (SmPC) - (emc).
176. Eliquis 5 mg film-coated tablets - Summary of Product Characteristics (SmPC) - (emc).
177. Cohen H, Arachchillage DR, Middeldorp S, Beyer-Westendorf J, Abdul-Kadir R. Management of direct oral anticoagulants in women of childbearing potential: guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2016 Aug 1;14(8):1673–6.
178. Tenti S, Cheleschi S, Guidelli GM, Galeazzi M, Fioravanti A. Intravenous immunoglobulins and antiphospholipid syndrome: How, when and why? A review of the literature. *Autoimmun Rev.* 2015;15(3):226–35.
179. Erre GL, Pardini S, Faedda R, Passiu G. Effect of rituximab on clinical and laboratory features of antiphospholipid syndrome: a case report and a review of literature. *Lupus.* 2008;17(1):50–5.
180. Rodríguez-Pintó I, Cervera R, Espinosa G. Rituximab and its therapeutic potential in catastrophic antiphospholipid syndrome. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2015;7(1):26–30.
181. Kronbichler A, Frank R, Kirschfink M, Szilágyi Á, Csuka D, Prohászka Z, et al. Efficacy of eculizumab in a patient with immunoabsorption-dependent catastrophic antiphospholipid syndrome: A case report. *Med (United States).* 2014 Nov 14;93(26).
182. Alessandri C, Conti F, Pendolino M, Mancini R, Valesini G. New autoantigens in the antiphospholipid syndrome. Vol. 10, *Autoimmunity Reviews.* 2011. p. 609–16.
183. Giannakopoulos B, Passam F, Ioannou Y, Krilis SA. How we diagnose the antiphospholipid syndrome. *Blood.* 2009 Jan 29;113(5):985–94.
184. Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, et al. Update of

- the guidelines for lupus anticoagulant detection. *J Thromb Haemost.* 2009;7(10):1737–40.
185. Keeling D, Mackie I, Moore GW, Greer IA, Greaves M. Guidelines on the investigation and management of antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol.* 2012;157(1):47–58.
186. Devreese KMJ, Pierangeli SS, de Laat B, Tripodi A, Atsumi T, Ortel TL. Testing for Antiphospholipid antibodies with Solid Phase Assays: Guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2014;12(5):792–5.
187. Devreese KMJ, Ortel TL, Pengo V, de Laat B. Laboratory criteria for antiphospholipid syndrome: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2018;16(4):809–13.
188. Livnat T, Zivelin A, Tamarin I, Guetta V, Salomon O. Thrombin generation assay as a possible tool for assessment of reduced activity of clotting factors induced by antiphospholipid antibodies and in-vitro evaluation of treatment options. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2009;20(8):661–6.
189. Zuily S, Aissa KA, Membre A, Regnault V, Lecompte T, Wahl D. Thrombin generation in antiphospholipid syndrome. In: *Lupus.* 2012. p. 758–60.
190. Keeling D, Mackie I, Moore GW, Greer IA, Greaves M. Guidelines on the investigation and management of antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol.* 2012 Apr;157(1):47–58.
191. Devreese KMJ. Antiphospholipid antibody testing and standardization. *Int J Lab Hematol.* 2014 Jun;36(3):352–63.
192. Moore GW. Current controversies in lupus anticoagulant detection. Vol. 5, *Antibodies.* MDPI AG; 2016.
193. Pennings MTT, de Groot PG, Meijers JCM, Huisman A, Derksen RHW, Urbanus RT. Optimisation of lupus anticoagulant tests: Should test samples always be mixed with normal plasma? *Thromb Haemost.*

2014;112(4):736–42.

194. Greaves M, Cohen H, Machin SJ, Mackie I. Guidelines on the investigation and management of the antiphospholipid syndrome. Vol. 109, British Journal of Haematology. John Wiley & Sons, Ltd; 2000. p. 704–15.
195. H60-A Laboratory Testing for the Lupus Anticoagulant; Approved Guideline. 2014.
196. Hematologia: Volumen 22 - N°3 - Sociedad Argentina de Hematología - Google Libros.
197. Martinuzzo ME, Barrera LH, D'Adamo MA, Otaso JC, Gimenez MI, Oyhamburu J. Frequent False-positive results of lupus anticoagulant tests in plasmas of patients receiving the new oral anticoagulants and enoxaparin. *Int J Lab Hematol.* 2014;36(2):144–50.
198. Harris EN, Gharavi AE, Patel SP, Hughes GR. Evaluation of the anti-cardiolipin antibody test: report of an international workshop held 4 April 1986. *Clin Exp Immunol.* 1987 Apr;68(1):215–22.
199. Pengo V, Banzato A, Bison E, Bracco A, Denas G, Ruffatti A. What have we learned about antiphospholipid syndrome from patients and antiphospholipid carrier cohorts? *Semin Thromb Hemost.* 2012;38(4):322–7.
200. Van Hoescke F, Persijn L, Decavele AS, Devreese K. Performance of two new, automated chemiluminescence assay panels for anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I antibodies in the laboratory diagnosis of the antiphospholipid syndrome. *Int J Lab Hematol.* 2012;34(6):630–40.
201. Pengo V, Biasiolo A, Pegoraro C, Cucchini U, Noventa F, Illiceto S. Antibody profiles for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost.* 2005 Jun;93(6):1147–52.
202. Tincani A, Andreoli L, Casu C, Cattaneo R, Meroni P. Antiphospholipid

- antibody profile: Implications for the evaluation and management of patients. Vol. 19, *Lupus*. 2010. p. 432–5.
203. Kelchtermans H, Pelkmans L, de Laat B, Devreese KM. IgG/IgM antiphospholipid antibodies present in the classification criteria for the antiphospholipid syndrome: a critical review of their association with thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2016;14(8):1530–48.
204. Ruffatti A, Olivieri S, Tonello M, Bortolati M, Bison E, Salvan E, et al. Influence of different IgG anticardiolipin antibody cut-off values on antiphospholipid syndrome classification. *J Thromb Haemost*. 2008;6(10):1693–6.
205. Persijn L, Decavele AS, Schouwers S, Devreese K. Evaluation of a new set of automated chemiluminescence assays for anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I antibodies in the laboratory diagnosis of the antiphospholipid syndrome. *Thromb Res*. 2011;128(6):565–9.
206. Tozzoli R, Villalta D. Autoantibody profiling of patients with antiphospholipid syndrome using an automated multiplexed immunoassay system. *Autoimmun Rev*. 2014;13(1):59–63.
207. Devreese KM, Poncet A, Lindhoff-Last E, Musial J, de Moerloose P, Fontana P. A multicenter study to assess the reproducibility of antiphospholipid antibody results produced by an automated system. *J Thromb Haemost*. 2017 Jan 1;15(1):91–5.
208. Willis R, Pierangeli SS. Anti- β 2-glycoprotein I antibodies. *Ann N Y Acad Sci*. 2013;1285(1):44–58.
209. Bertolaccini ML, Hughes GR, Khamashta MA. Revisiting antiphospholipid antibodies: from targeting phospholipids to phospholipid binding proteins. *Clin Lab*. 2004;50(11–12):653–65.
210. Bertolaccini ML, Amengual O, Atsumi T, Binder WL, De Laat B, Forastiero

- R, et al. “Non-criteria” aPL tests: Report of a task force and preconference workshop at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, Galveston, TX, USA, April 2010. In: *Lupus*. SAGE Publications Ltd; 2011. p. 191–205.
211. Sakai Y, Atsumi T, Ieko M, Amengual O, Furukawa S, Furusaki A, et al. The effects of phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody on thrombin generation. *Arthritis Rheum*. 2009 Aug;60(8):2457–67.
212. Sugi T, Katsunuma J, Izumi S, McIntyre JA, Makino T. Prevalence and heterogeneity of antiphosphatidylethanolamine antibodies in patients with recurrent early pregnancy losses. *Fertil Steril*. 1999 Jun;71(6):1060–5.
213. Rand JH, Wu XX, Quinn AS, Taatjes DJ. Resistance to annexin A5 anticoagulant activity: a thrombogenic mechanism for the antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2008 Oct;17(10):922–30.
214. Ortona E, Capozzi A, Colasanti T, Conti F, Alessandri C, Longo A, et al. Vimentin/cardiolipin complex as a new antigenic target of the antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2010 Oct 21;116(16):2960–7.
215. Rodríguez-García V, Ioannou Y, Fernández-Nebro A, Isenberg DA, Giles IP. Examining the prevalence of non-criteria anti-phospholipid antibodies in patients with anti-phospholipid syndrome: A systematic review. *Rheumatol (United Kingdom)*. 2015;54(11):2042–50.
216. De Laat B, Pengo V, Pabinger I, Musial J, Voskuyl AE, Bultink IEM, et al. The association between circulating antibodies against domain I of beta2-glycoprotein I and thrombosis: An international multicenter study. *J Thromb Haemost*. 2009 Nov;7(11):1767–73.
217. De Craemer AS, Musial J, Devreese KMJ. Role of anti-domain 1-β2glycoprotein I antibodies in the diagnosis and risk stratification of antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost*. 2016 Sep 1;14(9):1779–87.

218. Andreoli L, Chighizola CB, Nalli C, Gerosa M, Borghi MO, Pregnolato F, et al. Clinical characterization of antiphospholipid syndrome by detection of IgG antibodies against β 2-glycoprotein I domain 1 and domain 4/5: Ratio of anti-domain 1 to anti-domain 4/5 as a useful new biomarker for antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(8):2196–204.
219. Iwaniec T, Kaczor MP, Celińska-Löwenhoff M, Polański S, Musiał J. Clinical significance of anti-domain 1 β 2-glycoprotein I antibodies in antiphospholipid syndrome. *Thromb Res.* 2017 May 1;153:90–4.
220. Pengo V, Ruffatti A, Tonello M, Hoxha A, Bison E, Denas G, et al. Antibodies to Domain 4/5 (Dm4/5) of β 2-Glycoprotein 1 (β 2GP1) in different antiphospholipid (aPL) antibody profiles. *Thromb Res.* 2015 Jul 1;136(1):161–3.
221. Litvinova E, Darnige L, Kirilovsky A, Burnel Y, de Luna G, Dragon-Durey M-A. Prevalence and Significance of Non-conventional Antiphospholipid Antibodies in Patients With Clinical APS Criteria. *Front Immunol.* 2018 Dec 14;9.
222. Bertolaccini ML, Sciascia S, Murru V, Garcia-Fernandez C, Sanna G, Khamashta MA. Prevalence of antibodies to prothrombin in solid phase (aPT) and to phosphatidylserine-prothrombin complex (aPS/PT) in patients with and without lupus anticoagulant. *Thromb Haemost.* 2013;109(2):207–13.
223. Pregnolato F, Chighizola CB, Encabo S, Shums Z, Norman GL, Tripodi A, et al. Anti-phosphatidylserine/prothrombin antibodies: An additional diagnostic marker for APS? *Immunol Res.* 2013 Jul;56(2–3):432–8.
224. Nakamura H, Oku K, Amengual O, Ohmura K, Fujieda Y, Kato M, et al. First-Line, Non-Criterial Antiphospholipid Antibody Testing for the Diagnosis of Antiphospholipid Syndrome in Clinical Practice: A Combination of Anti- β 2-Glycoprotein I Domain I and Anti-

- Phosphatidylserine/Prothrombin Complex Antibodies Tests. *Arthritis Care Res.* 2018 Apr 1;70(4):627–34.
225. Sciascia S, Sanna G, Murru V, Roccatello D, Khamashta MA, Bertolaccini ML. Anti-prothrombin (aPT) and anti-phosphatidylserine/prothrombin (aPS/PT) antibodies and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome a systematic review. *Thromb Haemost.* 2013 Oct 31;111(2):354–64.
226. Sanmarco M, Gayet S, Alessi M-C, Audrain M, de Maistre E, Gris J-C, et al. Antiphosphatidylethanolamine antibodies are associated with an increased odds ratio for thrombosis. A multicenter study with the participation of the European Forum on antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost.* 2007 Jun;97(6):949–54.
227. Conti F, Alessandri C, Sorice M, Capozzi A, Longo A, Garofalo T, et al. Thin-layer chromatography immunostaining in detecting anti-phospholipid antibodies in seronegative anti-phospholipid syndrome. *Clin Exp Immunol.* 2012 Mar;167(3):429–37.
228. Staub HL, Bertolaccini ML, Khamashta MA. Anti-phosphatidylethanolamine antibody, thromboembolic events and the antiphospholipid syndrome. Vol. 12, *Autoimmunity Reviews*. 2012. p. 230–4.
229. Miyakis S, Giannakopoulos B, Krilis SA. Beta 2 glycoprotein I-function in health and disease. *Thromb Res.* 2004;114(5-6 SPEC. ISS.):335–46.
230. Caronti B, Calderaro C, Alessandri C, Conti F, Tinghino R, Palladini G, et al. β 2-Glycoprotein I (β 2-GPI) mRNA is expressed by several cell types involved in anti-phospholipid syndrome-related tissue damage. *Clin Exp Immunol.* 1999;115(1):214–9.
231. Matsuura E, Shen L, Matsunami Y, Quan N, Makarova M, Geske FJ, et al. Pathophysiology of beta2-glycoprotein I in antiphospholipid syndrome.

- Lupus. 2010 Apr;19(4):379–84.
232. Takeya H, Mori T, Gabazza EC, Kuroda K, Deguchi H, Matsuura E, et al. Anti- β 2-glycoprotein I (β 2GPI) monoclonal antibodies with lupus anticoagulant-like activity enhance the β 2GPI binding to phospholipids. *J Clin Invest*. 1997 May 1;99(9):2260–8.
233. Kobayashi K, Kishi M, Atsumi T, Bertolaccini ML, Makino H, Sakairi N, et al. Circulating oxidized LDL forms complexes with β 2-glycoprotein I: Implication as an atherogenic autoantigen. *J Lipid Res*. 2003 Apr;44(4):716–26.
234. Pittoni V, Ravirajan CT, Donohoe S, Machin SJ, Lydyard PM, Isenberg DA. Human monoclonal anti-phospholipid antibodies selectively bind to membrane phospholipid and β 2-glycoprotein I (β 2-GPI) on apoptotic cells. *Clin Exp Immunol*. 2000;119(3):533–43.
235. Matsuura E, Kobayashi K, Tabuchi M, Lopez LR. Oxidative modification of low-density lipoprotein and immune regulation of atherosclerosis. Vol. 45, *Progress in Lipid Research*. 2006. p. 466–86.
236. Ağar Ç, Van Os GMA, Mörgelin M, Sprenger RR, Marquart JA, Urbanus RT, et al. β 2-Glycoprotein I can exist in 2 conformations: Implications for our understanding of the antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2010 Aug 26;116(8):1336–43.
237. Chighizola CB, Gerosa M, Meroni PL. New tests to detect antiphospholipid antibodies: Anti-domain I β 2-glycoprotein-I antibodies. *Curr Rheumatol Rep*. 2014;16(2):1–9.
238. Hammel M, Kriechbaum M, Gries A, Kostner GM, Laggner P, Prassl R. Solution structure of human and bovine β 2-glycoprotein I revealed by small-angle X-ray scattering. *J Mol Biol*. 2002;321(1):85–97.
239. Passam FH, Giannakopoulos B, Mirarabshahi P, Krilis SA. Molecular

- pathophysiology of the antiphospholipid syndrome: The role of oxidative post-translational modification of beta 2 glycoprotein I. *J Thromb Haemost.* 2011;9(1 S):275–82.
240. Ieko M, Ichikawa K, Triplett DA, Matsuura E, Atsumi T, Sawada K-I, et al. B2-glycoprotein I is necessary to inhibit protein C activity by monoclonal anticardiolipin antibodies. *Arthritis Rheum.* 1999 Jan;42(1):167–74.
241. Nimpf J, Bevers EM, Bomans PHH, Till U, Wurm H, Kostner GM, et al. Prothrombinase activity of human platelets is inhibited by β 2-glycoprotein-I. *BBA - Gen Subj.* 1986 Oct 29;884(1):142–9.
242. Nimpf J, Wurm H, Kostner GM. Interaction of beta 2-glycoprotein-I with human blood platelets: influence upon the ADP-induced aggregation. *Thromb Haemost.* 1985 Aug 30;54(2):397–401.
243. Shi T, Iverson GM, Qi JC, Cockerill KA, Linnik MD, Konecny P, et al. β 2-Glycoprotein I binds factor XI and inhibits its activation by thrombin and factor XIIa: Loss of inhibition by clipped β 2-glycoprotein I. *P Natl Acad Sci USA.* 2004;101(11):3939–44.
244. Rahgozar S, Yang Q, Giannakopoulos B, Yan X, Miyakis S, Krilis SA. Beta2-glycoprotein I binds thrombin via exosite I and exosite II: Anti- β 2-glycoprotein I antibodies potentiate the inhibitory effect of β 2-glycoprotein I on thrombin-mediated factor XIa generation. *Arthritis Rheum.* 2007;56(2):605–13.
245. Kato A, Asakai R, Davie EW, Aoki N. Factor XI gene (F11) is located on the distal end of the long arm of human chromosome 4. *Cytogenet Cell Genet.* 1989;52(1–2):77–8.
246. Cheng Q, Kantz J, Poffenberger G, Powers AC, Gailani D. Factor XI protein in human pancreas and kidney. Vol. 100, *Thrombosis and Haemostasis.* 2008. p. 158–60.

247. Tarumi T, Kravtsov D V., Zhao M, Williams SM, Gailani D. Cloning and characterization of the human factor XI gene promoter: Transcription factor hepatocyte nuclear factor 4a (HNF-4a) is required for hepatocyte-specific expression of factor XI. *J Biol Chem.* 2002 May 24;277(21):18510–6.
248. Gailani D, Smith SB. Structural and functional features of factor XI. Vol. 7, *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2009. p. 75–8.
249. Gomez K, Bolton-Maggs P. Factor XI deficiency. *Haemophilia.* 2008;14(6):1183–9.
250. Emsley J, McEwan PA, Gailani D. Structure and function of factor XI. Vol. 115, *Blood.* 2010. p. 2569–77.
251. Berber E. Molecular characterization of FXI deficiency. *Clin Appl Thromb.* 2011 Feb;17(1):27–32.
252. Brotman DJ, Girod JP, Posch A, Jani JT, Patel J V., Gupta M, et al. Effects of short-term glucocorticoids on hemostatic factors in healthy volunteers. *Thromb Res.* 2006;118(2):247–52.
253. Papagrigoriou E, McEwan PA, Walsh PN, Emsley J. Crystal structure of the factor XI zymogen reveals a pathway for transactivation. *Nat Struct Mol Biol.* 2006 Jun 26;13(6):557–8.
254. Geng Y, Verhamme IM, Smith SB, Sun M fu, Matafonov A, Cheng Q, et al. The dimeric structure of factor XI and zymogen activation. *Blood.* 2013 May 9;121(19):3962–9.
255. Kravtsov D V., Matafonov A, Tucker EI, Sun MF, Walsh PN, Gruber A, et al. Factor XI contributes to thrombin generation in the absence of factor XII. *Blood.* 2009;114(2):452–8.
256. Fujikawa K, Chung DW, Hendrickson LE, Davie EW. Amino Acid Sequence of Human Factor XI, a Blood Coagulation Factor with Four Tandem

- Repeats That Are Highly Homologous with Plasma Prekallikrein. *Biochemistry*. 1986;25(9):2417–24.
257. Ponczek MB, Gailani D, Doolittle RF. Evolution of the contact phase of vertebrate blood coagulation. *J Thromb Haemost*. 2008;6(11):1876–83.
258. Puy C, Rigg RA, McCarty OJT. The hemostatic role of factor XI. *Thromb Res*. 2016 May 1;141:S8–11.
259. Cheng Q, Tucker EI, Pine MS, Sisler I, Matafonov A, Sun MF, et al. A role for factor XIIa-mediated factor XI activation in thrombus formation in vivo. *Blood*. 2010 Nov 11;116(19):3981–9.
260. He R, Chen D, He S. Factor XI: Hemostasis, thrombosis, and antithrombosis. Vol. 129, *Thrombosis Research*. 2012. p. 541–50.
261. Gailani D, Broze GJ. Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. *Science* (80-). 1991;253(5022):909–12.
262. Schmaier AH. Physiologic activities of the Contact Activation System. *Thromb Res*. 2014;133(SUPPL. 1).
263. Visser M, Heitmeier S, Ten Cate H, Spronk HMH. Role of Factor XIa and Plasma Kallikrein in Arterial and Venous Thrombosis. *Thromb Haemost*. 2020;120(6):883–993.
264. Mohammed BM, Cheng Q, Matafonov A, Monroe DM, Meijers JCM, Gailani D. Factor XI promotes hemostasis in factor IX-deficient mice. *J Thromb Haemost*. 2018 Oct 1;16(10):2044–9.
265. Puy C, Tucker EI, Matafonov A, Cheng Q, Zientek KD, Gailani D, et al. Activated factor XI increases the procoagulant activity of the extrinsic pathway by inactivating tissue factor pathway inhibitor. *Blood*. 2015;125(9):1488–96.
266. Kleinschnitz C, Stoll G, Bendszus M, Schuh K, Pauer HU, Burfeind P, et al.

- Targeting coagulation factor XII provides protection from pathological thrombosis in cerebral ischemia without interfering with hemostasis. *J Exp Med.* 2006 Mar 20;203(3):513–8.
267. Renné T, Gailani D. Role of factor XII in hemostasis and thrombosis: Clinical implications. Vol. 5, *Expert Review of Cardiovascular Therapy.* 2007. p. 733–41.
268. Seligsohn U. Factor XI in haemostasis and thrombosis: past, present and future. *Thromb Haemost.* 2007 Jul;98(1):84–9.
269. Von dem Borne PAK, Meijers JCM, Bouma BN. Feedback activation of factor XI by thrombin in plasma results in additional formation of thrombin that protects fibrin clots from fibrinolysis. *Blood.* 1995;86(8):3035–42.
270. Itakura A, Verboort NG, Phillips KG, Insall RH, Gailani D, Tucker EI, et al. Activated factor XI inhibits chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes. *J Leukoc Biol.* 2011 Nov;90(5):923–7.
271. Van Gorp ECM, Minnema MC, Suharti C, Mairuhu ATA, Brandjes DPM, Cate H Ten, et al. Activation of coagulation factor XI, without detectable contact activation in dengue haemorrhagic fever. *Br J Haematol.* 2001;113(1):94–9.
272. Tucker EI, Gailani D, Hurst S, Cheng Q, Hanson SR, Gruber A. Survival advantage of coagulation factor XI-deficient mice during peritoneal sepsis. *J Infect Dis.* 2008 Jul 15;198(2):271–4.
273. Meijers JCM, Tekelenburg WLH, Bouma BN, Bertina RM, Rosendaal FR. High Levels of Coagulation Factor XI as a Risk Factor for Venous Thrombosis. *N Engl J Med.* 2000 Mar 9;342(10):696–701.
274. Eichinger S, Schönauer V, Weltermann A, Minar E, Bialonczyk C, Hirschl M, et al. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for

- recurrent venous thromboembolism. *Blood*. 2004 May 15;103(10):3773–6.
275. Kyrle PA, Eischer L, Šinkovec H, Eichinger S. Factor XI and recurrent venous thrombosis: an observational cohort study. *J Thromb Haemost*. 2019;17(5):782–6.
276. Berliner JI, Rybicki AC, Kaplan RC, Monrad ES, Freeman R, Billett HH. Elevated levels of Factor XI are associated with cardiovascular disease in women. *Thromb Res*. 2002 Jul 15;107(1–2):55–60.
277. Merlo C, Wuillemin WA, Redondo M, Furlan M, Sulzer I, Kremer-Hovinga J, et al. Elevated levels of plasma prekallikrein, high molecular weight kininogen and factor XI in coronary heart disease. *Atherosclerosis*. 2002;161(2):261–7.
278. Loeffen R, Van Oerle R, De Groot PG, Waltenberger J, Crijns HJ, Spronk HMM, et al. Increased factor XIa levels in patients with a first acute myocardial infarction: The introduction of a new thrombin generation based factor XIa assay. *Thromb Res*. 2014;134(6):1328–34.
279. Yang DT, Flanders MM, Kim H, Rodgers GM. Elevated factor XI activity levels are associated with an increased odds ratio for cerebrovascular events. *Am J Clin Pathol*. 2006;126(3):411–5.
280. Renné T. The procoagulant and proinflammatory plasma contact system. Vol. 34, *Seminars in Immunopathology*. Semin Immunopathol; 2012. p. 31–41.
281. Gailani D, Bane CE, Gruber A. Factor XI and contact activation as targets for antithrombotic therapy. *J Thromb Haemost*. 2015 Aug 1;13(8):1383–95.
282. Van Montfoort ML, Meijers JCM. Recent insights into the role of the contact pathway in thrombo-inflammatory disorders. *Hematol (United*

- States). 2014 Dec 5;2014(1):60–5.
283. Long AT, Kenne E, Jung R, Fuchs TA, Renné T. Contact system revisited: An interface between inflammation, coagulation, and innate immunity. Vol. 14, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. Blackwell Publishing Ltd; 2016. p. 427–37.
284. Colman RW, Schmaier AH. Contact system: A vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. Vol. 90, *Blood*. American Society of Hematology; 1997. p. 3819–43.
285. Herwald H, Mörgelin M, Olsén A, Rhen M, Dahlbäck B, Müller-Esterl W, et al. Activation of the contact-phase system on bacterial surfaces - A clue to serious complications in infectious diseases. *Nat Med*. 1998;4(3):298–302.
286. Levi M, Van Der Poll T. Two-way interactions between inflammation and coagulation. Vol. 15, *Trends in Cardiovascular Medicine*. Trends Cardiovasc Med; 2005. p. 254–9.
287. Ge X, Yamaguchi Y, Zhao L, Bury L, Gresele P, Berube C, et al. Prochemerin cleavage by factor XIa links coagulation and inflammation. Vol. 131, *Blood*. 2018. p. 353–64.
288. Pawlinski R, Mackman N. Cellular sources of tissue factor in endotoxemia and sepsis. Vol. 125, *Thrombosis Research*. Thromb Res; 2010.
289. Corral J, Yélamos J, Hernández-Espinosa D, Monreal Y, Mota R, Arcas I, et al. Role of lipopolysaccharide and cecal ligation and puncture on blood coagulation and inflammation in sensitive and resistant mice models. *Am J Pathol*. 2005;166(4):1089–98.
290. Tucker EI, Verboort NG, Leung PY, Hurst S, McCarty OJT, Gailani D, et al. Inhibition of factor XI activation attenuates inflammation and coagulopathy while improving the survival of mouse polymicrobial sepsis.

- Blood. 2012 May 17;119(20):4762–8.
291. Rosenthal RL, Dreskin OH, Rosenthal N. New Hemophilia-like Disease Caused by Deficiency of a Third Plasma Thromboplastin Factor. *Exp Biol Med.* 1953 Jan 1;82(1):171–4.
 292. Bolton-Maggs PHB, Young Wan-Yin B, McCraw AH, Slack J, Kernoff PBA. Inheritance and bleeding in factor XI deficiency. *Br J Haematol.* 1988;69(4):521–8.
 293. Salomon O, Steinberg DM, Seligshon U. Variable bleeding manifestations characterize different types of surgery in patients with severe factor XI deficiency enabling parsimonious use of replacement therapy. *Haemophilia.* 2006 Sep;12(5):490–3.
 294. Esteban Medina JA. Aspectos clínico-biológicos de la patología molecular del factor XI. 2016;1.
 295. Mannhalter C, Hellstern P, Deutsch E. Identification of a defective factor XI cross-reacting material in a factor XI-deficient patient. *Blood.* 1987 Jul 1;70(1):31–7.
 296. Zadra G, Asselta R, Malcovati M, Santagostino E, Peyvandi F, Mannucci PM, et al. Molecular genetic analysis of severe coagulation factor XI deficiency in six Italian patients. *Haematologica.* 2004 Nov;89(11):1332–40.
 297. Saunders RE, Shiltagh N, Gomez K, Mellars G, Cooper C, Perry DJ, et al. Structural analysis of eight novel and 112 previously reported missense mutations in the interactive FXI mutation database reveals new insight on FXI deficiency. *Thromb Haemost.* 2009 Aug;102(2):287–301.
 298. Shpilberg O, Peretz H, Zivelin A, Yatuv R, Chetrit A, Kulka T, et al. One of the two common mutations causing factor XI deficiency in Ashkenazi Jews (type II) is also prevalent in Iraqi Jews, who represent the ancient gene

- pool of Jews. *Blood*. 1995 Jan 15;85(2):429–32.
299. Asakai R, Chung DW, Davie EW, Seligsohn U. Factor XI deficiency in ashkenazi jews in israel. *N Engl J Med*. 1991 Jul 18;325(3):153–8.
300. Asselta R, Paraboschi EM, Rimoldi V, Menegatti M, Peyvandi F, Salomon O, et al. Exploring the global landscape of genetic variation in coagulation factor XI deficiency. *Blood*. 2017 Jul 27;130(4):e1–6.
301. Bortoli R, Monticciolo OA, Chakr RM, Palominos PE, Rohsig LM, Kohem CL, et al. Acquired Factor XI Inhibitor in Systemic Lupus Erythematosus-Case Report and Literature Review. *Semin Arthritis Rheum*. 2009;39(1):61–5.
302. Krieger H, Leddy JP, Breckenridge RT. Studies on a circulating anticoagulant in systemic lupus erythematosus: evidence for inhibition of the function of activated plasma thromboplastin antecedent (factor XIa). *Blood*. 1975 Aug;46(2):189–97.
303. Ortiz Jiménez E, Loera Fragoso S, Rull Gabayet M. Inhibidores adquiridos de la coagulación en una paciente con lupus eritematoso sistémico y anticuerpos antifosfolipídicos: Respuesta a rituximab. *Reumatol Clin*. 2008;4(2):74–6.
304. Salloum-Asfar S, de la Morena-Barrio ME, Esteban J, Miñano A, Aroca C, Vicente V, et al. Assessment of two contact activation reagents for the diagnosis of congenital factor XI deficiency. *Thromb Res*. 2018 Mar 1;163:64–70.
305. Gailani D, Lasky NM, Broze GJ. A murine model of factor XI deficiency. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1997 Mar;8(2):134–44.
306. Renné T, Oschatz C, Seifert S, Müller F, Antovic J, Karlman M, et al. Factor XI deficiency in animal models. Vol. 7, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2009. p. 79–83.
307. Ay C, Hisada Y, Cooley BC, Mackman N. Factor XI-deficient mice exhibit

- increased bleeding after injury to the saphenous vein. *J Thromb Haemost.* 2017;15(9):1829–33.
308. WANG X, SMITH PL, HSU M-Y, GAILANI D, SCHUMACHER WA, OGLETREE ML, et al. Effects of factor XI deficiency on ferric chloride-induced vena cava thrombosis in mice. *J Thromb Haemost.* 2006 Sep;4(9):1982–8.
309. Salomon O, Steinberg D, Zucker M, Varon D, Zivelin A, Seligsohn U. Patients with severe factor XI deficiency have a reduced incidence of deep-vein thrombosis. *Thromb Haemost.* 2011 Nov 25;105(02):269–73.
310. Salomon O, Steinberg DM, Koren-Morag N, Tanne D, Seligsohn U. Reduced incidence of ischemic stroke in patients with severe factor XI deficiency. *Blood.* 2008 Apr 15;111(8):4113–7.
311. Preis M, Hirsch J, Kotler A, Zoabi A, Stein N, Rennert G, et al. Factor XI deficiency is associated with lower risk for cardiovascular and venous thromboembolism events. *Blood.* 2017 Mar 2;129(9):1210–5.
312. Girolami A, Peroni E, Girolami B, Ferrari S, Lombardi AM. Congenital factor XI and factor VII deficiencies assure an apparent opposite protection against arterial or venous thrombosis: An intriguing observation. 2016.
313. Salomon O, Steinberg DM, Dardik R, Rosenberg N, Zivelin A, Tamarin I, et al. Inherited factor XI deficiency confers no protection against acute myocardial infarction. *J Thromb Haemost.* 2003 Apr;1(4):658–61.
314. Tucker EI, Marzec UM, White TC, Hurst S, Rugonyi S, McCarty OJT, et al. Prevention of vascular graft occlusion and thrombus-associated thrombin generation by inhibition of factor XI. *Blood.* 2009 Jan 22;113(4):936–44.
315. Grover SP, Mackman N. Intrinsic Pathway of Coagulation and Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019 Mar 1;39(3):331–8.
316. Grover SP, Olson TM, Cooley BC, Mackman N. Model-dependent

- contributions of FXII and FXI to venous thrombosis in mice. *J Thromb Haemost.* 2020 Nov 1;18(11):2899–909.
317. Rosen ED, Gailani D, Castellino FJ. FXI is essential for thrombus formation following FeCl₃-induced injury of the carotid artery in the mouse. *Thromb Haemost.* 2002 Apr;87(4):774–6.
318. Wang X, Smith PL, Hsu MY, Gailani D, Schumacher WA, Ogletree ML, et al. Effects of factor XI deficiency on ferric chloride-induced vena cava thrombosis in mice. *J Thromb Haemost.* 2006 Sep;4(9):1982–8.
319. Regan Baird T, Gailani D, Furie B, Furie BC. Factor XI Deficient Mice Have Reduced Platelet Accumulation and Fibrin Deposition after Laser Injury. *Blood.* 2004 Nov 16;104(11):218–218.
320. Renné T, Pozgajová M, Grüner S, Schuh K, Pauer HU, Burfeind P, et al. Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. *J Exp Med.* 2005 Jul 18;202(2):271–81.
321. Chan JCY, Ganopoulos JG, Cornelissen I, Suckow MA, Sandoval-Cooper MJ, Brown EC, et al. The characterization of mice with a targeted combined deficiency of protein C and factor XI. *Am J Pathol.* 2001 Feb;158(2):469–79.
322. Gruber A, Hanson SR. Factor XI-dependence of surface- and tissue factor-initiated thrombus propagation in primates. *Blood.* 2003 Aug 1;102(3):953–5.
323. Fredenburgh JC, Gross PL, Weitz JI. Emerging anticoagulant strategies. Vol. 129, *Blood*. American Society of Hematology; 2017. p. 147–54.
324. Raskob GE, Angchaisuksiri P, Blanco AN, Büller H, Gallus A, Hunt BJ, et al. Thrombosis: A Major Contributor to Global Disease Burden. *Semin Thromb Hemost.* 2014 Aug 31;40(7):724–35.
325. Shah, N.; Ortel, T. L.; Schulman S. Vitamin K Antagonists: Biochemistry,

- Pharmacology, and Management | Oncohematol Key. Hemostasis and Thrombosis, Basic Principles and Clinical Practice, 6th ed.; Marder, V. J., Aird, W. C., Benett, J. S., Schulman, S., White, G. C., Eds.; Wolters Kluwer/Lippincott, Williams & Wilkins: Philadelphia, PA,,. 2013. p. 1267–1281.
326. Yeh CH, Hogg K, Weitz JI. Overview of the new oral anticoagulants: Opportunities and challenges. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015 May 27;35(5):1056–65.
327. Makam RCP, Hoaglin DC, McManus DD, Wang V, Gore JM, Spencer FA, et al. Efficacy and safety of direct oral anticoagulants approved for cardiovascular indications: Systematic review and meta-analysis. Vol. 13, *PLoS ONE*. Public Library of Science; 2018.
328. Escobar C, Martí-Almor J, Pérez Cabeza A, Martínez-Zapata MJ. Direct Oral Anticoagulants Versus Vitamin K Antagonists in Real-life Patients With Atrial Fibrillation. A Systematic Review and Meta-analysis. *Rev Esp Cardiol.* 2019 Apr 1;72(4):305–16.
329. Soff GA. A new generation of oral direct anticoagulants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012 Mar;32(3):569–74.
330. Ruff CT, Giugliano RP, Braunwald E, Hoffman EB, Deenadayalu N, Ezekowitz MD, et al. Comparison of the efficacy and safety of new oral anticoagulants with warfarin in patients with atrial fibrillation: A meta-analysis of randomised trials. *Lancet.* 2014;383(9921):955–62.
331. Zhou Y, Ma J, Zhu W. Efficacy and Safety of Direct Oral Anticoagulants Versus Warfarin in Patients with Atrial Fibrillation Across BMI Categories: A Systematic Review and Meta-Analysis. Vol. 20, *American Journal of Cardiovascular Drugs*. Adis; 2020. p. 51–60.
332. Milling TJ, Ziebell CM. A review of oral anticoagulants, old and new, in major bleeding and the need for urgent surgery. Vol. 30, *Trends in*

- Cardiovascular Medicine. Elsevier Inc.; 2020. p. 86–90.
333. Gailani D, Renné T. The intrinsic pathway of coagulation: a target for treating thromboembolic disease? *J Thromb Haemost.* 2007 Jun;5(6):1106–12.
334. Quan ML, Pinto DJP, Smallheer JM, Ewing WR, Rossi KA, Luetzgen JM, et al. Factor XIa Inhibitors as New Anticoagulants. *J Med Chem.* 2018;61(17):7425–47.
335. Yau JW, Liao P, Fredenburgh JC, Stafford AR, Revenko AS, Monia BP, et al. Selective depletion of factor XI or factor XII with antisense oligonucleotides attenuates catheter thrombosis in rabbits. *Blood.* 2014 Mar 27;123(13):2102–7.
336. Crosby JR, Marzec U, Revenko AS, Zhao C, Gao D, Matafonov A, et al. Antithrombotic effect of antisense factor xi oligonucleotide treatment in primates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013 Jul;33(7):1670–8.
337. Zhang H, Löwenberg EC, Crosby JR, MacLeod AR, Zhao C, Gao D, et al. Inhibition of the intrinsic coagulation pathway factor XI by antisense oligonucleotides: A novel antithrombotic strategy with lowered bleeding risk. *Blood.* 2010 Nov 25;116(22):4684–92.
338. Büller HR, Bethune C, Bhanot S, Gailani D, Monia BP, Raskob GE, et al. Factor XI Antisense Oligonucleotide for Prevention of Venous Thrombosis. *N Engl J Med.* 2015 Jan 15;372(3):232–40.
339. Löwenberg EC, Meijers JCM, Monia BP, Levi M. Coagulation factor XI as a novel target for antithrombotic treatment. Vol. 8, *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2010. p. 2349–57.
340. Tucker EI, Marzec UM, White TC, Hurst S, Rugonyi S, McCarty OJT, et al. Prevention of vascular graft occlusion and thrombus-associated thrombin generation by inhibition of factor XI. *Blood.* 2009 Jan 22;113(4):936–44.

341. Karuturi R, Al-Horani RA, Mehta SC, Gailani D, Desai UR. Discovery of allosteric modulators of factor XIa by targeting hydrophobic domains adjacent to its heparin-binding site. *J Med Chem.* 2013 Mar 28;56(6):2415–28.
342. Woodruff RS, Ivanov I, Verhamme IM, Sun MF, Gailani D, Sullenger BA. Generation and characterization of aptamers targeting factor XIa. *Thromb Res.* 2017 Aug 1;156:134–41.
343. Donkor DA, Bhakta V, Eltringham-Smith LJ, Stafford AR, Weitz JI, Sheffield WP. Selection and characterization of a DNA aptamer inhibiting coagulation factor XIa. *Sci Rep.* 2017 Dec 1;7(1):1–13.
344. Perera V, Luetzgen JM, Wang Z, Frost CE, Yones C, Russo C, et al. First-in-human study to assess the safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of BMS-962212, a direct, reversible, small molecule factor XIa inhibitor in non-Japanese and Japanese healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 2018 May 1;84(5):876–87.
345. Wong PC, Crain EJ, Watson CA, Schumacher WA. A small-molecule factor XIa inhibitor produces antithrombotic efficacy with minimal bleeding time prolongation in rabbits. *J Thromb Thrombolysis.* 2011 Aug;32(2):129–37.
346. Al-Horani RA, Desai UR. Designing allosteric inhibitors of factor XIa. Lessons from the interactions of sulfated pentagalloylglucopyranosides. *J Med Chem.* 2014 Jun 12;57(11):4805–18.
347. Thomas D, Thelen K, Kraff S, Schwers S, Schiffer S, Unger S, et al. BAY 1213790, a fully human IgG1 antibody targeting coagulation factor XIa: First evaluation of safety, pharmacodynamics, and pharmacokinetics. *Res Pract Thromb Haemost.* 2019 Apr;3(2):242–53.
348. Weitz JI, Bauersachs R, Becker B, Berkowitz SD, Freitas MCS, Lassen MR, et al. Effect of Osocimab in Preventing Venous Thromboembolism among Patients Undergoing Knee Arthroplasty: The FOXTROT Randomized

- Clinical Trial. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2020 Jan 14;323(2):130–9.
349. Zhong C, Zhang L, Chen L, Deng L, Li R. Coagulation factor XI vaccination: an alternative strategy to prevent thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2017;15(1):122–30.
350. Pinto DJP, Orwat MJ, Smith LM, Quan ML, Lam PYS, Rossi KA, et al. Discovery of a Parenteral Small Molecule Coagulation Factor XIa Inhibitor Clinical Candidate (BMS-962212). *J Med Chem.* 2017 Dec 14;60(23):9703–23.
351. Deloughery E, Olson SR, Puy C, Mccarty OJ, Shatzel JJ. The safety and efficacy of novel agents targeting factor XI and XII in early phase human trials. Introduction. *Semin Thromb Hemost.* 2019;45(5):502–8.
352. Lorentz CU, Verbout NG, Wallisch M, Hagen MW, Shatzel JJ, Olson SR, et al. The contact activation inhibitor and factor XI antibody, AB023, produces safe, dose-dependent anticoagulation in a phase 1 first-in-human trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019 Apr 1;39(4):799.
353. Lorentz CU, Tucker EI, Verbout NG, Shatzel JJ, Olson SR, Markway BD, et al. Contact Activation Inhibitor, AB023, in Heparin-Free Hemodialysis: Results of a Randomized Phase 2 Clinical Trial. *Blood.* 2021 Jun 4;
354. Weitz JI, Bauersachs R, Becker B, Berkowitz SD, Freitas MCS, Lassen MR, et al. Effect of Osocimab in Preventing Venous Thromboembolism among Patients Undergoing Knee Arthroplasty: The FOXTROT Randomized Clinical Trial. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2020 Jan 14;323(2):130–9.
355. MurciaSalud. Servicio de Planificación y Financiación Sanitaria. Consejería de Salud de la Región de Murcia. Población por Áreas de Salud y Zonas de Salud por sexo y grupos de edad según padrón.
356. Navarro-Fernández J, de la Morena-Barrio ME, Martínez-Alonso E, Dybedal I, Toderici M, Bohdan N, et al. Biochemical and cellular

- consequences of the antithrombin p.Met1? mutation identified in a severe thrombophilic family. *Oncotarget*. 2018 Sep 4;9(69):33202–14.
357. Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guidelines, CLSI document C28-A3, Vol. 28, No. 3 | Request PDF.
358. Ledford-Kraemer M, Moore G, H RB-C document, 2014 undefined. Laboratory testing for the lupus anticoagulant; Approved guideline.
359. Moore GW. Recent guidelines and recommendations for laboratory detection of lupus anticoagulants. *Semin Thromb Hemost*. 2014 Mar;40(2):163–71.
360. Lakos G, Bentow C, Mahler M. A Clinical Approach for Defining the Threshold between Low and Medium Anti-Cardiolipin Antibody Levels for QUANTA Flash Assays. *Antibodies*. 2016;5(2):14.
361. Corral J, Huntington JA, González-Conejero R, Mushunje A, Navarro M, Marco P, et al. Mutations in the shutter region of antithrombin result in formation of disulfide-linked dimers and severe venous thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2004 Jun;2(6):931–9.
362. Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, De Backer G, et al. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: The SCORE project. *Eur Heart J*. 2003 Jun;24(11):987–1003.
363. Asakai R, Chung DW, Ratnoff OD, Davie EW. Factor XI (plasma thromboplastin antecedent) deficiency in Ashkenazi Jews is a bleeding disorder that can result from three types of point mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(20):7667–71.
364. Peretz H, Mulai A, Usher S, Zivelin A, Segal A, Weisman Z, et al. The two common mutations causing factor XI deficiency in Jews stem from distinct founders: one of ancient Middle Eastern origin and another of more recent

- European origin. *Blood*. 1997 Oct 1;90(7):2654–9.
365. Mitchell M, Mountford R, Butler R, Alhaq A, Dai L, Savidge G, et al. Spectrum of factor XI (F11) mutations in the UK population--116 index cases and 140 mutations. *Hum Mutat*. 2006;27(8):829.
366. O'Connell NM, Saunders RE, Lee CA, Perry DJ, Perkins SJ. Structural interpretation of 42 mutations causing factor XI deficiency using homology modeling. *J Thromb Haemost*. 2005;3(1):127–38.
367. Saunders RE, Shiltagh N, Gomez K, Mellars G, Cooper C, Perry DJ, et al. Structural analysis of eight novel and 112 previously reported missense mutations in the interactive FXI mutation database reveals new insight on FXI deficiency. *Thromb Haemost*. 2009 Aug;102(2):287–301.
368. Devreese KMJ. No more mixing tests required for integrated assay systems in the laboratory diagnosis of lupus anticoagulants?. Vol. 8, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. Blackwell Publishing Ltd; 2010. p. 1120–2.
369. Devreese KMJ, de Laat B. Mixing studies in lupus anticoagulant testing are required at least in some type of samples. *J Thromb Haemost*. 2015 Aug 1;13(8):1475–8.
370. Girón-González JA, García Del Río E, Rodríguez C, Rodríguez-Martorell J, Serrano A. Antiphospholipid syndrome and asymptomatic carriers of antiphospholipid antibody: Prospective analysis of 404 individuals. *J Rheumatol*. 2004;31(8):1560–7.
371. Fernández Mosteirín N. Perfil clínico-analítico y riesgo trombótico en pacientes con síndrome antifosfolípido y/o conectivopatía. 2014.
372. Tarr T, Lakos G, Bhattoa HP, Shoenfeld Y, Szegedi G, Kiss E. Analysis of risk factors for the development of thrombotic complications in antiphospholipid antibody positive lupus patients. *Lupus*. 2007;16(1):39–45.

373. Danowski A, De Azevedo MNL, Papi JADS, Petri M. Determinants of risk for venous and arterial thrombosis in primary antiphospholipid syndrome and in antiphospholipid syndrome with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2009 Jun 1;36(6):1195–9.
374. de Groot PG, de Laat B. Mechanisms of thrombosis in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. Vol. 31, *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology*. Bailliere Tindall Ltd; 2017. p. 334–41.
375. Hansen KE, Kong DF, Moore KD, Ortel TL. Risk factors associated with thrombosis in patients with antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol.* 2001;28(9):2018–24.
376. Chayoua W, Kelchtermans H, Moore GW, Musiał J, Wahl D, de Laat B, et al. Identification of high thrombotic risk triple-positive antiphospholipid syndrome patients is dependent on anti-cardiolipin and anti- β 2glycoprotein I antibody detection assays. *J Thromb Haemost.* 2018 Oct 1;16(10):2016–23.
377. Grika EP, Ziakas PD, Zintzaras E, Moutsopoulos HM, Vlachoyiannopoulos PG. Morbidity, mortality, and organ damage in patients with antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol.* 2012 Mar;39(3):516–23.
378. Na YS, Jang S, Hong S, Oh YM, Lee S Do, Lee JS. Clinical phenotype of a first unprovoked acute pulmonary embolism associated with antiphospholipid antibody syndrome. *Tuberc Respir Dis (Seoul).* 2019 Jan 1;82(1):53–61.
379. Pengo V, Ruffatti A, Legnani C, Gresele P, Barcellona D, Erba N, et al. Clinical course of high-risk patients diagnosed with antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost.* 2010;8(2):237–42.
380. Bazzan M, Vaccarino a., Stella S, Sciascia S, Montaruli B, Bertero MT, et al. Patients with antiphospholipid syndrome and thrombotic recurrences: A real world observation (the Piedmont cohort study). *Lupus.*

- 2016;25(5):479–85.
381. Jankowski M, Vreys I, Wittevrongel C, Boon D, Vermylen J, Hoylaerts MF, et al. Thrombogenicity of β 2-glycoprotein I-dependent antiphospholipid antibodies in a photochemically induced thrombosis model in the hamster. *Blood*. 2003 Jan 1;101(1):157–62.
382. Fischetti F, Durigutto P, Pellis V, Debeus A, Macor P, Bulla R, et al. Thrombus formation induced by antibodies to β 2-glycoprotein I is complement dependent and requires a priming factor. *Blood*. 2005;106(7):2340–6.
383. Barbhaiya M, Erkan D. Primary thrombosis prophylaxis in antiphospholipid antibody-positive patients: Where do we stand? *Curr Rheumatol Rep*. 2011 Feb;13(1):59–69.
384. Pengo V, Ruffatti A, Legnani C, Testa S, Fierro T, Marongiu F, et al. Incidence of a first thromboembolic event in asymptomatic carriers of high-risk antiphospholipid antibody profile: a multicenter prospective study. *Blood*. 2012;118(17):4714–8.
385. Garcia D, Akl EA, Carr R, Kearon C. Antiphospholipid antibodies and the risk of recurrence after a first episode of venous thromboembolism: A systematic review. *Blood*. 2013;122(5):817–24.
386. Fischetti F, Durigutto P, Pellis V, Debeus A, Macor P, Bulla R, et al. Thrombus formation induced by antibodies to β 2-glycoprotein I is complement dependent and requires a priming factor. *Blood*. 2005 Oct;106(7):2340–6.
387. Palosuo T, Virtamo J, Haukka J, Taylor PR, Aho K, Puurunen M, et al. High antibody levels to prothrombin imply a risk of deep venous thrombosis and pulmonary embolism in middle-aged men--a nested case-control study. *Thromb Haemost*. 1997 Oct;78(4):1178–82.

388. Brey RL, Abbott RD, Curb JD, Sharp DS, Ross GW, Stallworth CL, et al. β 2-glycoprotein 1-dependent anticardiolipin antibodies and risk of ischemic stroke and myocardial infarction: The Honolulu Heart Program. *Stroke*. 2001;32(8):1701–6.
389. Nikolova-Vlahova MK, Nikolov K V., Baleva MP, Savov AS. Antiphospholipid antibodies in patients with upper-extremity deep vein thrombosis. *Cent Eur J Immunol*. 2015;40(3):307–10.
390. Abou-Nassar K, Carrier M, Ramsay T, Rodger MA. The association between antiphospholipid antibodies and placenta mediated complications: A systematic review and meta-analysis. *Thromb Res*. 2011 Jul;128(1):77–85.
391. Macfarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier [23]. Vol. 202, *Nature*. Nature; 1964. p. 498–9.
392. Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science (80-)*. 1964;145(3638):1310–2.
393. Smith SA, Mutch NJ, Baskar D, Rohloff P, Docampo R, Morrissey JH. Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jan 24;103(4):903–8.
394. Van Der Meijden PEJ, Munnix ICA, Auger JM, Govers-Riemslog JWP, Cosemans JMEM, Kuijpers MJE, et al. Dual role of collagen in factor XII-dependent thrombus formation. *Blood*. 2009;114(4):881–90.
395. Yang DT, Flanders MM, Kim H, Rodgers GM. Elevated factor XI activity levels are associated with an increased odds ratio for cerebrovascular events. *Am J Clin Pathol*. 2006;126(3):411–5.
396. Doggen CJM, Rosendaal FR, Meijers JCM. Levels of intrinsic coagulation factors and the risk of myocardial infarction among men: Opposite and synergistic effects of factors XI and XII. *Blood*. 2006 Dec

- 15;108(13):4045–51.
397. Younis HS, Crosby J, Huh JI, Lee HS, Rime S, Monia B, et al. Antisense inhibition of coagulation factor XI prolongs APTT without increased bleeding risk in cynomolgus monkeys. *Blood*. 2012 Mar 8;119(10):2401–8.
398. Rohmann JL, de Haan HG, Algra A, Vossen CY, Rosendaal FR, Siegerink B. Genetic determinants of activity and antigen levels of contact system factors. *J Thromb Haemost*. 2019 Jan 1;17(1):157–68.
399. Salloum-Asfar S, Teruel-Montoya R, Arroyo AB, García-Barberá N, Chaudhry A, Schuetz E, et al. Regulation of coagulation factor XI expression by MicroRNAs in the human liver. *PLoS One*. 2014 Nov 7;9(11):111713.
400. Sennblad B, Basu S, Mazur J, Suchon P, Martinez-Perez A, Vlieg A van H, et al. Genome-wide association study with additional genetic and post-transcriptional analyses reveals novel regulators of plasma factor XI levels. *Hum Mol Genet*. 2017;26(3):637–49.
401. Martin-Fernandez L, Gavidia-Bovadilla G, Corrales I, Brunel H, Ramírez L, López S, et al. Next generation sequencing to dissect the genetic architecture of KNG1 and F11 loci using factor XI levels as an intermediate phenotype of thrombosis. Garcia de Frutos P, editor. *PLoS One*. 2017 Apr 26;12(4):e0176301.
402. Schousboe I. beta 2-Glycoprotein I: a plasma inhibitor of the contact activation of the intrinsic blood coagulation pathway. *Blood*. 1985 Nov;66(5):1086–91.
403. Sugi T, McIntyre JA. Certain autoantibodies to phosphatidylethanolamine (aPE) recognize factor XI and prekallikrein independently or in addition to the kininogens. *J Autoimmun*. 2001;17(3):207–14.

404. Kravtsov D V., Monahan PE, Gailani D. A classification system for cross-reactive material-negative factor XI deficiency. *Blood*. 2005 Jun 15;105(12):4671–3.
405. Esteban J, de la Morena-Barrio ME, Salloum-Asfar S, Padilla J, Miñano A, Roldán V, et al. High incidence of FXI deficiency in a Spanish town caused by 11 different mutations and the first duplication of *F11* : Results from the Yecla study. *Haemophilia*. 2017 Nov 1;23(6):e488–96.
406. Bravo-Perez C, Ródenas T, Esteban J, de la Morena-Barrio ME, Salloum-Asfar S, de la Morena-Barrio B, et al. Gynaecological and obstetrical bleeding in Caucasian women with congenital factor XI deficiency: Results from a twenty-year, retrospective, observational study. *Med Clin (Barc)*. 2019 Nov 29;153(10):373–9. X
407. Pengo V. ISTH guidelines on Lupus Anticoagulant testing. *Thromb Res*. 2012;130(SUPPL.1).
408. Hong SK, Hwang SM, Kim JE, Kim HK. Clinical significance of the mixing test in laboratory diagnoses of lupus anticoagulant: The fate of the mixing test in integrated lupus anticoagulant test systems. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2012 Dec;23(8):739–44.

