



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**

Aspectos Clínico-Biológicos de la Patología  
Molecular del Factor XI

**D. Julio Agustín Esteban Medina**

**2016**





**UNIVERSIDAD  
DE MURCIA**

**DEPARTAMENTO  
DE MEDICINA INTERNA**  
*Facultad de Medicina*

**D. Vicente Vicente Garcia y D. Javier Corral de la Calle**, Profesores Titulares de la Universidad de Murcia en el Departamento de Medicina Interna de la Universidad de Murcia,

CERTIFICAN:

Que la tesis Doctoral titulada **“ASPECTOS CLÍNICO-BIOLÓGICOS DE LA PATOLOGÍA MOLECULAR DEL FACTOR XI”**, realizada por **D. Julio Agustín Esteban Medina** bajo su inmediata dirección y supervisión, se presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 18 de Julio de 2016

Fdo: Dr. Vicente Vicente García

Fdo: Dr. Javier Corral de la Calle





**UNIVERSIDAD  
DE MURCIA**

DEPARTAMENTO  
DE MEDICINA INTERNA  
*Facultad de Medicina*

Los trabajos de investigación llevados a cabo en la presente memoria de Tesis Doctoral han sido financiados por los siguientes proyectos:

- **“Ayudas de la Fundación Séneca a Grupos de Excelencia Investigadora de la Región de Murcia” 19873/GERM/15.**
- **“Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER)”.  
Grupo CB15/00055 (ISCIII & FEDER)**

En Murcia, a 18 de Julio de 2016

Fdo: Julio Esteban Medina



## AGRADECIMIENTOS

Quisiera mostrar mi agradecimiento al profesor Vicente Vicente García, codirector de esta tesis que ha sido el impulsor principal para realizar este estudio, siempre me ha honrado con su amistad, me animó a desarrollar la tesis y puso no solo sus conocimientos, inteligencia, sensatez y sentido crítico para desarrollarlo, sino que implicó a una buena parte de su excelente equipo de investigación del centro de hemodonación de murcia para realizarlo.

Mi más profundo agradecimiento a Dr. Javier Corral de la Calle, pilar fundamental, mi tutor en este trabajo y codirector. Además de aportar gran capacidad de trabajo, sus amplios conocimientos, su apasionamiento y entusiasmo han sido una fuente continua de motivación.

Le debo una mención especial a M<sup>a</sup> Eugenia de la Morena, si la universidad de Murcia lo hubiera permitido habría sido codirectora de esta tesis, de hecho lo ha sido. Persona muy inteligente con habilidad especial para analizar los problemas y sentido del humor. Me ha ayudado mucho en este trabajo.

A todo el resto del equipo del centro de Hemodonación de Murcia pero especialmente a Toñi Miñano que siempre ha estado ahí amablemente con gran generosidad, a Salam Salloum y a José Padilla por su gran ayuda sobre todo en el estudio genómico.

No puedo dejar de agradecer a mi compañero en el Hospital de Yecla Victoriano Beltrán por su ayuda en el seguimiento de los pacientes y a los enfermeros del servicio de Hematología especialmente a Paqui Valdés, la supervisora, y a Fini Andrés que ha sido fundamental y valiosísimo apoyo en el laboratorio de Coagulación.

Al Dr López Borrasca por contagiarme la pasión por la Hematología.





**A Dora por su ánimo, ayuda constante y acompañarme en esta vida.**

**A Julio y Sara por aguantarme.**



## ABREVIATURAS

<b>1/2-FXIa</b>	Subunidad activada de F XI
<b>A1,A2,A3,A4</b>	Domínios Manzana(Apple) 1,2,3,4
<b>ACVA</b>	Accidente cerebrovascular agudo
<b>AICV</b>	Accidente isquémico cerebrovascular
<b>ApoER2</b>	Apolipoproteína E
<b>ARNm</b>	Acido ribonucleico mensajero
<b>ASO</b>	Oligonucleótidos específicos antisentido
<b>CRM</b>	Material cruzado reactivo
<b>DNA</b>	Acido desoxiribonucleico
<b>EP</b>	Estenosis pulmonar
<b>EvW</b>	Enfermedad de von Willebrand
<b>F</b>	Secuencia directa
<b>F.A.</b>	Fibrilación auricular
<b>F11</b>	Gen del Factor F XI
<b>FIX</b>	Factor IX
<b>FIXa<math>\beta</math></b>	Forma activa de F IX
<b>FR</b>	Frecuencia respiratoria
<b>FT</b>	Factor tisular
<b>FV</b>	Factor V
<b>FVIIa</b>	Factor VII activado
<b>FVIII</b>	Factor VIII
<b>FVIII:C</b>	Factor VIII coagulante
<b>FvW</b>	Factor von Willebrand
<b>FXa</b>	Factor X activado
<b>FXI</b>	Factor XI
<b>FXI:C</b>	Actividad coagulante del FXI
<b>FXIa</b>	Factor XI activado
<b>FXII</b>	Factor XII
<b>FXIIa</b>	Factor XII activado
<b>FXIIa<math>\alpha</math>DTT</b>	Tiempo de tromboplastina diluido inhibiendo el FXIIa
<b>Gla</b>	$\gamma$ -carboxiglutámico
<b>GP1b</b>	Glicoproteína 1b
<b>HBPM</b>	Heparina de bajo peso molecular
<b>HGMD</b>	Base de datos de mutaciones de genes humanos
<b>HK</b>	Kininógeno de alto peso molecular
<b>HLA</b>	Antígeno leucocitario humano
<b>HMWK</b>	Kininógeno de alto peso molecular
<b>IAM</b>	Infarto agudo de miocardio
<b>IC</b>	Intervalo de confianza
<b>IgA</b>	Inmunoglobulina A
<b>INR</b>	Ratio normalizada internacional
<b>MLPA</b>	Amplificación de sondas dependiente de ligamiento múltiple
<b>NGS</b>	Secuenciación de nueva generación
<b>OR</b>	Riesgo relativo
<b>pCO<sub>2</sub></b>	Presión parcial de dióxido de carbono
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PFC</b>	Plasma fresco congelado
<b>PK</b>	Precalicerina
<b>pO<sub>2</sub></b>	Presión parcial de oxígeno

<b>PT</b>	Protrombina
<b>PVC</b>	Presión venosa central
<b>PVDF</b>	Fluoruro de polivinilideno
<b>R</b>	Secuencia inversa
<b>rFVIIa</b>	Factor VII activado recombinante
<b>SCASEST</b>	Síndrome coronario agudo sin elevación del ST
<b>SDS</b>	Dodecil sulfatosódico
<b>SO2</b>	Saturación de oxígeno
<b>TAFI</b>	Inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina
<b>TAFIa</b>	Inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina activado
<b>TFPI</b>	Inhibidor de la vía del factor tisular
<b>TGA</b>	Transposición de grandes arterias
<b>TH</b>	Temperatura de hibridación
<b>TRALI</b>	Lesión pulmonar aguda asociada a transfusión
<b>TTPa</b>	Tiempo de tromboplastina parcial activado
<b>TTPa r</b>	Ratio del TTPa
<b>TV</b>	Trombosis venosa
<b>TVP</b>	Trombosis venosa profunda

#### **AMINOÁCIDOS**

<b>Ala</b>	Alanina	A
<b>Arg</b>	Arginina	R
<b>Asn</b>	Asparagina	N
<b>Asp</b>	Acido Aspartico	D
<b>Cys</b>	Cisteina	C
<b>Gln</b>	Glutamina	Q
<b>Glu</b>	Acido Glutámico	E
<b>Gly</b>	Glicina	G
<b>His</b>	Histidina	H
<b>Ile</b>	Isoleucina	I
<b>Leu</b>	Leucina	L
<b>Lys</b>	Lysina	K
<b>Met</b>	Metionina	M
<b>Phe</b>	Fenilalanina	F
<b>Pro</b>	Prolina	P
<b>Ser</b>	Serina	S
<b>Thr</b>	Treonina	T
<b>Trp</b>	Triptofano	W
<b>Tyr</b>	Tirosina	Y
<b>Val</b>	Valina	V

# **INDICE GENERAL**



	Pag.
<a href="#"><u>RESUMEN</u></a>	1
<a href="#"><u>ABSTRACT</u></a>	5
<a href="#"><u>INTRODUCCIÓN.</u></a>	9
Historia evolutiva del FXI.	11
Síntesis y nivel fisiológico de FXI.	12
Estructura del FXI.	13
Activación del FXI por el FXIIa vs activación FXI mediada por trombina.	16
FXIa, 1/2-FXIa, y cofactores.	18
Estructura dimérica del FXI.	19
La activación del FIX, FV, y FVIII por el FXIa.	20
Papel del FXI en la hemostasia.	20
Inhibidores del FXIa.	21
Deficiencia de FXI.	22
Patogénesis molecular de la deficiencia de FXI.	23
Fenotipos CRM- y CRM+.	27
Herencia.	29
Cuadro clínico de la deficiencia de FXI.	30
Terapia para los pacientes con deficiencia congénita de FXI.	32
FXI y trombosis.	37
Modelos animales.	38
Inhibidores del FXIa y trombosis.	41
La inhibición de la activación del FXI mediada por FXIIa y trombosis.	42
Bloqueo de Biosíntesis del FXI y trombosis.	42
<a href="#"><u>HIPÓTESIS.</u></a>	45
<a href="#"><u>OBJETIVO.</u></a>	45
<a href="#"><u>MATERIAL Y MÉTODOS.</u></a>	47
Población de estudio.	49
Extracción y preparación de las muestras de sangre.	49
Estudio de los niveles de Factor XI.	49
Tiempo de tromboplastina parcial activado.	49
Estudio de los niveles FXI: Pruebas coagulométricas y niveles antigénicos.	50

	Pag.
<b>Análisis molecular del gen <i>F11</i>.</b>	<b>50</b>
<b>Amplificación de fragmentos del gen <i>F11</i> para la búsqueda del defecto molecular causante de la deficiencia de FXI.</b>	<b>50</b>
<b>Reacción de secuenciación.</b>	<b>52</b>
<b>Herramientas de análisis.</b>	<b>53</b>
<b>Amplificación y secuenciación de regiones intrónicas para la búsqueda de haplotipos asociados con la mutación p.Cys56Arg.</b>	<b>53</b>
<b>Secuenciación del gen <i>F11</i> mediante NGS.</b>	<b>54</b>
<b>Genotipado de alteraciones genéticas mediante sondas.</b>	<b>57</b>
<b>Análisis de grandes deleciones o inserciones en el gen <i>F11</i> mediante “Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification” (MLPA).</b>	<b>57</b>
<b>Confirmación de la inserción mediante PCR.</b>	<b>58</b>
<b>Análisis estadístico.</b>	<b>58</b>
<b><u>RESULTADOS.</u></b>	<b>61</b>
<b>Población de estudio e identificación de los pacientes con deficiencia de FXI.</b>	<b>63</b>
<b>Caracterización molecular de la deficiencia de FXI en nuestra serie.</b>	<b>67</b>
<b>Estudios familiares.</b>	<b>86</b>
<b>Estudio de haplotipos. Identificación de mutaciones fundadoras.</b>	<b>87</b>
<b>Población general.</b>	<b>91</b>
<b>Pruebas diagnósticas.</b>	<b>91</b>
<b>TTPa como método de cribado para la deficiencia de FXI.</b>	<b>92</b>
<b>Método de cribado de la deficiencia de FXI. Papel de diferentes activadores de la ruta de contacto.</b>	<b>97</b>
<b>Importancia clínica de la deficiencia de FXI.</b>	<b>105</b>
<b>Deficiencia de FXI y riesgo hemorrágico.</b>	<b>105</b>
<b>Riesgo hemorrágico.</b>	<b>106</b>
<b>Tratamiento profiláctico antihemorrágico.</b>	<b>109</b>
<b>Terapia anticoagulante y antiagregante en pacientes con déficit de FXI.</b>	<b>114</b>



	<b>Pag.</b>
Deficiencia de FXI y riesgo trombótico.	115
Trombosis arterial.	115
Trombosis venosa.	117
<b><u>DISCUSIÓN.</u></b>	121
Base molecular de la deficiencia congénita de FXI.	125
Mutaciones recurrentes.	127
Prevalencia de la deficiencia de FXI. Cambio de paradigma y limitaciones diagnósticas.	128
Implicaciones clínicas de la deficiencia de FXI. Escaso peso hemorrágico.	131
Nuevas situaciones clínicas de la deficiencia de FXI. Protección antitrombótica.	133
<b><u>CONCLUSIONES</u></b>	137
<b><u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u></b>	141



# **INDICE DE FIGURAS Y TABLAS**



	Pag.
<b>Figura 1:</b> Dominios Apple del FXI humano	14
<b>Figura 2:</b> Estructura dimérica del zimógeno del FXI con dos perspectivas rotada 90°	15
<b>Figura 3:</b> Representación esquemática de la cascada de coagulación.	21
<b>Figura 4.</b> Gen <i>F11</i> .	24
<b>Figura 5:</b> Distribución de las mutaciones identificadas en el gen <i>F11</i> en pacientes con deficiencia de FXI.	26
<b>Figura 6:</b> Mecanismos propuestos para la deficiencia de FXI CRM-.	28
<b>Tabla 1.</b> Niveles de FXI plasmático, incidencia de trombosis y hemorragia en el Estudio de Büller y col.[185].	43
<b>Tabla 2.</b> Cebadores utilizados para la amplificación del gen <i>F11</i> .	51
<b>Tabla 3.</b> Etapas de la reacción de secuenciación.	52
<b>Tabla 4.</b> Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de diferentes regiones del gen <i>F11</i> que contienen polimorfismos informativos del haplotipo asociado con la mutación p.Cys56Arg.	54
<b>Tabla 5.</b> Cebadores empleados para la generación de los 93 amplicones.	55
<b>Tabla 6.</b> Alteraciones genéticas genotipadas con diferentes sondas.	57
<b>Tabla 7.</b> Características demográficas, genéticas y analíticas del los 44 casos índices incluidos en este estudio.	64
<b>Figura 7:</b> Identificación de la alteración molecular y caracterización de la deficiencia de FXI en P1.	68
<b>Figura 8:</b> Genotipado de la mutación c.166 T>C (p.Cys56Arg) mediante sondas Taqman	69
<b>Tabla 8.</b> Número de portadores de cada una de las alteraciones del F11 identificadas en nuestro estudio. También se indica la variabilidad del TTPar y el FXI:C de cada grupo de sujetos.	70
<b>Figura 9.</b> Identificación de la mutación c.1247 C>T (p.Cys416Tyr).	71
<b>Figura 10.</b> Genotipado de la mutación c.1247 C>T (p.Cys416Tyr) mediante sonda Taqman®.	72
<b>Figura 11.</b> Identificación de las mutaciones c.1608 G>C (p.Lys536Asn) y c.1796 G>A (p.Cys599Tyr) presentes en Paciente índice 30.	74
<b>Figura 12.</b> Identificación de la alteración molecular y caracterización de la deficiencia de FXI en P31.	75
<b>Figura 13.</b> Genotipado de la mutación c.1613 C>T (p.Pro538Leu) mediante sonda Taqman®.	76
<b>Figura 14.</b> Identificación de la mutación c.1693 G>A (p.Glu565Lys) presente en los pacientes P33-P38.	77
<b>Figura 15.</b> Identificación de la mutación c.1277 T>C (p.Ile426Thr) en el paciente P39.	78
<b>Figura 16.</b> Identificación de la mutación c.966 C>T (p.Thr322Ile) en el paciente P40.	79
<b>Figura 17.</b> Identificación de la mutación c.325 G>A (CS081910) en el paciente P41.	80
<b>Figura 18.</b> Identificación de la mutación c.802 C>T (p.Arg268Cys) en el paciente P42.	81
<b>Figura 19.</b> Deficiencia de FXI identificada en el paciente P43.	82
<b>Figura 20.</b> Deficiencia de FXI identificada en el paciente P44 y sus familiares.	83
<b>Figura 21.</b> Detección mediante MLPA de la duplicación de los exones 8 y 9 del F11 en heterocigosis en el paciente P44.	84
<b>Figura 22.</b> PCR extensa generada con los oligonucleótidos F11-4F y F11-5R que flanquean al exon 4 y 5.	85

	Pag.
<b>Figura 23.</b> Representación esquemática de la estructura génica (exones 4-10 ) del F11 en P44.	86
<b>Figura 24.</b> Haplotipo de la mutación p.Cys56Arg identificado por Zivelin y col. y el detectado mediante secuenciación de Sanger en 2 de los pacientes homocigotos de nuestra serie pertenecientes a dos familias no relacionadas.	88
<b>Tabla 9.</b> Características genéticas y procedencia de los casos con deficiencia de FXI en los que se ha secuenciado el gen F11 completo mediante NGS para determinación del haplotipo asociado con cada mutación.	88
<b>Tabla 10.</b> Haplotipo de la mutación p.Cys416Tyr.	89
<b>Tabla 11.</b> Haplotipo de la mutación p.Glu565Lys.	89
<b>Tabla 12.</b> Haplotipo de la mutación p.Cys56Arg.	90
<b>Tabla 13.</b> Haplotipo de la mutación p.Pro538Leu.	90
<b>Figura 25.</b> Poblaciones en las que se estudió la prevalencia de la mutación p.Cys56Arg del F11.	91
<b>Figura 26.</b> Correlación entre los valores de FXI:c y ratio del TTPa en toda nuestra serie	92
<b>Figura 27.</b> Proporción de casos heterocigotos para las mutaciones más recurrentes de nuestro estudio que presentan una ratio del TTPa < 1.3.	93
<b>Figura 28.</b> Genotipado del polimorfismo rs1801020 c. -4 C>T del gen F12 mediante sonda Taqman®.	95
<b>Figura 29.</b> Niveles de FXII (FXII:C) en pacientes con deficiencia heterocigota de FXI dependiendo del polimorfismo rs1801020 c.-4 C>T del F12.	95
<b>Figura 30.</b> TTPa en segundos o ratio en pacientes con deficiencia heterocigota de FXI dependiendo del polimorfismo rs1801020 c.-4 C>T del F12.	96
<b>Figura 31.</b> FXI:C en pacientes con deficiencia heterocigota de FXI dependiendo del polimorfismo rs1801020 c.-4 C>T del F12.	97
<b>Tabla 14.</b> Comparación de los resultados de TTPa y FXI:C obtenidos con SynthASil y SynthAFax en los pacientes con deficiencia de FXI incluidos en nuestro estudio.	98
<b>Figura 32.</b> Valores del TTPa (ratio) y FXI:C (%) en pacientes con deficiencia FXI dependiendo del sistema de activación del FXII empleado.	99
<b>Figura 33.</b> Valores del TTPar en pacientes con deficiencia FXI dependiendo del sistema de activación del FXII empleado y del tipo de deficiencia de FXI.	99
<b>Figura 34.</b> Valores del TTPar y FXI:C en pacientes con deficiencia severa de FXI según el sistema de activación del FXII empleado y del tipo de deficiencia de FXI.	100
<b>Figura 35.</b> Efecto del sistema de activación del FXII en pacientes con deficiencia heterocigota de FXI.	101
<b>Figura 36.</b> Efecto de la mutación sobre el TTPa.	102
<b>Figura 37.</b> Efecto de la mutación sobre el FXI:C.	103
<b>Tabla 15.</b> Comparación de los resultados de TTPa (en segundos y ratio) y de FXI:C con SynthASil (A) y SynthAFax (B), según presenten o no el polimorfismo rs1801020 del F12.	104
<b>Figura 38.</b> Incidencia y tipos de eventos hemorrágicos espontáneos en los pacientes con deficiencia de FXI.	106
<b>Figura 39.</b> Incidencia y tipos de eventos hemorrágicos causados por diferentes factores en los pacientes con deficiencia de FXI.	108
<b>Tabla 16.</b> Características de los pacientes con deficiencia de FXI que han presentado intervenciones quirúrgicas.	108

	Pag.
<b>Tabla 17.</b> Características de los pacientes con deficiencia de FXI con exodoncias.	109
<b>Figura 40.</b> Incidencia de eventos hemorrágicos en pacientes con deficiencia de FXI en función del uso profiláctico de plasma fresco congelado (PFC).	110
<b>Figura 41.</b> Documentación radiológica de la insuficiencia respiratoria causada por TRALI en el caso nº1 con deficiencia de FXI.	112
<b>Figura 42.</b> Documentación radiológica de la insuficiencia respiratoria causada por TRALI en el caso nº2 con deficiencia de FXI.	113
<b>Tabla 18.</b> Características de los pacientes con deficiencia de FXI que han sido Tratados con terapia anticoagulante oral (Sintrom).	115
<b>Tabla 19.</b> Características clínicas y demográficas de los sujetos con deficiencia de FXI que han sufrido un infarto agudo de miocardio o síndrome coronario agudo.	116
<b>Tabla 20.</b> Característica clínicas y demográficas de los sujetos con deficiencia de FXI que han sufrido un accidente isquémico cerebrovascular.	117
<b>Figura 43.</b> Características del paciente con deficiencia de FXI que sufrió una trombosis venosa profunda.	119
<b>Tabla 21.</b> Característica clínicas y demográficas de los sujetos con deficiencia de FXI portadores de un polimorfismo protrombótico.	120
<b>Figura 44.</b> Representación esquemática de la cascada de la coagulación con la posición del FXI.	123





# RESUMEN



## **Introducción**

Recientes evidencias sustentan la relevancia hemostática del FXI y sugieren nuevos papeles para este factor procoagulante. Su deficiencia, considerada un desorden raro, podría estar subestimada por la escasa clínica hemorrágica y por las limitaciones de los métodos empleados en su diagnóstico.

## **Objetivo**

El objetivo de este estudio fue caracterizar la deficiencia de FXI en un área de 60.000 habitantes de la Región de Murcia, valorando su incidencia, estudiando la base molecular de la deficiencia en los casos identificados, evaluando los sistemas diagnósticos y analizando sus implicaciones clínicas.

## **Metodología**

En 20 años (1994-2014) se realizaron 324.764 tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa) en 51.366 pacientes, seleccionando 1.700 que presentaron una ratio prolongada ( $> 1,3$ ). Estudios de la vía intrínseca en estos casos permitió identificar 44 casos índice no relacionados con deficiencia de FXI (FXI:C  $< 70\%$ ). En 41 casos se realizó un estudio familiar que permitió reclutar un total de 214 casos con deficiencia de FXI.

El FXI plasmático se estudió mediante Western-blot. El análisis genético incluyó secuenciación (Sanger y NGS), MLPA y genotipado con sondas taqman.

## **Resultados**

Identificamos 7 casos con deficiencia de FXI en homocigosis, 3 en heterocigosis compuesta y 204 en heterocigosis. Describimos 4 mutaciones recurrentes: p.Cys56Arg (descrita en población vasco-francesa), p.Cys416Tyr, p.Glu565Lys y p.Pro538Leu identificadas en 23, 7, 6 y 2 casos índices respectivamente. Además, otras 8 mutaciones diferentes se detectaron en 7 casos índices, 4 de ellas no descritas previamente, incluyendo la primera gran inserción descrita a nivel mundial. Dos mutaciones, una de ellas nueva, provocaban deficiencia CRM+ (proteína variante en plasma pero sin actividad funcional).

La ratio del TTPa no estaba prolongada en 54/214 casos con deficiencia de FXI (25.2%).

La incidencia de sangrado espontáneo fue escasa (13.7%) y el sangrado muy moderado (epistaxis). Únicamente el 5.8% de las 207 intervenciones quirúrgicas y el 4.2% de los 122 partos presentaron complicaciones hemorrágicas, y solo 2 pacientes precisaron transfusiones. La mayor incidencia de hemorragias se produjo en intervenciones que

afectaban tejidos con alta actividad fibrinolítica. La tasa de eventos hemorrágicos fue similar independientemente de la administración profiláctica de plasma fresco congelado (PFC) (realizada en 58 ocasiones). Sin embargo, el PFC causó lesión pulmonar aguda asociada transfusión (TRALI) en dos pacientes. Destacamos la ausencia de complicaciones hemorrágicas en 9 pacientes con deficiencia de FXI bajo tratamiento anticoagulante (mayoritariamente por fibrilación auricular) durante un total de 382 meses.

Seis casos presentaron infarto agudo de miocardio y 8 ictus isquémico. Sin embargo, solo 2 casos, con motivos locales predisponentes, sufrieron trombosis venosa, a pesar de que 16 pacientes también eran portadores del FV Leiden o Protrombina G20210A.

### **Conclusiones**

Identificamos una alta prevalencia de deficiencia de FXI con notable variabilidad genética en un área de la Región de Murcia, encontrando 12 mutaciones diferentes, de las cuales 4 no estaban descritas. Estos resultados junto con la elevada incidencia de falsos negativos del TTPa y la escasa clínica hemorrágica de portadores, sugieren que la incidencia de este desorden en población general está subestimada.

La deficiencia de FXI no incrementa notablemente el riesgo hemorrágico ni siquiera si se combina con tratamiento anticoagulante oral. La administración de PFC profiláctico no supone beneficio pero puede tener importantes efectos adversos.

La deficiencia de FXI, al menos en heterocigosis, no parece proteger de la trombosis arterial, pero podría proteger del desarrollo de trombosis venosa. Estos resultados, compatibles con los modelos animales y ensayos clínicos de silenciamiento de FXI, junto a la potencial alta incidencia de esta deficiencia, apoyan incluir el estudio de este desorden en las pruebas de trombofilia para definir el riesgo trombótico de cada individuo.

### **Términos TESAURO**

320504 Hematología; 320102 Genética Clínica; 320718 Trombosis

### **Clasificación UNESCO**

3205.04 Medicina Interna. Hematología; 3207.08 Patología. Hematología; 3201.02 Ciencias Clínicas. Genética Clínica. 3207.04 Patología. Patología Cardiovascular; 3207.18 Patología. Trombosis

# **ABSTRACT**



## **Introduction**

Recent studies show increasing evidences suggesting a relevant hemostatic function for factor XI (FXI) and prove new roles for this procoagulant factor. FXI deficiency, considered as a rare disorder, might be underestimated due to the low bleeding risk of carriers and the limitations of current diagnostic methods.

## **Objective**

The main objective of this study was to characterize the FXI deficiency in a Region of 60.000 inhabitants from Murcia (South East of Spain). We aim to determine the incidence, to identify the molecular base, as well as to know the clinical consequences of FXI deficiency. Moreover, we want to evaluate the feasibility of current diagnostic methods.

## **Methods**

During 20 years, (1994-2014) 324.764 activated partial thromboplastin time tests (aPTT) were done in 51.366 patients. 1.700 cases with a prolonged ratio ( $> 1,3$ ) were selected. Studies of the intrinsic pathway on these cases allowed the identification of 44 unrelated index cases with FXI deficiency (FXI:C $< 70\%$ ). In 41 cases, a further family study allowed to recruit finally 214 cases with FXI deficiency.

Plasma FXI was evaluated by Western-blot. Genetic analysis included sequencing (by Sanger's method and by Next Generation Sequencing), MLPA and genotyping using Taqman probes.

## **Results**

We identified 7 cases with FXI deficiency in homozygosis; 3 in compound heterozygosis and 204 in heterozygosis. We described 4 recurrent mutations: p.Cys56Arg (described in French Basques), p.Cys416Tyr, p.Glu565Lys and p.Pro538Leu identified in 23, 7, 6 and 2 index cases, respectively. Other 8 additional and different mutations were detected in 7 index cases, 4 of them not reported previously, including the first gross insertion described worldwide. Two mutations, one new, caused CRM+ deficiency, with variant protein in plasma that has no functional activity.

The aPTT ratio was not prolonged in 54 out of 214 cases with FXI deficiency (25.2%).

The incidence of spontaneous bleeding was low (13.7%), and mild (epistaxis). Only 5.8% of the 207 surgery interventions, and 4.2% of the 122 deliveries showed bleeding

complications, although only 2 required transfusions. Most bleedings were observed when the surgery involved tissues with high fibrinolytic activity. The rate of bleeding events was similar independently of the prophylactic use of fresh frozen plasma (FFP) (used 58 times). However, we point out that FFP caused transfusion associated lung injury (TRALI) in two patients. We also remark the absence of bleeding complications in 9 patients with FXI deficiency who were under oral anticoagulant treatment (mainly by atrial fibrillation) during a period of 382 months.

Six cases developed acute myocardial infarction, and 8 ischemic cerebrovascular events. In contrast, only 2 cases, with local risk factors, suffered from venous thrombosis, even though 16 patients with FXI deficiency also carried other prothrombotic polymorphisms (FV Leiden or prothrombin G20210A)

### **Conclusions**

We identify a high prevalence of FXI deficiency in a population of Murcia, with remarkable genetic variability, finding 12 different mutations, 4 not previously reported in available mutation databases. These results, together with the high incidence of false negatives rendered by aPTT and the low risk of bleeding for carriers strongly support that FXI deficiency may be underestimated in the general population. FXI deficiency does not significantly increase the risk of bleeding, even in combination with oral anticoagulant treatment. The prophylactic administration of FFP in subjects with FXI deficiency does not significant reduce the bleeding complications during surgery, but might increase the risk of severe side effects.

FXI deficiency, at least in heterozygosis, does not seem to protect from arterial thrombosis, but could protect against venous thrombosis, even in subjects carrying other prothrombotic genetic risk factors. These results, which are compatible with recent data obtained with animal models and clinical trials, support to include tests for diagnosis of FXI deficiency in thrombophilic patients in order to define the individual risk of thrombosis, aiming to get a personalized medicine.



# **INTRODUCCIÓN**



## **INTRODUCCIÓN**

El Factor XI (FXI) de la coagulación sanguínea fue descubierto por Rosenthal en 1953 cuando describió una coagulopatía hereditaria en personas de ambos sexos y con la ausencia de hemorragias articulares y musculares llamando a este cuadro hemofilia C. Se ha indicado que estas personas pueden tener o no una leve tendencia hemorrágica habitualmente relacionada con la cirugía o con hemorragias en mucosas. Esta tendencia hemorrágica varía entre unas personas y otras con niveles similares del factor y no hay relación directa entre el nivel del déficit y la tendencia hemorrágica.

Clásicamente el FXI era uno de los factores de la fase de contacto por lo que parecía que no era necesario para la hemostasia normal *in vivo*. Pero estudios relativamente recientes han mostrado su papel en la denominada vía común, su activación por la trombina y su papel en la fase de amplificación de la cascada de la coagulación, lo que ha contribuido a la revisión del modelo de coagulación de la sangre.

La trascendencia del FXI en hemostasia ha dado un vuelco significativo en los últimos años, y especialmente este mismo año, con los posibles beneficios antitrombóticos que la reducción o control del FXI plasmático pudieran tener.

En este proyecto se abordan diferentes aspectos que pensamos contribuirán a conocer mejor a este viejo actor de la hemostasia y abrir nuevas perspectivas no solo para el FXI sino para todo el sistema hemostático.

### **Historia evolutiva del FXI**

Los análisis genéticos han demostrado que, al igual que otros factores de contacto (factor XII [FXII], Precalicroína (PK), y Kininógeno de alto peso molecular [HMWK]), el FXI es una proteína relativamente "moderna" y está ausente en los vertebrados inframamíferos, como las aves (el pollo es el mejor ejemplo por haberse estudiado ampliamente). Un precursor común de FXI y PK apareció por primera vez en los anfibios; aunque en los genomas de zarigüeya y todos los mamíferos placentarios ya se identifican genes distintos para FXI y PK [3]. Existe una alta homología entre los sistemas coagulativos de humanos y del ratón, y por eso los ratones se han utilizado

extensamente como modelos animales para ayudar a la comprensión de la hemostasia y trombosis en los seres humanos [3,4].

### **Síntesis y nivel fisiológico de FXI**

El FXI se sintetiza principalmente en los hepatocitos. Un estudio reciente también mostró expresión FXI en los túbulos renales y células de los islotes del páncreas [5], ya que estas células también expresan HNF-4A (factor de transcripción nuclear de hepatocitos-4 $\alpha$ ), necesario para la transcripción del gen *F11* [5,6]. La presencia de FXI en plaquetas es controvertida [7] ya que las plaquetas presentan actividad FXI procoagulante [8-13]. También se ha inmunoprecipitado con anticuerpos policlonales anti-FXI una proteína con peso molecular compatible con el del FXI (35-55KDa) [12], aunque no se ha establecido la relación entre esta proteína y la actividad coagulante del FXI en plaquetas. Finalmente, a nivel molecular, se ha clonado un ARN mensajero (ARNm) de *F11* procedente de plaquetas puras, que además tiene la particularidad de ser resultado de un procesamiento alternativo de intrones que provoca la ausencia del exón 5 [14]. Sin embargo, análisis posteriores sugieren que las plaquetas contienen ARNm del *F11* con similar procesamiento al hepático [15,16].

El FXI plasmático es una glicoproteína esencial para la hemostasia. Circula en forma de zimógeno de la serín proteasa que es la forma activada (FXIa). El nivel plasmático de FXI es 3 a 7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (media 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  [30 nM]). La actividad coagulante FXI (FXI: C) en plasma de población sana es muy heterogénea ya que oscila entre 70 a 150 U/dL [17]. En recién nacidos, los niveles plasmáticos de FXI son menores, posiblemente por la inmadurez hepática, aunque no se descartan otros mecanismos que se han identificado en variaciones similares en otras proteínas [18]. Los valores plasmáticos de FXI aumentan gradualmente hasta alcanzar el nivel de adultos, aproximadamente a los 6 meses de edad [19]. Después de la infancia, el nivel de FXI se mantiene estable y sin diferencias significativas de género y el embarazo no le afecta. Algunos estudios han demostrado que los glucocorticoides pueden elevar ligeramente el nivel de FXI [20].

Prácticamente todo el FXI circula en complejos con el HK [21]. En general se cree que el HK facilita la unión del FXI a superficies cargadas negativamente, estabiliza el FXI en

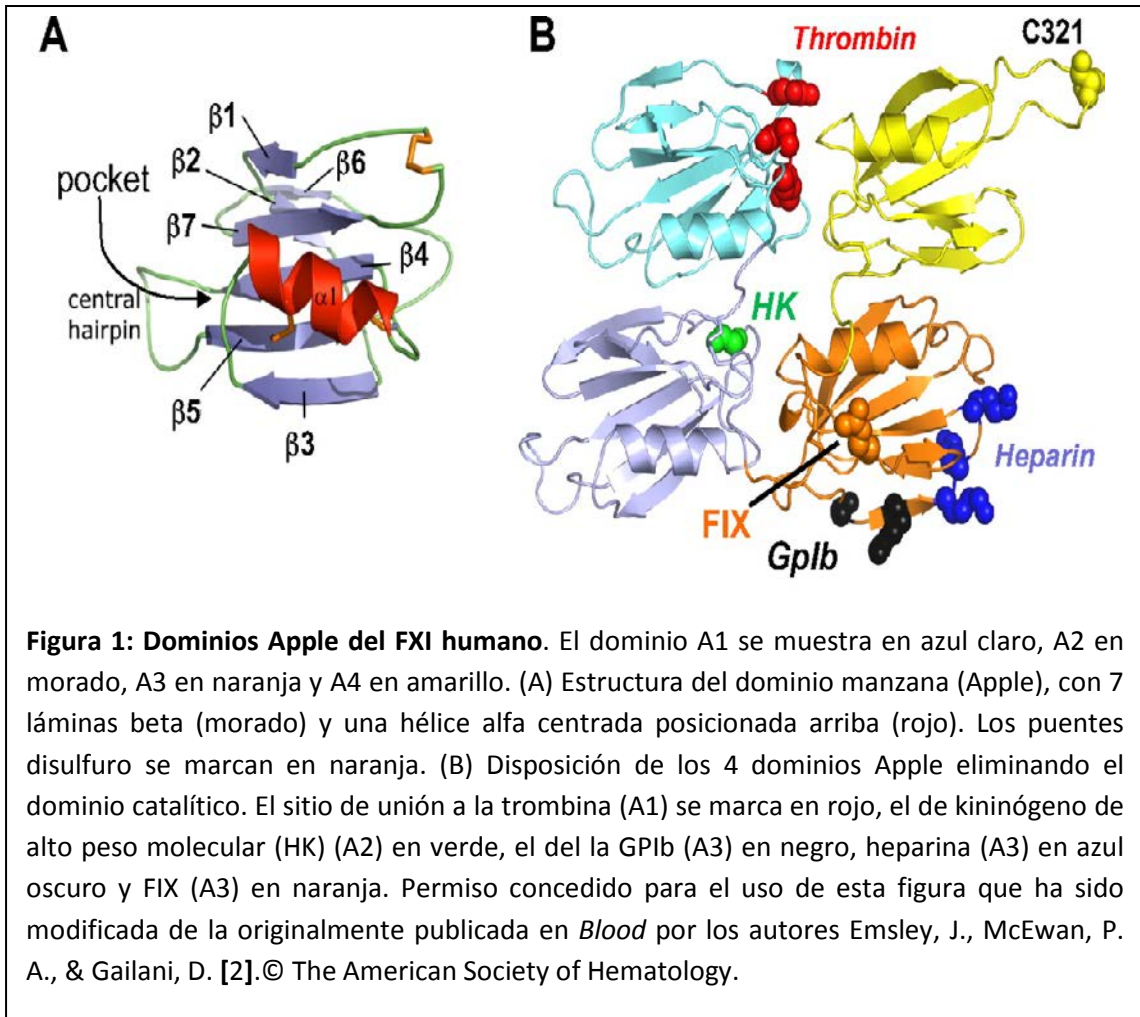
plasma, y es necesario para la activación proteolítica de FXI a FXIa [21-23]. En presencia de iones de zinc, HK es indispensable para la unión óptima del FXI a la glicoproteína Ib (GPIb) en las plaquetas activadas [24-26]. La vida media del FXI en plasma es de aproximadamente 52 horas.

El FXI tiene, como veremos después, dominios de unión a la GPIb $\alpha$  plaquetaria y también se une al receptor 2 de la apolipoproteína E (ApoER2) localizado en las plaquetas [27], lo que puede ser relevante tanto en el proceso de activación por polifosfatos como veremos después, así como en la propia reactividad plaquetaria [28].

### **Estructura del FXI**

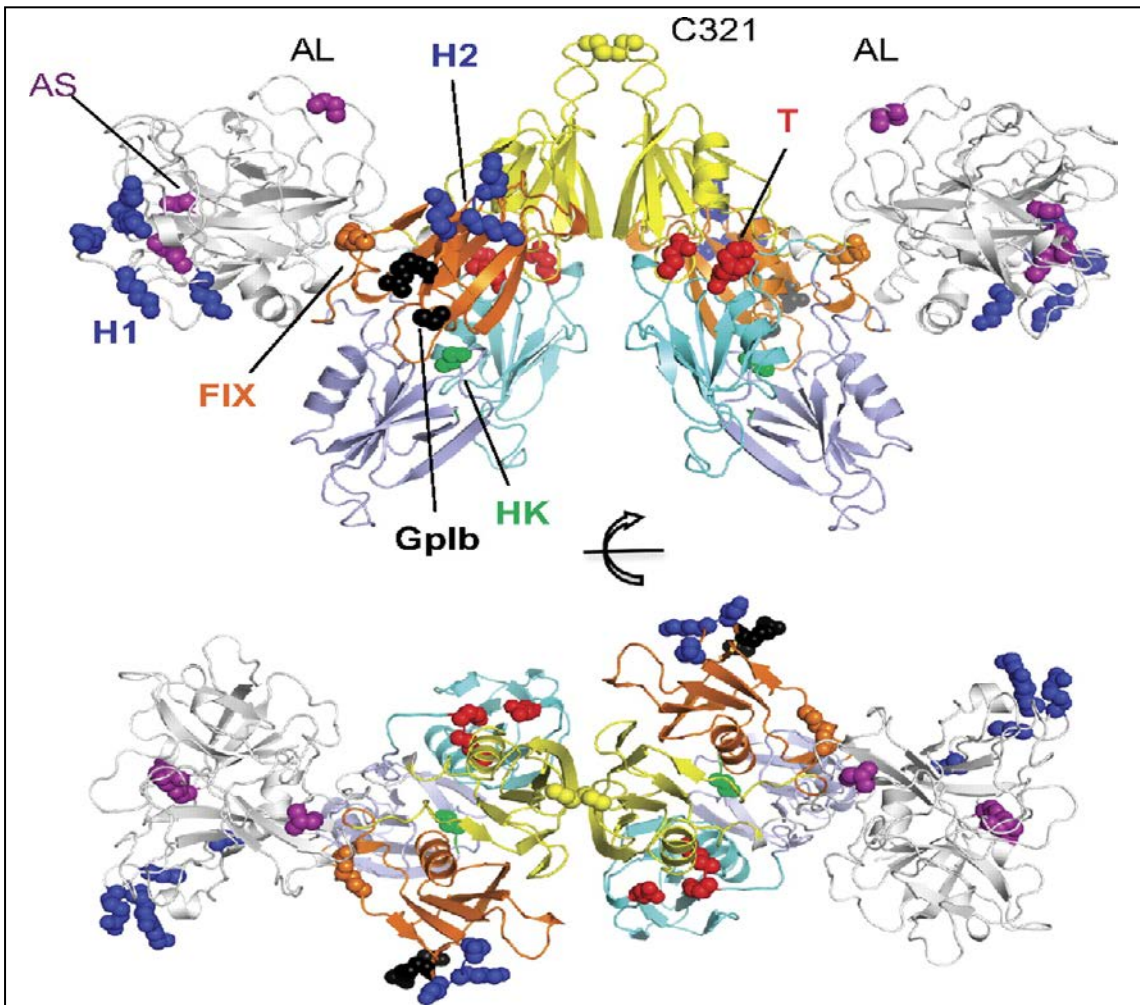
El monómero de FXI consta de 607 aminoácidos. La estructura secundaria de cada monómero contiene cuatro repeticiones de 90 o 91 amino-ácidos llamados dominios manzana (Apple) (A1 a A4) y un dominio catalítico C-terminal [29] (Figura 1). La estructura secundaria muestra una homología importante con la PK, especialmente en la cadena ligera y compiten con ella para unirse al HK, pero lo hacen en sustratos diferentes indicando que las pequeñas diferencias en la secuencia son importantes para la especificidad de enlace al sustrato [30].

FXI tiene 5 sitios potenciales de N-glicosilación: 3 en la cadena pesada (en las posiciones 72, 108 y 335) y 2 en la cadena ligera (en las posiciones 432 y 473) [25,29] (Figura 1).



Los 4 dominios manzana constituyen regiones por las que el FXI interacciona con otras proteínas. Así, el dominio A1 parece estar implicado en las interacciones con el HK [31], protrombina y trombina [32]. El dominio A3 está implicado en la unión a plaquetas, particularmente a la GPIb [25] y también parece que une heparina [33,34]. El dominio A4 interviene en la interacción con el FXIIa [35]. Los dominios A3 y A2 se han identificado como sitios de unión al FIX [36]. El dominio A4 también es el dominio clave para la dimerización.

El FXI dimeriza intracelularmente y es secretado como un homodímero de 160 kDa (Figura 2). El dímero FXI está unido por un puente disulfuro de la Cisteína 321 de cada sub-unidad. Este residuo está situado en un bucle del dominio A4. Además, las interacciones hidrofóbicas de Leu 284, Ile290, Tyr 329 de la interfaz de dominio A4 y los puentes de sal entre Lys 331 y Glu 287 también son necesarias para la dimerización [37-39] (Figura 2).



**Figura 2: Estructura dimérica del zimógeno del FXI con dos perspectivas rotada 90°.** El dominio catalítico está en blanco. También se muestran los sitios de unión a trombina (T), rojo; kininógeno (HK), verde; GPIb, negro; heparina (H1 y H2), azul; y FIX, naranja. Las posiciones del residuo Ile370, punto de ruptura del loop de activación(AL: Arg360-Ile370) y de los residuos Ser557, Asp462, e His413 del sitio activo (AS) se muestran en púrpura. La cisteína 321 (C321), implicada en el puente disulfuro intermolecular se marca en amarillo. Permiso concedido para el uso de esta figura que ha sido modificada de la originalmente publicada en *Blood* por los autores Emsley, J., McEwan, P. A., & Gailani, D. [2].© The American Society of Hematology.

El FXI circula en plasma como un zimógeno, y tras una activación proteolítica mediada por diferentes proteasas (Figura 2 y más desarrollado posteriormente), se activa. La ruptura proteolítica que activa al FXI se realiza al romper el enlace peptídico que une a la arginina 369 e isoleucina 370, generando dos cadenas, la ligera, donde está el dominio

catalítico y la pesada, que contiene los sitios de unión para el HK y el calcio. La tríada catalítica de FXI está compuesto de His 413, Asp 462, y Ser 557, que forman un dominio catalítico similar a la tripsina [37].

### **Activación del FXI por el FXIIa vs activación FXI mediada por trombina**

Varios estudios han demostrado que los activadores plasmáticos de FXI incluyen FXIIa [40], trombina [30,41,42], meizotrombina (un producto intermedio de activación de la protrombina) [43] y FXIa (autoactivación) [42,44]. FXIIa y trombina son los principales activadores de FXI y los que juegan un papel fisiopatológico.

Está bien establecido que la coagulación se inicia por superficies cargadas negativamente *in vitro* con la formación de FXIIa y se completa con la activación del FXI por el FXIIa.

Como la deficiencia de FXI se asocia con un moderado riesgo hemorrágico, como veremos después, y la deficiencia de FXII no tiene ningún riesgo de sangrado asociado, desde hace años se sugirió que el FXI se podría activar *in vivo* también a través de un mecanismo alternativo, Naito y col.[42] y Gailani y col.[41] fueron los primeros investigadores que demostraron la activación del FXI por la trombina. Sobre la base de sus hallazgos, se propuso que la activación del FXI por la trombina sirve como un mecanismo de retroalimentación para amplificar la vía común de la coagulación. Recientemente, Choi y col.informaron del efecto potente de aceleración del polifosfato plaquetario en la activación del FXI por  $\alpha$ -trombina,  $\beta$ -trombina, y el FXIa [45]. Además, otros estudios mostraron que el FXI contribuye a la fase de amplificación de la cascada de la coagulación cuando se inicia por baja concentración de factor tisular (FT) [44,46-48].

Para investigar el papel de la coagulación iniciada por FXI en plasma, se ha desarrollado un ensayo de tiempo de tromboplastina diluido inhibiendo el FXIIa (FXIIaIDTT) [47] y con ello, han demostrado el papel de la concentración del FXI en este proceso. La hirudina bloquea la activación del FXI a través de la inhibición de la activación de retroalimentación por la trombina y disminuye notablemente la generación de FXa. Cuanto más precoz sea la adición de hirudina, menos FXa se genera. Estos datos



mostraron que la trombina generada en la fase temprana a través de la vía del FT (con baja concentración de FT) tiene un papel central en la amplificación de retroalimentación mediada por FXI. Sin embargo, Pedicord y col.[49] sugieren que la activación del FXI por retroalimentación de trombina no se produce en el plasma y los resultados anteriores podrían ser consecuencia de un artefacto que llevase a la generación de FXIa en los pasos de extracción y preparación de muestras de plasma.

Están surgiendo nuevos datos que ayudan a aclarar esta situación. Kravtsov y col.[30] elegantemente ilustran distintos requisitos en la estructura del FXI para la activación mediada por trombina y la activación mediada por FXIIa. La expresión de FXI recombinante de variantes mutadas de los residuos Lys 83 y Gln 84 (reemplazados por alanina mediante mutagénesis dirigida) demostró que estos residuos son claves en la unión a trombina, y por tanto estas variantes solo se activan efectivamente por FXIIa. Además, un anticuerpo monoclonal 14E11, que se une al dominio A2 del FXI interfiere con la activación por FXIIa, reduce sustancialmente la generación de trombina inducida por el FXIIa pero no afectó la generación de trombina activada por TF o trombina [30]. Además de la  $\alpha$ -trombina y meizotrombina, también se ha demostrado que  $\beta$ - y  $\gamma$ -trombina son capaces de activar al FXI [50].

Crecientes evidencias sugieren diferentes significados biológicos para la activación de FXI mediada por FXIIa y la activación mediada por FT / trombina. La activación del FXI mediada por el FXIIa no contribuye a la hemostasia fisiológica pero es importante en la formación de trombos patológicos *in vivo* [51-56]. Debido a la disparidad de las dos vías de activación del FXI, es razonable postular que una determinación precisa del FXI: C debería incluir un tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa) para reflejar la coagulación iniciada por la FXIIa, y un ensayo separado para evaluar el iniciado con poco FT y la coagulación ampliada por trombina, tal como un ensayo basado en FXIIa:DTT o ensayos similares.

El FXIa se une al factor IX (FIX), pero no está clara la importancia de esta interacción *in vivo* puesto que no se ha podido demostrar ningún defecto en la activación del FIX en personas con deficiencia de FXI [57].

Estos y otros descubrimientos han dado como resultado un modelo revisado de la coagulación que se muestra en la Figura 3. La coagulación *in vivo* se desencadenaría normalmente a través del FT y la vía extrínseca. Pequeñas cantidades de trombina así

generadas activan las plaquetas y al FXI en la superficie de las plaquetas a través del receptor GPIb. La activación retrógrada de la vía intrínseca modularía la activación de la coagulación sin involucrar al resto del sistema de contacto y el factor VIIa-factor tisular es inactivado por el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) [58].

### **FXIa, 1/2-FXIa, y cofactores**

Todos los activadores (FXIIa, trombina, meizotrombina, y FXIa) activan el FXI a FXIa por la escisión en Arg369-Ile370 [56,59,60]. Estudios recientes han demostrado que durante la activación FXI por FXIIa o trombina, se produce un producto intermedio entre FXI y FXIa. Un análisis más detallado ha determinado que este producto es una forma de FXI con sólo 1 subunidad activada. Este producto intermedio, cuya existencia se ha mostrado en plasma, se denomina 1/2-FXIa [61]. FXIa es definido entonces como la forma con 2 subunidades activadas. El hecho de que FXIa es inhibido por la antitrombina en presencia de heparina en una relación molar 1:2 también indica que cada subunidad de FXIa tiene actividad catalítica independiente. Debido a que es probable que una cantidad muy pequeña de FXI sea activado en plasma durante la coagulación, el 1/2-FXIa puede ser la forma principal de FXI activado fisiológicamente [59].

Se ha visto que las plaquetas mejoran la activación FXI por la trombina independientemente del FXII [62,63]. Los primeros estudios sugerían que este mecanismo de activación era dependiente de la GPIb [64], sin embargo estudios posteriores no pudieron confirmar el efecto cofactor de esta glicoproteína plaquetaria [65]. Recientemente, Choi y col.han demostrado un potente efectos de aceleración en la activación del FXI por  $\alpha$ -trombina,  $\beta$ -trombina, y el FXIa si existe polifosfato plaquetario [45]. También se ha descrito que el receptor de 2' apolipoproteína E plaquetaria puede unirse al FXI, pero su significado fisiológico no está claro [2,66]. El hallazgo del factor V (FV) como un cofactor para la activación del FXI por la trombina tiene varias evidencias experimentales: 1) El FV activado se puede unir al FXI y mejorar la activación del FXI por la trombina y 2) la depleción del FV o la adición de la proteína C activada amortigua la activación FXI por la trombina en el plasma [67]. También

existen reguladores negativos de la activación del FXI. La  $\beta$ 2-glicoproteína 1 (apolipoproteína H) puede inhibir la activación del FXI inducida por trombina y FXIIa [68].

### **Estructura dimérica del FXI**

El FXI es la única proteína de la coagulación con estructura homodimérica. Como veremos posteriormente, mutaciones que causan el cambio de un solo aminoácido (como Phe283Leu), son capaces de provocar deficiencia de FXI porque afectan al proceso de dimerización y provocan la acumulación intracelular de monómeros de FXI [69]. Estas evidencias sugieren que la estructura homodimérica es indispensable para el correcto procesamiento intracelular de la proteína [38,56].

A diferencia de los factores de la coagulación dependientes de la vitamina K el FXI carece de un dominio Gla ( $\gamma$ -carboxiglutámico). Se ha planteado que la estructura homodimérica, con la presencia de diferentes motivos de unión a distintas proteínas, potencialmente podría servir como un mecanismo alternativo que permite la inmovilización del FXI en la membrana, en la proximidad de un sitio de la lesión, y así facilitar su activación [59]. Estudios recientes han demostrado que el monómero FXI se activa con menor eficacia por FXIIa, trombina, y FXIa que el homodímero [38]. De esta forma, se ha propuesto un mecanismo, por el cual el FXIIa o trombina se unen a una subunidad FXI mientras se activa la otra subunidad [37,38,59].

También se ha demostrado que la conformación dimérica del FXIa es indispensable para la activación de FIX en la superficie plaqueta [70]. El dominio A3 de FXI puede unirse tanto al FIX y a la GPIb, pero la forma activa, el FXIa, no se puede unir a la GPIb [36]. Una posible explicación es que 1/2-FXIa se une a la GPIb a través del dominio A3 de la subunidad zimógeno inactivo, y la subunidad activada queda libre para unirse FIX. En otras palabras, la estructura dimérica del FXI facilitaría la actividad catalítica de FXIa sobre el FIX [59].

Todos estos datos subrayan el papel esencial de la estructura homodimérica de FXI en sus funciones, incluyendo el procesamiento intracelular, la activación del FXI, y la activación posterior del FIX.

### **La activación del FIX, FV, y FVIII por el FXIa.**

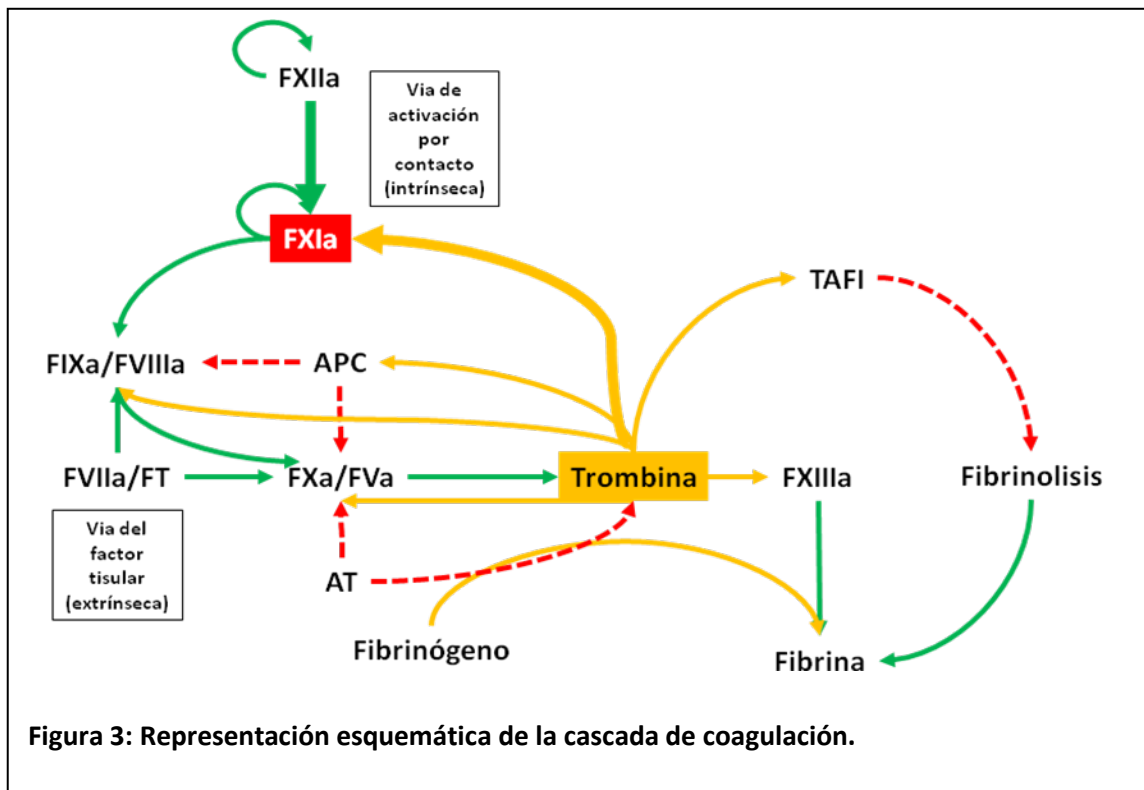
FIX es el sustrato natural de FXIa, aunque el zimógeno es incapaz de unirse al FIX. De hecho, la activación del FXI induce un cambio conformacional en esta molécula, de forma que se expone un sitio de unión al FIX [71]. Este exocite incluye los residuos 183 hasta 191 y se localiza en el dominio A3 [36]. La activación completa del FIX requiere además de las secuencias Ser195-Ile197 y Phe260-Ser265. La actividad proteolítica del FXIa rompe los enlaces entre Arg145-Ala146 y Arg180-Val181, liberando un péptido de activación (Ala146-Arg180) y generando la forma activa de FIX denominada FIXa $\beta$ . La activación del FIX por el FXIa acumula mínimamente productos intermedios, posiblemente porque los dos dominios catalíticos del homodímero actúan por separado y de forma prácticamente simultánea [60,71,72]. La activación del FIX por la acción proteolítica del FVIIa/FT es ligeramente diferente. Este complejo proteolítico rompe al FIX inicialmente en el enlace Arg145-Ala146 generando el intermedio FIXa $\alpha$ , sobre el que una segunda escisión en el enlace Arg180-Val181, forma finalmente el FIXa $\beta$  [60].

Un estudio reciente demuestra que el FXIa también puede activar al FV y al FVIII [73].

### **Papel del FXI en la hemostasia**

El complejo FVIIa/FT que se forma en las zonas de daño vascular provoca una limitada formación de FXa y de trombina en esta fase de iniciación, ya que cuando se produce el FXa, el TFPI se unen rápidamente al complejo FVIIa/FT/FXa e inhibe la actividad procoagulante de este complejo para terminar la vía extrínseca. Naturalmente, otro sistema debe entrar en acción para mantener la generación de trombina que permita conseguir una coagulación efectiva. La vía intrínseca truncada (FXI-FIX/FVIII-FX) iniciada a través de la activación de FXI mediada por trombina puede desempeñar este papel. En la fase de amplificación, la trombina activa las plaquetas, FV, FVIII, y FXI. El FXIa, a través de la activación del FIX y probablemente también por la activación del FV y FVIII que, como recientemente se ha mostrado [73], amplifica de forma significativa la generación de trombina. En la coagulación iniciada por pequeñas cantidades de FT, el FXI ha demostrado ser fundamental en la propagación del coágulo [43,44]. Parece que la activación del FXI por la trombina retroalimenta la generación de trombina

incluso después de la formación del coágulo. La trombina extra generada en la fase de amplificación activa el inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina (TAFI), que protege el coágulo de una fibrinólisis prematura mediada por plasmina [43,44,74]. El mecanismo subyacente es que el TAFI activado (TAFIa) escinde los residuos de lisina carboxilo-terminal de la fibrina parcialmente degradada y suprime los sitios de unión de plasminógeno y plasmina. Por lo tanto, FXI tiene la doble función, procoagulante y antifibrinolítica en la hemostasia (Figura 3).



A diferencia del FXIIa, el FXIa no tiene una función conocida en la cascada del complemento o en la vía de la bradikinina.

### Inhibidores del FXIa

Los reguladores negativos de FXIa pertenecen mayoritariamente a la superfamilia de las serpinas (inhibidores de serín proteasas), e incluyen a la antitrombina, el inhibidor de C1, la proteasa nexina-1, y la proteína inhibidora dependiente de la proteasa Z (ZPI) [2,75,76]. La heparina puede mejorar la inhibición del FXIa mediada por todas estas serpinas actuando como puente facilitando la formación de un complejo terciario pues

se une al dominio A3 del FXI y al dominio de unión a heparina de la serpina [77]. La proteasa nexina-2 liberada de las plaquetas activadas también inhibe al FXIa a través de la unión al dominio catalítico del FXIa por su dominio tipo Kunitz [78,79]. Además, la aprotinina, leupeptina, y p-aminobenzamidina han demostrado efectos inhibitorios sobre FXIa.

### **Deficiencia de FXI**

La deficiencia de FXI se distingue clínicamente de las Hemofilias A y B por la ausencia de hemorragias articulares y musculares espontáneas y por su incidencias en personas de cualquier sexo. Fue descrita por primera vez por Rosenthal como hemofilia C o deficiencia del antecedente trombotástico del plasma en 1953 en una familia judía. Dos hermanas sufrieron hemorragias después de extracciones dentales y amigdalectomía y su tío materno sufrió hemorragias después de una extracción dental, aunque había tenido una circuncisión normal [80,81]. Otras cuatro personas afectadas fueron identificadas entre trece miembros de cuatro generaciones de la familia con una variación considerable entre el grado de anormalidad detectada en el laboratorio y la tendencia hemorrágica.

Las deficiencias en FXI, atendiendo a la capacidad coagulante del plasma se clasifican en: severas (FXI:C menor de 20 U/dL), que se explican por alteraciones homocigotas o heterocigotas compuestas; moderadas (con niveles de FXI:C entre 20 y 60 U/dL); o leves (entre 60 y 70 U/dL) causadas por diferentes mutaciones en heterocigosis. Es importante destacar que el rango de normalidad en la población general de este parámetro, FXI:C es muy amplio, oscilando entre 70 y 150 U/dL, por lo que las deficiencia leves podrían perfectamente pasar desapercibidas [82].

Clásicamente se ha considerado que el déficit de FXI es poco frecuente, con una incidencia aproximadamente en 1 de cada 10.000 individuos en todo el mundo [83], si bien este dato parece relacionarse con las deficiencias severas. Aunque se ha encontrado en casi todas las regiones del mundo y grupos étnicos, es más frecuente entre judíos Ashkenazi (que abandonaron Jerusalén después de la destrucción del templo en el año 70 DC y emigraron a Polonia y los estados bálticos durante el siglo I),

e Iraquíes con una incidencia de homocigotos del 0.5% y 0.2% y de heterocigotos del 8% y del 3.3% respectivamente [84].

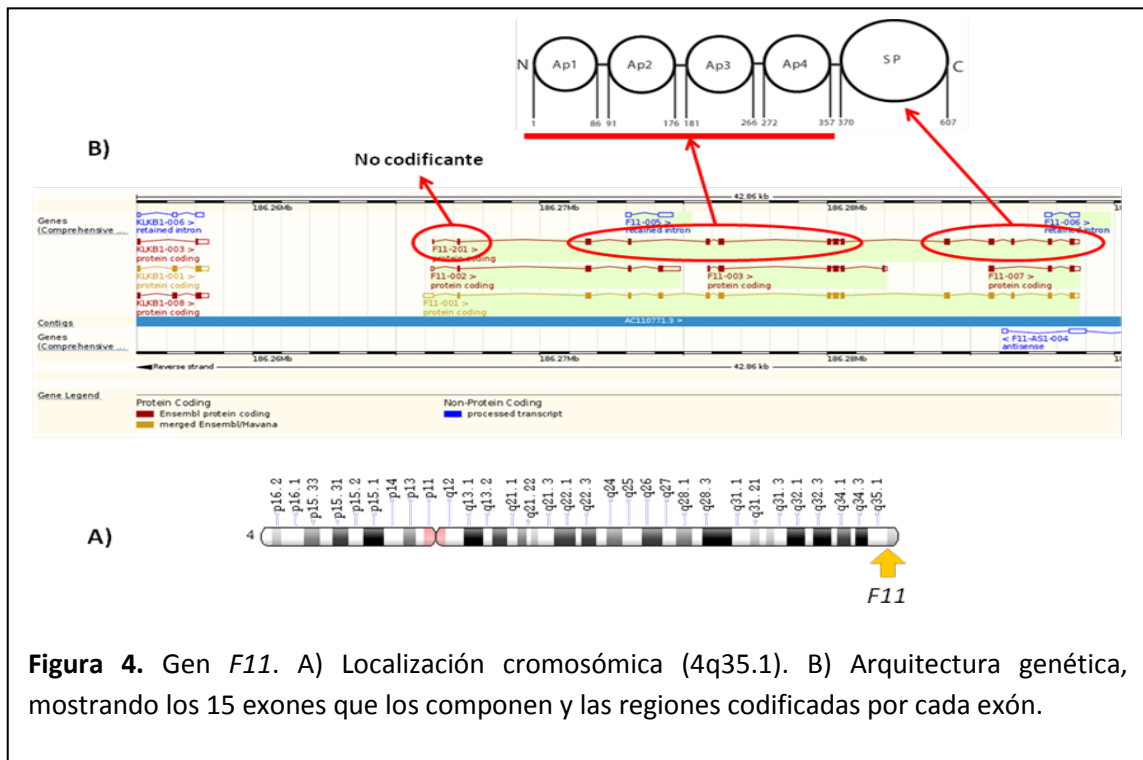
Esta frecuencia del 8% la convierte en uno de los trastornos genéticos más comunes en esta población judía. Con esta alta frecuencia es relativamente común que personas sin relación de parentesco pero con deficiencia parcial engendren hijos con deficiencia severa.

La frecuencia en no judíos es poco conocida, ya que habitualmente no suelen presentar patología hemorrágica significativa. Sin embargo son mayores las evidencias que sugieren que este desorden está posiblemente infradiagnosticado. En el Reino Unido se estima que la deficiencia de FXI podría representar el 7% de todos los trastornos de la coagulación según la base de datos de la organización de directores de centros de tratamiento de hemofilia [85].

### **Patogénesis molecular de la deficiencia de FXI**

La numeración de las mutaciones y los residuos afectados por dichas mutaciones que seguiremos en la tesis sigue las indicaciones de la HGVS (Human Genome Variation Society), informando de la mutación en la secuencia del cDNA y en proteína considerando el residuo 1 a la metionina iniciadora. En algunas bases de datos se sigue la numeración que se inicia en el primer aminácido de la proteína madura, sin péptido señal (Glutámico 19).

El gen que codifica para el FXI (*F11*) se encuentra cerca, aguas abajo, del gen de la PK en el cromosoma 4q35. *F11* abarca 23 kb y se compone de 15 exones y 14 intrones [86]. Este gen codifica una pre-proteína de 625 aminoácidos con un péptido señal de 18 aminoácidos. Los dos primeros exones incluyen material 5' no codificante (implicados por tanto en función reguladora), el inicio de traducción y el péptido señal, los exones del 3 al 10 codifican los 4 dominios Apple N-terminal (A1, A2, A3, y A4), y los exones 11 hasta el 15 codifican el dominio catalítico carboxi-terminal (Figura 4).



**Figura 4.** Gen *F11*. A) Localización cromosómica (4q35.1). B) Arquitectura genética, mostrando los 15 exones que los componen y las regiones codificadas por cada exón.

Las primeras tres mutaciones genéticas del *F11* asociadas con deficiencia de FXI se describieron en seis judíos Ashkenazis gravemente afectados [54]. De hecho, en la población Ashkenazi, dos mutaciones, p.Glu117stop y p.Phe283Leu, también llamadas mutación tipo II y mutación tipo III, se identifican en el 95% de los casos con deficiencia de FXI.

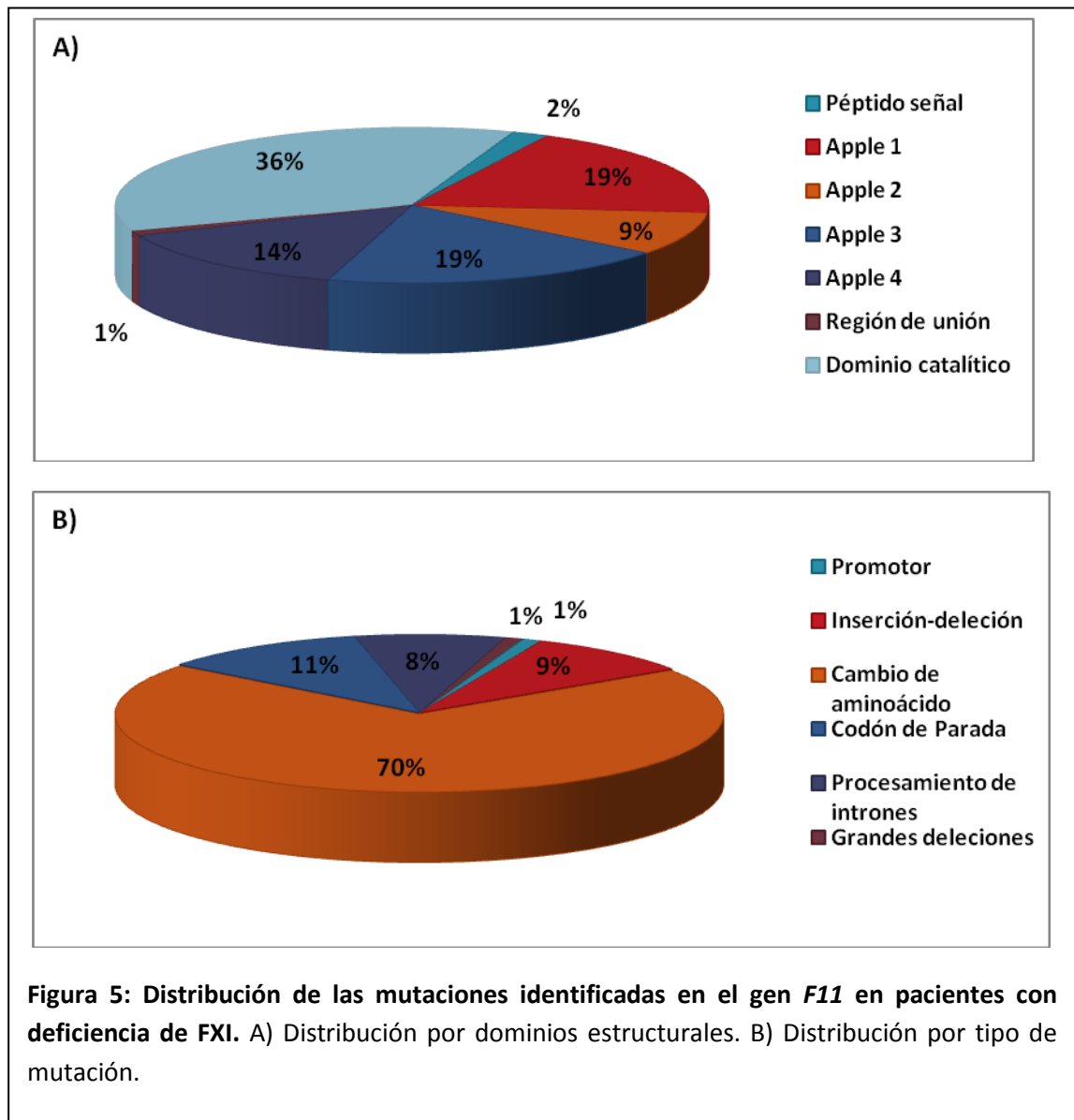
Sin embargo, la base molecular de la deficiencia de FXI es mucho más heterogénea en otras poblaciones [87-94]. Existen diferentes bases de datos que incluyen mutaciones en *F11* asociadas con deficiencia de FXI, como la HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=F11>), pero quizás la que con mayor periodicidad se actualiza es <http://www.factorxi.org>.

En contraste con la mayoría de las deficiencias de otros factores de la coagulación, gran parte de las mutaciones en *F11* están relacionadas con falta de producción o producción reducida de la proteína activa, lo que clásicamente se ha definido como deficiencias CRM- (“cross reactive material negative”). Tan solo un 4% de las deficiencias de FXI son explicadas por mutaciones que no afectan a la producción, plegamiento, dimerización y secreción del FXI y por tanto sólo tienen consecuencias funcionales (CRM+) [95-97].



Hasta la fecha, más de 190 mutaciones del gen *F11* han sido descritas en pacientes con deficiencia de FXI (<http://www.factorxi.org>). La gran mayoría son mutaciones puntuales, especialmente las que provocan el cambio de un solo aminoácido (missense). Las mutaciones missense constituyen el 58% de las mutaciones en *F11*. No obstante, también se han descrito mutaciones sin sentido (nonsense), que generan un codón de parada de traducción o stop (12%), e incluso polimorfismos cuya importancia patológica es discutida y en todo caso menor (13%). Las mutaciones puntuales que causan deficiencia de FXI también se han identificado en regiones intrónicas que flanquean a los exones y que forman parte de secuencias implicadas en el procesamiento de intrones durante la maduración del ARNm (8%). También se han descrito deleciones (6%) o inserciones de nucleótidos (3%) con consecuencias en la fase de lectura y generación de codones prematuros de parada de traducción a grandes deleciones de todo el gen.

La distribución de estas mutaciones en el gen del *F11* es amplia e incluye los dominios A1 (16%), A2 (9%), A3 (14%), y A4 (15%); región intrónica (13%); región 2 de enlace (1%); péptido señal (1%); y dominio serín proteasa (32%) (Figura 5).



La deficiencia de FXI en la población judía ha sido bien estudiada y tiene 4 mutaciones causales, categorizadas como tipos I a IV. Tipo I es una mutación puntual G-a-A en la secuencia donadora de procesamiento de intrones localizada en el último intrón (intrón N). Tipo II, causada por una mutación sin sentido (p.Glu135stop) en el exón 5, que resulta en una terminación precoz de la cadena aminoacídica y un nivel indetectable de proteínas debido a una mayor proteólisis. Tipo III es causada por una sustitución p.Phe301Leu en el exón 9, resultando un defecto parcial en la dimerización y la retención intracelular de monómero. Tipo IV está asociado a una delección de 14bp en el final del exón 14/inicio del intrón N que afecta al procesamiento de intrones. En pacientes con deficiencia severa de FXI, la mutación más frecuente es de tipo II (52%),

seguido de las de tipo III (46%) y, en raras ocasiones, por las tipo I (1%) y otras mutaciones (1%) [87,98,99]. Las mutaciones Tipo II y tipo III muestran efectos fundadores distintos de acuerdo con los estudios de haplotipos realizados en el gen del *F11* en portadores. Estos estudios han demostrado que la mutación tipo II se remonta a más de 120 generaciones en los Judíos en Oriente Medio (se ha visto en judíos iraquíes aunque con una frecuencia del 3,3%) y las mutaciones de tipo III se limita a Judíos Ashkenazi [98,100,101].

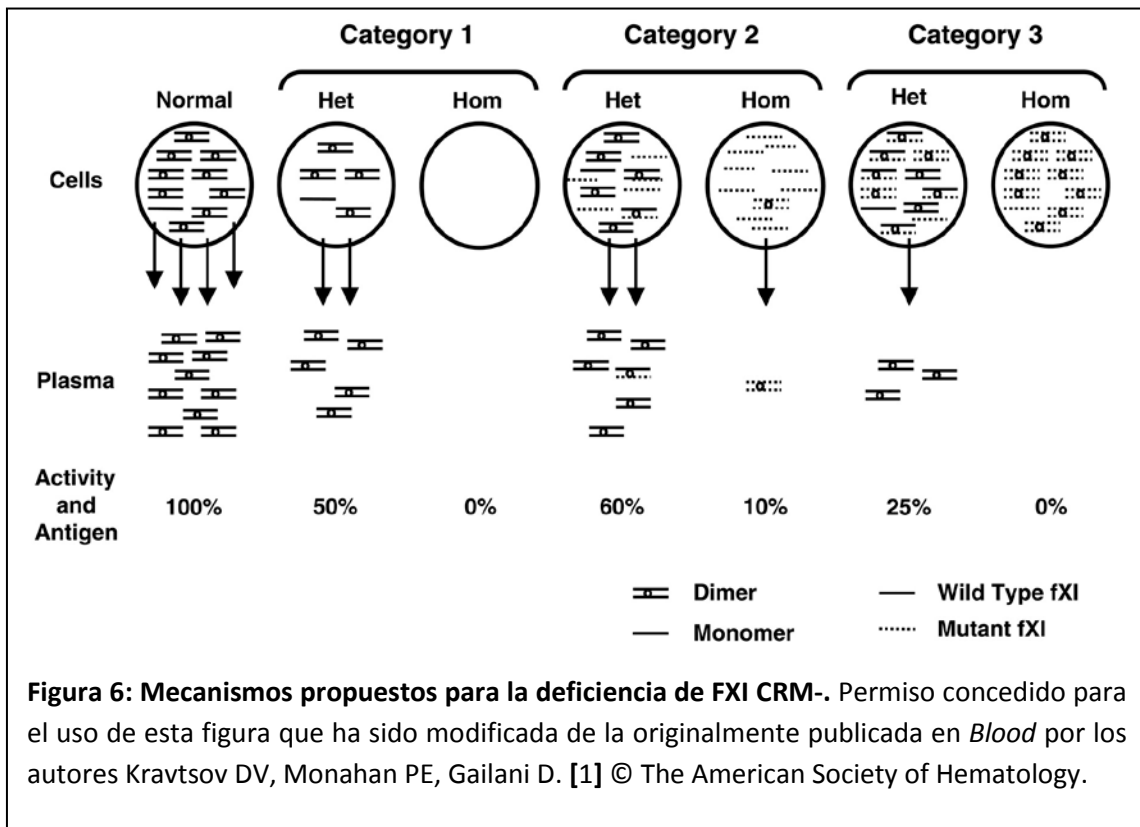
Como ya se ha comentado, en otras poblaciones hay mayor heterogeneidad molecular causante de la deficiencia de FXI, pero también se han descrito ciertas mutaciones más prevalentes en ciertas poblaciones. Así, la mutación p.Cys146stop es relativamente común en Reino Unido [95], p.Cys56Arg en habitantes del país vasco Francés [102], p.Gln106stop en una región de Francia (Nantes) [103], p.Trp246stop en China [94], p.Gln244stop en Japón [104], p.Cys146stop en Australia [105], y p.Phe301Leu en América Central y del Sur, Egipto y la India [106].

### **Fenotipos CRM- y CRM+**

Fenotípicamente la deficiencia de FXI se clasifica en 2 tipos [17]. El tipo CRM- (del inglés “cross reactive material negative”: material reactivo negativo) se caracteriza por baja actividad coagulante (FXI:C) y bajo nivel antigénico (FXI:Ag). Este cuadro indica que la proteína está ausente o disminuida en el plasma, sugiriendo un efecto mutacional a nivel de la producción, secreción o estabilidad del polipéptido sintetizado. El tipo II es CRM+ (del inglés “cross reactive material positive”: material reactivo positivo) se caracteriza por un nivel bajo de FXI:C con nivel normal de FXI antigénico (FXI:Ag). Este cuadro indica que en el plasma se detecta un nivel de proteína normal o casi normal pero con la actividad coagulativa disminuida por tener la mutación un efecto sobre la funcionalidad del FXI. Sólo un 4% de las deficiencias de FXI son CRM+.

Las mutaciones CRM- pueden ser clasificadas en base a su mecanismo fisiopatológico en 3 subcategorías (Figura 6) [1]: En la categoría 1 se afecta la síntesis del polipéptido del FXI mutado, los homocigotos tienen niveles indetectables de FXI en el plasma y los

heterocigotos tienen unos niveles de FXI aproximadamente de un 50% al tener sólo 1 alelo afectado. El ejemplo más frecuente de este tipo de deficiencia es la causada por la mutación p.Glu135stop. En la categoría 2 se sintetizan polipéptidos de FXI mutado funcionales que dimerizan mal, por lo que la mayoría de moléculas variantes se retienen intracelularmente como monómeros. El nivel de FXI plasmático en homocigotos de estas mutaciones es bajo, pero no nulo, oscilando entre el 10 y el 25%. En heterocigotos, la producción a partir del alelo normal no se ve afectada porque el polipéptido mutante dimeriza pobremente con el polipéptido normal y el nivel de FXI en plasma es de aproximadamente 60-80%. La mutación p.Phe301Leu es un ejemplo típico de la deficiencia CRM- categoría 2. En la categoría 3, el polipéptido mutado tiene capacidad de dimerizar, incluso con el monómero silvestre, pero el dímero no se secreta, lo que resulta en niveles plasmáticos indetectables en homocigotos y una ganancia de función en heterocigotos que alcanzan unos niveles plasmáticos de FXI del 25%. La mutación p.Ser243Phe es un ejemplo típico de este grupo [1].



Cerca del 4% de las mutaciones pertenecen al tipo II (CRM +). Producen proteínas disfuncionales con niveles de antígeno y actividad discordantes [107]. Hasta ahora,

sólo se han identificado 12 mutaciones en este tipo de deficiencia dispersas por diferentes dominios del FXI, aunque mayoritariamente se concentran en el dominio catalítico (Figura 4) (<http://www.factorxi.org>). En 11 casos CRM+ la mutación es missense. Estas identificaciones son realmente útiles ya que marcan residuos y dominios funcionales claves. Las mutaciones missense descritas en CRM+ son: p.Gly173Glu (dominio A2), p.Arg202Gly (dominio A3), p.Ser266Asn (dominio A3), p.Gly368Ala (dominio A4), y 7 mutaciones en el dominio serín proteasa: p.Val389Ile, p.Ala393Val, p.Arg396Cys, p.Pro538Leu, p.Gly573Glu, p.Thr593Met, y p.Ser594Arg. También destacamos la existencia de una mutación nonsense identificada en un caso CRM+; el cambio p.Cys599stop que afecta al dominio catalítico (en el dominio serín proteasa), provoca la aparición de un codón stop que no impide la síntesis de un polipéptido menor, capaz de dimerizar pero sin actividad catalítica [103].

Atendiendo al mecanismo por el que estas mutaciones provocan la deficiencia de FXI CRM+, se identifican dos categorías: categoría 1, las mutaciones que interfieren con la activación del FXI [2,83,108-110], y la categoría 2, en el que las mutaciones alteran la activación del FIX por el FXI e incluyen todas las localizadas en el dominio catalítico [2,97,108,111-116].

## **Herencia**

El patrón de herencia de la deficiencia de XI presenta controversia, pues la categoría 3 CRM-, con su ganancia de función hizo pensar que podría considerarse como un desorden autosómico dominante ya que los síntomas clínicos aparecen en heterocigosis y se transmiten de padres a hijos. Pero ya no existe duda del carácter autosómico recesivo de este desorden entre otras razones por la prácticamente nula tendencia hemorrágica de portadores heterocigotos.

Un estudio inicial de ocho pacientes y sus familias demostró que los pacientes que tenían deficiencia severa tenían hemorragias postoperatorias, mientras que los que tenían deficiencia parcial no sufrieron hemorragias graves tras cirugías o extracciones dentales. El estudio incluyó datos de 36 pacientes a quienes realizaron 94 intervenciones, 85 sin episodios hemorrágicos y en 9 solo ocurrieron hemorragias

leves como ligeros sangrados tras extracciones dentales y un episodio de hemorragia vaginal tras histerectomía [117].

Un segundo estudio de 10 miembros de familias judías, confirmó el patrón de herencia. Pero se vio una falta de relación absoluta entre el historial de hemorragias y la deficiencia de FXI [118]. No obstante tenemos que indicar que la descripción de la herencia como recesiva es engañosa pues da a entender que las personas con deficiencia parcial no tienen riesgo hemorrágico.

### **Cuadro clínico de la deficiencia de FXI**

Como hemos indicado, los pacientes con deficiencia de FXI habitualmente no tienen hemorragias espontáneas, pero pueden tener hemorragias leves o moderadas en determinadas circunstancias. Las hemorragias se pueden presentar precozmente en la circuncisión o mucho más tarde en la menarquia, con traumas o con cirugía. Es reconocido que hay una mayor incidencia tras las lesiones en los lugares con una mayor actividad fibrinolítica como las mucosas de la boca, la nariz o del tracto genitourinario. Las hemorragias pueden presentarse precozmente o de forma tardía. La tendencia y la severidad de las hemorragias no tienen relación directa con el nivel de déficit de FXI [119-122]. La predilección por los lugares con aumentada actividad fibrinolítica se explica, al menos en parte, porque la generación de trombina a partir del FXIa no es para iniciar la coagulación sino más bien para consolidar el coagulo, y este último proceso, la consolidación del coagulo, está influenciada por la actividad fibrinolítica. Se han descrito casos de hemorragias torácicas masivas, cerebral, subaracnoidea y espinal-epidural. Las hemartrosis espontáneas son muy raras, aunque se han identificado en pacientes con deficiencia parcial. También se han observado hematurias y predisposición para las menorragias.

Más controversia existe sobre la tendencia hemorrágica en portadores heterocigotos de alteraciones que provocan deficiencia parcial de FXI. Estos sujetos habitualmente no presentan hemorragias graves después de cirugías o extracciones dentales, aunque en algunos estudios ha habido pacientes que han sangrado excesivamente tras cirugías, amigdalectomías o extracciones dentales [85,95,123-126]. Se ha descrito una falta de relación entre el historial de hemorragias y el nivel de FXI [118]. No obstante,

existen algunas referencias que sugieren que entre el 20 y el 50% de personas con déficit parcial sangran excesivamente y se han descrito tendencias hemorrágicas excesivas en personas con niveles entre 50-70 U/dL [123].

La impredecibilidad de la tendencia hemorrágica en la deficiencia del FXI se ha achacado a varios factores: moléculas variantes de FXI, alteraciones de otros factores de la coagulación, defectos plaquetarios y del FXI plaquetario y defectos de la función fibrinolítica en los lugares de lesiones. Es posible que otros factores (genéticos o ambientales) que afectan al sistema hemostático puedan modular el riesgo hemorrágico en pacientes con deficiencia de FXI, aunque en nuestro conocimiento son pocos los estudios que han evaluado estas posibles combinaciones y modulaciones.

Un estudio de 165 personas con deficiencias graves de FXI que se sometieron a 120 intervenciones sin terapia de reemplazo demostró que no hubo hemorragia excesiva, siendo 9 de ellas intervenciones ortopédicas. El riesgo de hemorragia fue bajo en cirugías en zonas que no mostraban incremento de la fibrinólisis, pero ocurrió en 49-67% de las intervenciones en zonas de alta actividad fibrinolítica [127]. Se ha informado sobre varios casos de deficientes de FXI que también padecen hemofilia A, o enfermedad von Willebrand (EvW) y que muestran mayor tendencia hemorrágica [85]. Recientes estudios israelíes demuestran una relación más consistente del efecto aditivo de dos desórdenes asociados con tendencia hemorrágica, al observar la presencia de EvW en la mayoría de las hemorragias en la deficiencia parcial de FXI [128].

De modo inverso, en otro estudio, la tendencia hemorrágica en personas con EvW fue predecible por el nivel de FXI:C y el nivel del antígeno del factor von Willebrand (FvW), utilizando análisis logísticos de regresión [125]. Empleando métodos similares en pacientes con deficiencia de FXI, las hemorragias se predijeron con una especificidad del 85% tras cumplimentar un cuestionario detallado y extensas entrevistas a pacientes con las siguientes variables: sexo, edad, edad al momento del diagnóstico, historial de hemorragias, nivel de FXI:C, genotipo del FXI, nivel de factor VIII:C, antígeno y actividad del FvW y grupo sanguíneo. Los niveles de FVIII:C se correlacionan con los niveles de FXI:C, pero ni esta correlación, ni el nivel de FvW vaticinaron hemorragias [129]. Pero esta asociación no está tan clara. En un estudio realizado en el

Reino Unido, donde existe una amplia heterogeneidad genética tanto para la deficiencia de FXI como para la EvW, no se verificó ninguna asociación de las manifestaciones hemorrágicas con la combinación de estos dos desórdenes. El estudio demostró una diferencia estadísticamente importante en los niveles de FvW (pero todavía dentro del rango normal) entre pacientes con una deficiencia parcial que tenían un historial de hemorragias, comparados con pacientes sin hemorragias con niveles similares de FXI:C [85].

La función del FXI en las plaquetas necesita ser esclarecida. Se ha detectado FXI plaquetario en algunas personas con deficiencia severa de FXI que no sufren hemorragias y que no se observa en pacientes con deficiencia que presentan hemorragias [130]. Este mecanismo no explicaría la variabilidad de la tendencia hemorrágica encontrada en algunas familias [123]. Los investigadores han informado sobre casos de pacientes que presentan defectos plaquetarios además de deficiencia de FXI [131,132]. Un estudio en el Reino Unido no encontró tiempos de sangrado anormales en 63 pacientes con deficiencia de FXI [85]; no obstante, un cuidadoso análisis reciente de 27 pacientes de 18 familias condujo a la identificación de 16 con varios defectos plaquetarios [131].

### **Terapia para los pacientes con deficiencia congénita de FXI**

La deficiencia de FXI es un trastorno poco común y distinta de otras deficiencias de factores de la coagulación porque el sangrado, por lo general, ocurre solo después de la cirugía o trauma. Además, la gravedad de la hemorragia no se correlaciona con los niveles de FXI, y la terapia de reemplazo puede estar asociada con riesgo de trombosis [133]. Todos estos datos hacen que el tratamiento de pacientes con deficiencia de FXI sea todavía materia de debate.

Una reciente revisión de la experiencia de un centro, demostró que se registraron hemorragias en 22 de 31 casos con deficiencia de FXI (71%) sometidos a amigdalectomías sin tratamiento. En este estudio, 12 de 14 (93%) con deficiencia severa sufrieron hemorragias, mientras que 10 de 17 (59%) con deficiencia parcial también presentaron hemorragias. Además, 28 de 55 (51%) extracciones dentales se complicaron por hemorragias: 15 de 25 (60%) en pacientes con deficiencia severa y 13



de 30 (43%) en pacientes con deficiencia parcial [126]. Esta variabilidad, junto con las desventajas relacionadas con las diversas modalidades de tratamiento, hace que el manejo de la deficiencia de FXI sea un desafío. No obstante, una publicación reciente de Israel sugiere que el uso más cuidadoso de la terapia de reemplazo en pacientes con deficiencias graves debe ser adecuado y determinado por el sitio y tipo de la cirugía [127].

La principal preocupación en el tratamiento de pacientes con deficiencia severa de FXI es la administración excesiva de tratamiento profiláctico para pacientes que no sangran, y la terapia quizá insuficientes para pacientes sangrantes. Desafortunadamente, hasta la fecha, no hay baremo disponible de sangrado para estimar la cantidad o extensión de la hemorragia y su correlación con el riesgo de sangrado en los procedimientos a realizar, para los pacientes con deficiencia de FXI. Además, el enfoque actual no es aplicable a pacientes sin cirugías previas. El papel de la trombofilia; los niveles de FvW, FVIII, fibrinógeno y trombomodulina; así como el recuento de plaquetas, o los niveles de FXII como "modificadores de sangrado" en el contexto de la deficiencia de FXI son todavía desconocidos. Sin embargo, las interacciones genético-ambientales actúan como un modificador del fenotipo clínico de la deficiencia de FXI en condiciones como el embarazo [134,135] y la sepsis. La prueba de la generación de trombina, uno de los ensayos de hemostasia global que refleja la capacidad global de respuesta del sistema hemostático, parece distinguir entre sangradores y no sangradores [136,137]. Sin embargo, esta prueba necesita más investigación y estandarización y los resultados observados en pacientes con deficiencia de FXI deben ser validados por otros grupos y con mayor número de pacientes, ya que los estudios son pequeños.

También se ha demostrado que los pacientes con antecedentes de hemorragia exhiben reducida densidad de la red de fibrina, en comparación con los no sangradores cuando se evaluó mediante microscopía confocal de barrido [138].

Mientras tanto, en ausencia de un método de laboratorio sensible y estandarizado para la evaluación del riesgo de sangrado en pacientes con deficiencia de FXI, se requiere un tratamiento profiláctico para procedimientos invasivos antes de la cirugía, independientemente de la historia de sangrado.

Actualmente, el tratamiento más comúnmente ofrecido a pacientes con deficiencia severa de FXI es plasma fresco congelado (PFC) en una dosis de 15 mL/kg, para alcanzar una actividad del FXI en torno al 40%, aproximadamente durante una semana [139]. El tratamiento se asocia con complicaciones potenciales, tales como la sobrecarga de volumen en pacientes con insuficiencia cardiaca congestiva e insuficiencia renal. Además, el PFC no puede ser utilizado en pacientes con inhibidores a FXI, y de hecho parece aumentar el riesgo de desarrollo de inhibidores después de la exposición en aquellos pacientes con niveles indetectables de FXI [140]. El uso de PFC puede complicarse con un mayor riesgo de enfermedades transmitidas por transfusión, reacciones alérgicas e incluso shock anafiláctico, sobre todo en aquellos con deficiencia de inmunoglobulina A (IgA) cuando no se pueda usar PFC deplecionado de IgA.

El desarrollo de productos inactivados viralmente, ya sea en lotes tratados con solvente/detergente o en unidades de donantes únicos tratadas con azul de metileno, ha hecho al PFC más seguro. Utilizando plasma tratado con solvente/detergente, la vida media estimada del FXI:C fue de 45 horas, similar al PFC estándar [141]. No obstante, se ha informado sobre un contenido de FXI:C demasiado variable en este producto, con algunos lotes conteniendo sólo 35 a 50 UI/dL [142]. Trabajos recientes indican que es posible pasteurizar lotes de PFC (descongelados a -30° C y después calentados a 60° C durante 10 horas) con preservación de 75 a 95% de la actividad del FXI [143].

El concentrado de FXI (derivado de plasma e inactivado térmicamente) es otra opción ofrecida en algunos países, en ausencia de FXI recombinante. Estos productos son eficientes en la predicción del aumento esperado en los niveles de FXI cuando se administra una dosis dada, y ya que tiene una vida media larga, lo que hace que este tratamiento se pueda dar en días alternos.

El nivel objetivo que debe alcanzarse con este tratamiento debe ser el 30-40 UI/dL.

La advertencia del uso de concentrado de FXI es que los productos actualmente disponibles (Bio Products Laboratory en Reino Unido y LFB Biomedicaments en Francia) es el riesgo trombótico que se ha descrito. Por ello, el concentrado de Bio Products contiene una alta concentración de antitrombina y heparina para reducir su

capacidad trombogénica, pero incluso con esta formulación, el producto mantiene elevada trombogenicidad. Y el concentrado de LFB además de antitrombina y heparina contiene inhibidor de C1 [139,144,145].

Como ocurría con el PFC, los pacientes con niveles plasmáticos indetectables de FXI presentan alto riesgo de desarrollar inhibidores después de exposición a los concentrados [97], y no se pueden utilizar en pacientes con deficiencia de IgA. Por lo tanto, antes de que estos concentrados sean indicados, es obligatorio cuantificar los niveles antigénicos de FXI en el paciente, y debe estudiarse la presencia de anticuerpos en pacientes con niveles de FXI indetectables que fueron expuestos previamente a PFC, y/o concentrado de FXI.

Podemos concluir que los concentrados de FXI disponibles actualmente son hemostáticamente eficaces y se encuentran libres de transmisión viral, pero deben utilizarse con precaución, especialmente en personas mayores con enfermedades cardio-vasculares y en individuos con estados protrombóticos (por ejemplo, mujeres embarazadas o puerperales y en pacientes con enfermedades malignas). Algunos autores siguen planteando que existen circunstancias en donde el balance de riesgo plantee el uso de estos productos con intensas medidas de precaución. Y no podemos olvidar que más de 40 personas de más de 60 años han recibido el concentrado de FXI sin episodios adversos. Las directrices de la Organización de Directores de Centros de Hemofilia del Reino Unido recomiendan que las dosis no excedan 30 UI/kg y que el nivel post-infusión de FXI:C no debe exceder 100 U/dL [146].

Puesto que hay inquietudes respecto a la trombogenicidad en pacientes que reciben concentrados de FXI, es claro que todavía existe un lugar para el PFC en la profilaxis anti-hemorrágica y en el tratamiento de pacientes con deficiencia de FXI.

Se han investigado otros agentes anti-hemorrágicos en pacientes con deficiencia de FXI.

Dosis bajas (15-30  $\mu\text{g}$  /kg) de Factor VIIa recombinante (rFVIIa) se han utilizado con éxito en pacientes con deficiencia severa de FXI, con y sin inhibidores [147,148]. Pero la experiencia es muy reducida, y se debe tener precaución cuando se usa en dosis más altas, como las que se utilizan habitualmente para el tratamiento de la hemofilia A y B, a causa del aumento del riesgo de trombosis [149,150]. Es el único tratamiento

disponible para los pacientes con inhibidores, y se ha sugerido también su uso en el tratamiento primario para evitar la exposición a productos sanguíneos.

Los agentes antifibrinolíticos, como el ácido tranexámico o el ácido 6-aminocaproico, se utilizan actualmente como monoterapia para procedimientos menores tales como antes de las extracciones dentarias, o en combinación con rFVIIa de dosis baja o PFC en los procedimientos más sangrantes.

De forma práctica, antes de planear el tratamiento profiláctico en pacientes con deficiencia severa de FXI, [139] recomiendan plantearse las siguientes cuestiones:

1. Lugar y tipo de cirugía. Intervenciones en lugares con actividad fibrinolítica tienen mayor riesgo de hemorragias. Se ha recomendado el uso de antifibrinolíticos solos o con otras medidas para intervenciones en esos tejidos.
2. La presencia de un inhibidor. Debe buscarse en déficit severos que han sido tratados con plasma, y/o concentrados de FXI.
3. La combinación con otros defectos hemostáticos. Si el paciente tiene mayor tendencia hemorrágica que otros con similar tasa de FXI, se deben buscar trombopatías, disminución del FvW o disfibrinogenemia.
4. El riesgo trombótico. Vigilancia estrecha en los tipos de cirugía más trombóticos.
5. La sobrecarga de volumen. Evaluar antes de tratar con PFC la posibilidad de fallo cardíaco congestivo y la función renal.
6. La presencia de la deficiencia de IgA. Ante la posibilidad de reacciones alérgicas a la infusión de plasma o sus derivados.
7. La exposición anterior o no a productos sanguíneos.

En conclusión, la terapia adaptada al riesgo de un individuo y el tipo de procedimiento constituye el manejo ideal de pacientes con deficiencia de FXI. Queda por determinar si una de las pruebas de coagulación globales, incluyendo ensayos de la fibrinólisis y/o de la estructura del coagulo, pueden predecir de manera eficiente el riesgo de hemorragia de un individuo determinado, antes de poder recomendar el tratamiento profiláctico, pero estas pautas no están disponibles en la práctica clínica.

## **FXI y trombosis**

Debido a que el FXI tiene efectos procoagulantes y antifibrinolíticos, es razonable deducir que los altos niveles de FXI aumentan el riesgo trombótico y, por el contrario, la deficiencia severa de FXI puede proporcionar protección contra los trastornos trombóticos. Los datos del estudio LETS (“The Leiden Thrombophilia Study”) en pacientes con trombosis venosa [151] han mostrado que los individuos con niveles de FXI en el percentil 10 superior tienen mayor riesgo de desarrollar trombosis que los sujetos con niveles de FXI debajo del percentil 90 (riesgo relativo –OR-: 2,2 con un intervalo de confianza -IC- al 95% de 1,5-3,2). Otro estudio informó del alto índice de recurrencia de tromboembolismo venoso en pacientes con aumento de la actividad FXI y de los niveles antigénicos de TAFI [152]. En cuanto a accidente cerebrovascular isquémico, Yang y col.[153] informaron de niveles de FXI superior al 95% en 17 de 78 (22%) de los pacientes con ictus isquémico o ataque isquémico transitorio vs. 2 de 40 sujetos de control (5%) (OR: 5,3; IC del 95%: 1,2-24,1).

Estos datos sugieren la correlación positiva entre los altos niveles de FXI y el riesgo de sufrir trombosis venosa (TV).

Pero más contundentes son los datos que avalan el papel protector de la deficiencia de de FXI en la patología trombótica. Un estudio reciente de Salomon y col.[57] muestra la ausencia de TV en pacientes con deficiencia severa de FXI. En una cohorte de pacientes no relacionados con la deficiencia severa de FXI (n = 219; rango de edad, 20-94 años), no se observó ningún caso de TV. Este resultado fue considerablemente menor que la incidencia esperada (4.68) calculado a partir de un estudio poblacional, y se mantuvo incluso cuando se compara con otros 3 estudios de población similar.

En un reciente estudio comparativo de la incidencia de accidente cerebrovascular isquémico en pacientes con deficiencia de FXI se observó una incidencia significativamente menor de ictus isquémico en pacientes con deficiencia severa de FXI (FXI: C < 15 UI/dL [n = 115], la edad, ≥ 45 años) que en la población israelí con igual proporción de los principales factores de riesgo (1/115 vs. 8.56 / 115) [154]. Este hallazgo sugiere un efecto protector de la deficiencia de FXI contra el accidente

cerebrovascular isquémico, así como la importancia de FXI en la patogénesis del accidente cerebrovascular isquémico. No obstante recientemente se ha descrito el caso de un paciente con deficiencia de FXI que ha padecido una trombosis cerebral espontánea a la edad de 2 años sin ningún tipo de terapia de reemplazo o herencia de trombofilia. El análisis genético reveló que la paciente, que no tenía factores de trombofilia, era homocigota para la mutación p.Cys416Tyr del *F11*.

Existen datos contradictorios en relación al efecto de alteraciones en los niveles del FXI con el riesgo de infarto de miocardio. Varios trabajos indican que no existe relación entre niveles altos de FXI e infarto agudo de miocardio [155,156]. Sin embargo, un estudio mostró un OR ajustado de 1,8 (IC del 95%, 1,2 a 2,7) para los individuos con niveles de FXI en el quintil más alto en comparación con el quintil más bajo, que en el subgrupo de pacientes con niveles bajos de FXII llegaba a alcanzar un OR ajustado de 6,4 (IC del 95%, 2,2-18,0) [157]. En relación al potencial efecto protector de la deficiencia de FXI en infarto de miocardio, los escasos trabajos disponibles, todos realizados en la misma población (Judíos Askenazis) informan de la existencia de casos con deficiencia severa de FXI que han desarrollado infarto agudo de miocardio, y de hecho, la incidencia de infarto de miocardio fue similar en pacientes con deficiencia severa de FXI y la población en general [154,158]. Por lo tanto, la deficiencia hereditaria de FXI no parece conferir protección contra el infarto agudo de miocardio. La razón de los efectos dispares de la deficiencia de FXI sobre el accidente cerebrovascular isquémico agudo y sobre el infarto de miocardio no está claro y requiere mayor investigación. La heterogeneidad de las células vasculares endoteliales en sus estructuras y funciones de las diferentes localizaciones del cuerpo, así como su interacción con los componentes celulares y plasmáticos de sangre, puede ser algunas de las principales causas [154,159,160]. Sabemos que los vasos cerebrales contienen proteína  $\beta$  amiloide, pero los vasos coronarios no expresan esta proteína [159]. Son necesarios más estudios para aclarar si la proteína  $\beta$ -amiloide tiene un papel en las diferencias observadas.

### **Modelos animales**

Los resultados obtenidos en modelos animales no tienen porqué extrapolarse, al menos al 100%, al humano, pero sin duda, los modelos animales, mayoritariamente murinos, son excelentes aproximaciones experimentales para conocer aspectos fisiopatológicos de cualquier proteína.

Para la ruta de contacto en general y para el FXI en particular, los resultados obtenidos en modelos murinos han sido de una gran importancia y han abierto nuevas perspectivas en el sistema hemostático y apasionantes posibilidades terapéuticas.

Los ratones con manipulación genética que no expresan FXI son sanos y con capacidad reproductiva normal [161]. Aunque el TTPa de ratones con FXI nulo está prolongado, no tienen tendencia al sangrado espontáneo y el tiempo de sangrado es normal [162,163], confirmando el escaso papel de este elemento en la respuesta fisiológica normal del sistema hemostático. Estos datos son completamente compatibles y comparables a los resultados obtenidos en ratones KO para el FXII [163]. Rosen y col. [164] describieron por primera vez el efecto de la deficiencia de FXI en la trombosis inducida por lesión de la arteria carótida con cloruro férrico (FeCl<sub>3</sub>) en ratones. La falta de FXI atenúa notablemente la formación del trombo mientras que la infusión intravenosa de FXI restauró la formación del trombo oclusivo, lo que indica una relación de causa-efecto entre la deficiencia de FXI y la inhibición de la trombosis. Efectos similares se observaron también en las arteriolas mesentéricas [53] y la vena cava [165] en ratones FXI -/- después de la lesión con FeCl<sub>3</sub>. En un estudio comparativo para evaluar los efectos de las deficiencias de FIX y de FXI en oclusiones de la arteria en ratones inducida por FeCl<sub>3</sub>, tanto los FIX -/- como los FXI -/- fueron totalmente protegidos de trombos oclusivos, y los efectos protectores fueron comparables a heparina a dosis alta (1.000 UI/kg) y eran más potentes que la aspirina. Aunque la incidencia de trombosis arterial en ratones FIX -/- y FXI -/- fue similar, se observó una notable diferencia en el ensayo de tiempo de sangrado en la cola del ratón. El tiempo de hemorragia fue normal en los ratones FXI -/- y sin embargo, se prolongó significativamente en los ratones FIX -/- [166]. Diferentes trabajos muestran la disminución en la formación de trombos en ratones FXI -/- después de la lesión con láser [167], lesión de compresión [53], y la oclusión transitoria de la arteria cerebral media [52]. Wang y col. [165], utilizando un modelo murino con deficiencia de FXI y

trombosis inducida por FeCl<sub>3</sub> en la vena cava observó que el efecto antitrombótico de la deficiencia de FXI fue sustancialmente más fuerte que la heparina en dosis altas (1.000 UI/kg), clopidogrel (30 mg/kg), y argatroban (30 mg/kg), mientras que el tiempo de sangrado fue comparable a la de los ratones normales. Estos resultados están en consonancia con los hallazgos observados en un modelo de ratón con deficiencia combinada de proteína C (PC) y FXI (PC -/- & FXI -/-), que muestra la supervivencia de los dobles KO frente a la letalidad embrionaria de ratones PC -/- & FXI +/- [168].

Todos estos datos apoyan fuertemente el efecto antitrombótico de la deficiencia de FXI, al menos en ratones. Sin embargo, el mecanismo subyacente no está completamente dilucidado. Se propuso una asociación con una disminución de la activación de TAFI [44,169,170]. Curiosamente, un estudio reciente mostró que ratones sin TAFI (TAFI -/-) no están protegidos de la oclusión arterial después de una lesión con FeCl<sub>3</sub> [163], en consonancia con otro que utilizó un modelo de oclusión transitoria de la arteria cerebral media, que no reveló significativa diferencia en el volumen de infarto y la acumulación de fibrinógeno entre el ratones TAFI -/- y el grupo de control [171]. Tal vez TAFI no tiene un papel importante en la formación de trombos arteriales. Además, Tucker y col. [172] observaron una coagulopatía reducida y supervivencia prolongada en ratones deficientes en FXI cuando se comparaba con ratones que expresan niveles normales de FXI en un modelo de sepsis por ligadura más punción cecal, lo que sugiere una contribución del FXI a la patogénesis de la coagulación intravascular diseminada, así como el proceso inflamatorio durante la sepsis.

Los modelos animales que sugieren escaso papel en hemorragia pero gran protección en trombosis para la deficiencia de FXI no se restringen a cepas genéticamente modificadas que provocan la deficiencia de FXI.

Gruber y col. [173] proporcionaron los primeros datos sobre el potencial antitrombótico de anticuerpos anti-FXI. En su modelo trombotico en babuinos demostraron que el anti-FXI empleado (un anticuerpo que reconoce específicamente dominio A3 del FXI) redujo notablemente el crecimiento del trombo intraluminal, pero no pudo evitar el inicio de la trombosis. El efecto antitrombótico del anti-FXI era comparable al de la heparina a dosis que prolonga marcadamente el TTPa, el tiempo



de protrombina y el tiempo de sangrado. Por el contrario, con anti-FXI sólo se prolongó el TTPa sin alargar el tiempo de protrombina ni el de sangrado. Tucker y col. [150], utilizando un modelo de trombosis en primates, demostraron una prevención eficaz de la oclusión del injerto vascular y de la generación de trombina asociada al trombo en los babuinos tratados previamente con un anticuerpo monoclonal anti-FXI humano. El tiempo de sangrado no se vio afectado. El tratamiento previo con aspirina no sólo no pudo evitar la oclusión del injerto, sino también prolongaba notablemente el tiempo de sangrado. De forma consistente, en modelos de conejo con lesión de la neoíntima y daño endotelial más ligadura de los vasos, el anticuerpo monoclonal anti-FXI redujo significativamente el crecimiento del trombo en la arteria iliaca y la vena yugular [174,175].

### **Inhibidores del FXIa y trombosis**

También se han buscado inhibidores del FXIa para evaluar su efecto antitrombótico. Lin y col. [176] y Deng y col. [177] desarrollaron una serie de inhibidores peptomiméticos del FXIa basados en ketoarginina, que de modo irreversible bloqueaban la actividad del FXIa a través de una unión covalente. Como era esperable, estos inhibidores atenuaban eficazmente la trombosis venosa sin prolongar el tiempo de sangrado en un modelo de rata.

El BMS-262084, una pequeña molécula inhibidora selectiva del FXIa, también mostró un efecto protector contra la trombosis inducida por FeCl<sub>2</sub> pero no a la inducida por el FT [178].

El AcaNAP10 es un péptido clonado a partir de un nematodo hematófago que ha mostrado un fuerte efecto inhibidor del FXIa aunque también tiene un débil efecto inhibidor del FVIIa-FT [179], aunque su eficacia antitrombótica *in vivo* no se ha objetivado todavía.

Decrem y col. [180] informaron de un inhibidor recombinante de la fase de contacto, identificado en la garrapata común (*Ixodes ricinus*), que inhibe tanto el FXIa, como el FXIIa, y la calicreína. Este inhibidor atenuaba significativamente la formación del trombo venoso y arterial en diferentes modelos de trombosis en ratones y ratas sin perjudicar la hemostasia.

### **La inhibición de la activación del FXI mediada por FXIIa**

Como se mencionó anteriormente, las 2 vías de activación del FXI tienen significados biológicos diferentes. La activación del FXI por retroalimentación por la trombina participa en la hemostasia fisiológica mientras que la activación mediada por el FXIIa se asocia con el crecimiento del trombo patológico. Por lo tanto, el bloqueo de la activación del FXI mediada por el FXIIa puede servir como una estrategia novedosa y eficaz para la prevención de la trombosis. Datos interesantes están surgiendo en este campo. El anticuerpo 14E11, que específicamente bloquea la activación del FXI por el FXIIa, es una ruta prometedora. Este anticuerpo no sólo impide la oclusión arterial inducida por  $\text{FeCl}_3$  y atenúa la embolia pulmonar provocada por el FT en ratones, sino que también reduce el crecimiento del trombo rico en plaquetas en injertos revestidos con colágeno en babuinos [51].

Interesantes son también los resultados obtenidos con una proteína quimera de albúmina humana recombinante e infestina-4, un inhibidor de serín proteasa presente en insectos que presenta una potente actividad inhibidora de FXIIa [181]. Esta proteína quimera es capaz de inhibir marcadamente la formación de trombosis arterial oclusiva sin afectar el tiempo de sangrado en modelos de ratón y rata [182].

### **Bloqueo de Biosíntesis del FXI y trombosis**

La terapia con oligonucleótidos antisentido que inhiben la biosíntesis de las proteínas que causan una enfermedad se ha utilizado recientemente para tratar ciertos trastornos. Recientemente, dos trabajos [183,184] bloquearon con éxito la biosíntesis del FXI en ratones con oligonucleótidos antisentido específicos (ASO, del inglés AntiSense Oligonucleotides). Estos agentes consiguen el bloqueo casi total de la expresión hepática del ARNm de FXI y obtienen una marcada reducción de la proteína, del FXI en plasma y consecuentemente de su actividad procoagulante. Como era esperable, el tratamiento con ASO anti-FXI inhibe fuertemente la trombosis arterial y venosa sin afectar al tiempo de sangrado. La coadministración de ASO anti-FXI con enoxaparina o clopidogrel mejoraba aún más el efecto antitrombótico sin aumentar

tendencia al sangrado [184]. Es muy importante destacar que el efecto anticoagulante de la terapia antisentido contra el FXI fue rápido y se puede revertir eficazmente con concentrados de FXI [184].

Recientemente se ha publicado un estudio prospectivo y randomizado que muestra el beneficio de ASO anti-FXI en 300 pacientes que se sometieron a artroplastia de rodilla [185]. Los pacientes se randomizaron aleatoriamente en tres grupos; dos recibieron ASO anti-FXI en dos dosis diferentes (200 mg o 300 mg), mientras que el tercer grupo recibió 40 mg de enoxaparina una vez al día. Los objetivos del estudio fueron: 1) evaluar la incidencia de tromboembolismo venoso (objetivado tanto por venografía bilateral como por la clínica) y 2) analizar los eventos hemorrágicos mayores o menores pero clínicamente relevantes. La Tabla 1 recoge los niveles de FXI en el momento de la cirugía.

**Tabla 1. Niveles de FXI plasmático, incidencia de trombosis y hemorragia en el estudio de Büller y col.[185] que comparaba el efecto de oligonucleótidos antisentido específicos (ASO) anti-FXI frente a heparina de bajo peso molecular en artroplastia de rodilla.**

	<b>ASO anti-FXI 200 mg</b>	<b>ASO anti-FXI 300 mg</b>	<b>Enoxaparina 40 mg</b>
FXI plasmático (UI/mL) durante la cirugía	0,38 ± 0,01 UI/mL	0,20 ± 0,01 UI/mL	0,93 ± 0.02 UI/mL
Incidencia de trombosis (%)	27%	4%	30%
Incidencia de hemorragias (%)	3%	3%	8%

El resultado de eficacia primaria fue contundente. Se objetivaron eventos trombóticos en 36 de 134 pacientes (27%) que recibieron la dosis de 200 mg de ASO anti-FXI y en 3 de 71 pacientes (4%) que recibieron la dosis de 300 mg de ASO anti-FXI, en comparación con 21 de 69 pacientes (30%) que recibieron enoxaparina. El régimen de 200 mg no fue inferior, y el régimen de 300 mg fue superior, frente a enoxaparina (P <0,001). El sangrado se produjo en tasas similares en los tres grupos, pero aunque no logró significación estadística, fue menor en los pacientes tratados con ASO anti-FXI (Tabla 1).

Todos estos datos hacen de los ASO anti-FXI una de las terapias antitrombóticas más prometedoras.



## **HIPÓTESIS**

La deficiencia de FXI, por la escasa clínica hemorrágica y por las limitaciones de los métodos empleados en su diagnóstico, podría estar subestimada y podría ser frecuente, especialmente en poblaciones con alta tasa de consanguinidad. La identificación de nuevos casos con deficiencia de FXI podría ayudar a definir nuevos mecanismos moleculares, e identificar nuevos residuos relevantes en la relación estructura-función del FXI. Por otra parte, y de acuerdo con el papel del FXI en la coagulación y los recientes resultados obtenidos en modelos animales y ensayos clínicos que provocan la deficiencia de FXI, la identificación de un número elevado de pacientes con deficiencia de FXI que tengan un extenso seguimiento clínico podría aclarar las implicaciones clínicas de este desorden.

## **OBJETIVO**

El objetivo del presente proyecto doctoral fue realizar una caracterización de la deficiencia de FXI en Yecla, una población con características geográficas que pueden facilitar una alta tasa de consanguinidad.

Los objetivos específicos fueron:

- 1) Conocer la incidencia real de la deficiencia de FXI en una población con TTPa prolongado recogidos durante un periodo de 20 años.
- 2) Estudiar la base molecular de la deficiencia de FXI en los casos identificados.
- 3) Evaluar los sistemas diagnósticos de la deficiencia de FXI.
- 4) Analizar las implicaciones clínicas de la deficiencia de FXI.



# **MATERIAL Y MÉTODOS**





## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **1. Población de estudio**

El estudio se realizó en el área de Salud del Hospital Comarcal Virgen del Castillo de Yecla. De las 324.764 pruebas de TTPa realizadas durante 20 años a 51.366 pacientes, se seleccionaron 1.700 que presentaron un TTPa prolongado, con ratio superior a 1,3. Descartados los que no se confirmaron, los anticoagulados y los que tenían anticoagulante lúpico, al resto se estudiaron los factores de la vía intrínseca. Este estudio permitió seleccionar 44 casos índices con deficiencia de FXI. El estudio también incluyó 170 familiares de los 44 casos índice, también con deficiencia de FXI.

El estudio además incluyó 450 donantes de sangre; 159 de Yecla y 300 de Murcia.

Todos los sujetos dieron su consentimiento informado para formar parte del estudio, aprobado por el comité ético del Hospital Universitario Reina Sofía de acuerdo con la declaración de Helsinki, aprobada en Edimburgo en el año 2000.

### **2. Extracción y preparación de las muestras de sangre**

Las muestras de sangre se extrajeron en tubos con citrato trisódico (1:10). Las pruebas de coagulación se realizaron en las primeras 4 horas siguientes a la extracción tras la centrifugación a 2500 rpm durante 15 minutos. Las fracciones del plasma pobre en plaquetas para los estudios moleculares se obtuvieron mediante centrifugación a 4°C durante 20 minutos a 2200g, se alicuotaron y se almacenaron a -70°C. La capa de células blancas se empleó para purificar ADN genómico mediante precipitación salina con el sistema Puregene® BloodCore Kit B (QIAGEN®) y se almacenó a -20°C.

### **3. Estudio de los niveles de Factor XI: tiempo de tromboplastina parcial activado, pruebas coagulométricas y niveles antigénicos**

#### **3.1. Tiempo de tromboplastina parcial activado**

El TTPa se determinó en un coagulómetro automático (ACL de Instrumentation Laboratory, IL) del hospital de Yecla o el Hospital Universitario Morales Meseguer

empleando diferentes agentes activadores de la ruta de contacto de la misma casa comercial: SynthASil® o SynthAFax® (Instrumentation Laboratory).

Los valores de TTPa se mostraron tanto de forma absoluta (en segundos) como relativa, en forma de ratio, que consiste en expresar el TTPa del paciente con respecto al de un plasma de referencia generado con plasmas de individuos sanos.

### **3.2. Estudio de los niveles FXI: Pruebas coagulométricas y niveles antigénicos.**

La actividad coagulante del FXI plasmático (FXI:C) se determinó en el mismo coagulómetro automático empleando un método comercial, aplicando los mismos agentes activadores de la ruta de contacto y diluyendo la muestra del paciente en un plasma deficiente de factor XI (Instrumentation Laboratory, Italia).

Los niveles antigénicos de FXI plasmático y las características electroforéticas se determinaron mediante Western Blot. La separación electroforética se llevó a cabo en gel de acrilamida con dodecil sulfatosódico (SDS) y condiciones no reductoras siguiendo el protocolo descrito por este grupo [186]. Después de la transferencia a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF), se identificó la proteína mediante el uso de un anticuerpo policlonal generado en cabra (Enzyme Research Laboratories) que detecta una banda de 160 kDa correspondiente al dímero formado por dos moléculas de factor XI unidas por puentes disulfuro. Para evitar inespecificidades se utilizó una solución de bloqueo PBS Tween 1x suplementado con 5% de leche desnatada en polvo. Tras los correspondientes lavados de membrana, se incubó con un anticuerpo secundario anti-IgG de cabra generado en ratón y acoplado a peroxidasa (A9452, Sigma-Aldrich). La señal se detectó con un sistema de quimioluminiscencia (GE™ Healthcare Amersham™ ECL™) en un equipo ImageQuant LAS4000mini (Exon Biotec, GE Healthcare).

## **4. Análisis molecular del gen *F11***

### **4.1. Amplificación de fragmentos del gen *F11* para la búsqueda del defecto molecular causante de la deficiencia de FXI**

Se realizó la amplificación de los 15 exones y zonas flanqueantes del gen *F11* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando los cebadores que se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2. Cebadores utilizados para la amplificación del gen *F11*.**

EXÓN	SECUENCIA OLIGONUCLEÓTIDOS (5'-3')	TH (°C)	TAMAÑO (pb)
1	F: CTTGGCCTTAGGAGGAATCCT	58	824
	R: GACTACTGTTACTCTTCTGTTGTTCCA		
2	F: CCCCTCTCTCCCTATTTCTTGTA	58	302
	R: TTTGAAAACCTCTGGAGCCTCA		
3	F: AACATAACGCATGCCATGTAC	50	225
	R: GTCTCCTCGATGTAGAAACAT		
4	F: GTTGACACATTCCTGTTTGTTCCT	58	391
	R: GATATGTGTACATCACAGCTGGT		
5	F: GGTACTCATGTCTTCTGCTT	52	240
	R: TCACGATTCTGTTTTTCATCG		
6	F: GCAGTTGGAAGAATAAGACAC	48	185
	R: GAATTACATCATCAAGAAGTCG		
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 obtenidos de la 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 20 minutos a 60V.

El producto de PCR se purificó para su posterior secuenciación, empleando el sistema ExoSAP-IT de Affymetrix.

#### 4.2. Reacción de secuenciación

Para llevar a cabo la reacción de secuenciación se utilizó el kit Big Dye Terminator v 3.0; Applied Biosystems, Foster City, CA. Se le adicionó 1 µl de oligonucleótido iniciador de la secuencia (normalmente un oligonucleótido empleado en la propia amplificación) y 2µl de la mezcla Big Dyes a 2µl de PCR purificada. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador realizando 25 ciclos a las condiciones que figuran en la Tabla 3.

**Tabla 3. Etapas de la reacción de secuenciación.**

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
<b>Desnaturalización</b>	96°C	10 segundos
<b>Hibridación</b>	50°C	5 segundos
<b>Extensión</b>	60°C	4 minutos

A continuación, se purificó el producto obtenido empleando el kit Performa DTR Gel filtration cartridges. El producto purificado se desnaturalizó añadiendo 10 µl de formamida.

Una vez purificado, el producto generado se analizó mediante electroforesis capilar en el equipo Hitachi 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystem). Las muestras fueron inyectadas en capilares rellenos de polímero en los que, mediante la aplicación de alto voltaje, se consigue la separación de los fragmentos por tamaño. Antes de llegar al

polo positivo, los fragmentos son alcanzados por un láser que excita los fluoróforos incorporados en cada dideoxinucleótido y la fluorescencia emitida por éstos es detectada por un dispositivo óptico. Un programa informático convierte la señal en datos digitales y estos datos crudos se visualizan como imágenes mediante el programa SeqScape.

#### **4.3. Herramientas de análisis**

Además de los programas para el diseño de cebadores (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; y <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>), en este trabajo se han empleado dos herramientas de análisis de secuencia adicionales. Las secuencias ALU, potencialmente implicadas en procesos de reordenamiento genético se han buscado en el gen del *F11* con la ayuda del software Repeat Masker (<http://www.repeatmasker.org/>).

La búsqueda de secuencias aceptoras y donadoras potencialmente implicadas en procesamiento de intrones se realizó mediante el software Human Splicing Finder (<http://umd.be/HSF3/>).

#### **4.4. Amplificación y secuenciación de regiones intrónicas para la búsqueda de haplotipos asociados con la mutación p.Cys56Arg**

La tabla 4 muestra los cebadores, así como la temperatura de hibridación y el tamaño de amplificación de las PCRs que se realizaron para determinar el haplotipo de los casos homocigotos con la mutación p.Cys56Arg, pertenecientes a dos familias no relacionadas.

**Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de diferentes regiones del gen *F11* que contienen polimorfismos informativos del haplotipo asociado con la mutación p.Cys56Arg. Las condiciones de amplificación y el tamaño del amplicón también se indican.**

Nombre	Secuencia	TH*	Tamaño #
F11 intB-F	TCACCCAAGTAGTGAACACAGC	58	357
F11 intB-R	GGTTGTTTCCACCTGTAATCC		
F11_3F	AACATAACGCATGCCATGTAC	50	225
F11_3R	GTCTCCTCGATGTAGAAACAT		
F11_5F	GGTACTCATGTCTTCTGCTT	52	240
F11_5R	TCACGATTCTGTTTTTCATCG		
F11 intE-F	GTAAGAAGGACTTAGCCA	52	369
F11 intE-R	CACATGAAGAAGGAGAGTG		
F11_8/9/10F	TGAGCTGACTTTACTTTCTCTAGGTGC	60	751
F11_8/9/10R	CCCTTCTGTGGCTATAACTGACAGT		
F11_11F	AAGATGTAGGAAGCTGCTCATC	55	208
F11_11R	ATGAACTAATAAAAAACAGCCGTG		
F11-intM-F	GATAATCGCTTGAACCTGGG	58	392
F11-intM-R	CCCCAACGCATTCCGCATTC		
F11_14F	TATGGTTATTCTACAAACGAAC	52	220
F11_14R	CAATTTGCATATATTCCATTGG		
F11_15F	GAAGCGTCTGAGTTGATCTG	52	257
F11_15R	AGCAAATCCTGGGTCCTTCA		

TH: Temperatura de hibridación.

#en pares de bases

#### 4.5. Secuenciación del gen *F11* mediante NGS.

La totalidad del gen *F11* (30019 pb) se amplificaron con 93 amplicones (Tabla 5) y se secuenciaron en un equipo PGM (Ion Torrent, Life Technologies).

**Tabla 5. Cebadores empleados para la generación de los 93 amplicones.**

<b>Amplicón</b>	<b>Cebador F</b>	<b>Cebador R</b>	<b>Tamaño (pb)</b>
1	CTTGCAAGTTGGAAGAATAAGACACTTTTC	GGTATCCTGAGTGAGATCTACTGTAATCAT	233
2	ATTGGAATGCTTAATGCGTTGGG	CTGCTTTTTAAAATGCATTAAGCGGC	374
3	AGGTGCATTATGTTTATACCGTTTTGTTTC	GCTTGAGTGACAGGAGTGAAAATAATAGAA	301
4	TTGTATAGCTAACAGGCTAACAGAAACA	CCTATTCCTCTTGGCAGTGTCTTCT	352
5	TGTCTCCTAAAACATCTGAGAGTGGAT	CAAGAAATCAGTGCATGGTAAAATGAAGA	244
6	TGTCACCACATAGCTTTCAATCTGT	TGCTCAATAAATATTTTCCATGGCCAGA	373
7	CTGCCTATGTGAACACATTTCTTTTGT	TCACAGCAGCAGCTTGTCTTAG	352
8	CATATGCCTGCCTTCAAAGGA	TACATGACTTGACAGGGCAGAAAAG	158
9	AGGTCAGCTAGAATTAATGGTTAACAGC	GCTGCAATTCTAATAAGGGTGCTTTT	373
10	AGTAAACATGTGAGTGTAGGTATCTTTGTG	GCTCTTTCTGTTCTGGTTCAATTATTTT	223
11	TGTCTGATTTAGCTTTGTAGAGATGTTCC	GATACATTAATCGATTGTCTTGGTCACCTA	256
12	GGCTTCTGCAGAGCTGTAAGAG	GGCATAAATGGTGTGGGATTCTC	365
13	ATCTTGATTTGCCTCACTAATTAGTTGGT	GCTATTTTTCTAAAGGAATGCTTCAGCTTT	299
14	CAGCTCATAATTTCAATTTTCTCTGTGACA	GCAAATGTTGTATACTGTGTTGTTTCG	307
15	AGCCAATCCCTCATAGATATCAAGGAAT	CCTAAAATTTGTTGAGCCTGTTTCAGA	126
16	CAACTTAAGTGCTAAGAAATTAGAAGGCA	GGTGTCAAGATTACCCTGACCTTATAAAAT	134
17	GGAAAGCAGGAACTCACACAGATATA	GTCTTGATGAAATTGACTACCCTAAGTACC	295
18	GTTGCACAGCAATGTAATACCCTTAG	TCCAGTCAAGAGTAAATGGAAAATATGGG	350
19	CGTCAATATACAACAGCAAGCACTT	TCAATATGCCACTAGATGGGAGGAT	370
20	CGCATGTGCACATGAGAGAGA	TGTTCTATATTTAATAATGCGGAGTGGGC	343
21	CCACCTGAGGCTGTTCAATCAATA	GTCTCCTCGATGTAGAAACATAAGCATTTA	370
22	AAACATTTCACTTTGCTTTTCTATCGAT	GGATAGTGCATGCTGAAGTATTTAGGG	287
23	CTTACCAAGAGTCACTCACTGCAT	CCTGCTCTAGTTCTGGAATAGTAAATTTT	215
24	CCCTCCAACACTGTAAAACCT	GAAAATGAACAAATTAGCTGGGAATGTTG	291
25	GCCAGTCGAAATCTTTATTAACGT	GGCAATGACCTAAGCAACTGTC	337
26	CATTTCGAGTGGTCGATGAAAAACAG	AAGGGCACTGACAATCATACCAAT	293
27	AAGTCATTAAGTAAGAAGGACTTAGCC	TGACTTCTCAAGCCCTTCTCATTTTT	351
28	TCAGAAACAGCATGGAAAATTTCTTTGATT	GGAATAGCAAGCTGGGCATAGT	374
29	TAAGTCAGCTTTAAAACCTGGCTTGTA	CTCTCATCTCCACTCTGGTCCAATA	358
30	TGACACATTTATACACCTGGCATTCT	GGTCTCATTAGGAAATGCCAGTTGT	365
31	GTTACAATAAAAATCCAACCAGCAGTGT	GCAGATAATCTGACACAGAATGTTTTTGTG	346
32	TCGGCACCATTCTGTTGTCTTT	ACGCAGCTATTCCTTTTACATTAG	372
33	CCTTTATGACGTTCCACCTT	AGGATGAGAGAAGGAGTTCCGGAA	177
34	AATTTAGGACCCACACAGATGTT	CTTGTTGACAGTTTGGGATTCTCTG	374
35	GCTGGAGTTTCTCATTCACTGGA	CCTGAGTTACAGAGACTTTATAATCAAGCT	280
36	CTCCATCATTGGAAACCAGTGGAT	TATGCTCTTGCAAGGAATAACATGAAG	329
37	GCGTGTGTGTTTAAATACAGAAAGTGG	ACCTAAGTAAGGAATCCAATGTGAGGA	374
38	GAGTTCCCGTTACCTGTACAT	CATTGTGAAGTGTGTGGCTGTTAATT	359
39	GAATTTTATCCGGAAAGTTGTCTCCAATG	ATCCAACCTCACTTTGATCCTGCA	368
40	AGCACTTTTCAAGTAAATGTTCTAGCCT	GGTGGTGGTTGGGTACCTATAATC	372
41	CCCTCTGTCTGCAAAACAAT	TGCTCAAACAACTACAACGATCATAGAA	352
42	CTCATGTAAAAGTCTTATCCTGCTCCAT	TGCTTTCTGTTCACTCTCTTTGT	316

43	CCGTCGCGCAGCTTGATTA	AAAAAGAGTCCTCGGTAATGTTGG	367
44	TGGGCTTTCAGTGTAGCCAAATA	CTAAATAAAGTGTACACAGGCACAGAGA	140
45	AGTCAAATTCAGAAGAGAGGTTTATGTGG	CTGCACCCAGCCAGTTTTATTTAAT	367
46	TAAATAAAACTAAAAATTCACCTTCCCAGCTG	TTGCTCTATTGTCAGTCTTCTAGTATCT	373
47	ATATATGTGGCCCAGCACCAC	TCGTTTGTAGAATAACCATACACAATACATA	373
48	ATGTTTATGTGTATTGTGTATGGTTATTCTACA	CCCAACGCATTAAGCATTCCA	256
49	AAAAATGAGAAGGGCTTGAGAAGTCA	TGTGCTTCAGTAGACAAATGTTACTGAATA	299
50	GCTGATGGAGATAGGGAGCATG	AAAAATCACACTTGATGAATTGTATAGTTGTT	333
51	CTGGGAGTGTTGAAAGGAAGGAA	AGAAAGAGCTTTGCTCTTTTTAATGCG	374
52	GAAAACAAAGTGCACAAGTTGTTATGTC	TTCTGAAAATCTGCCATTAATGCAATCAA	372
53	TCACAAAAGAACAAATACTGTGGGATCT	CCATGTAGCCATCTTGAGTGTACA	253
54	CTACATTCACAGGCATTTATGTAGCAC	GGACCTGTTGGTAAAAATGCAACC	268
55	TCATTAGAGGAGGATGAAGACCAT	GTTGTTCCACATTTCTCTCAGATTAGTTA	277
56	GCACTCTGTTTAAATGCTTACTGGAGAT	GAGCATTCTTAGTGTGACTGTGT	368
57	AGAGGGAAATCACACTGCAATCTC	GTGTGTATGTTCCATTGAAGTACTG	315
58	AGGTATTGTTTAGTTCCATGACCATTCTT	TGTAGTTATTGGGTCCAGTGTTCAAAAAT	367
59	GTTCCACATCCATGGATTTAAACAACAT	TTCCATGTGCATGTATAAAGGACCTAAAT	346
60	GTATTTATAATCACCGTGAATGGGAGCTA	GTGTGTCTCCATTTAATTAATTTCTGCGA	359
61	ACACATATTTGAGAGGTCAACATAACCC	GTTAGTGTGAATAATGCTGCTATGAGATG	374
62	CTTTCCAAGGGATTGAGAATAGGA	AGTGTGAGTAAAAACTAGTTCATCTGCTTT	299
63	ACAGCCTCCAACAGGTAATTTTTCAA	TACTAGCTGGGCATGGTTGTTTC	353
64	GGGTGAGGATGTGTGTTATCACA	TGAATTTGGAAATCAAGGCAATAAACACTT	355
65	GCGGAATCACCATCTGAGGATC	AGAAGTTCAGTTTGTGAGAAGCA	372
66	ACCACAAAACCGCAATGTTTG	GGTGGACTGTTTAAAAATGTTTTAAACCTGA	291
67	AAAAACAGGTTTACTTGTGTCCTGAAA	GGGAAGTGAGGTAGTAAGATATGTCTTTCT	343
68	TTCCCAGCCTAAAATCTTAAATGAAAGTCT	CACTTCAACCTTTATATTTGCTCCTTTCAA	370
69	AGGTGGGTGAAAAAGTTGAAAGGAT	GCATAAAGTTGATGGCAAAAGCTTTTTAGT	344
70	CGCTACACTTTTAAATTGGCACTTTTG	TCTGTTGATTCCAGATAAATGCAGTTTACT	374
71	TCATGACAACATAAAGACAATTCAGTCCA	AGGGACAGCAACCTTAGCTAGT	279
72	ACTATGCCAGCTTGCTATTCC	TGAGGGCTCTGAGAGTTCCAAT	127
73	GGGATACCATTTAGTGAATAAATCGACA	AGTATCAGCTGTATATTGGTGACACCTA	366
74	AGAAGGGAGAACATTCAGGAAATAACAA	TCTACAACAAATTAGCCGAGTGTGT	374
75	ACACTCCTGTTATCAAGGCCAGTA	TGACTATGCTCAGAAATTGGCCA	342
76	GAAGTAACAATCCTGCCTCGTGAT	GCTAAGTGTCCCTTCTAACGCTT	359
77	TAAGTAGTTTTTACTGCGCTGTATTTGAT	ATTCATTTTGGAGGGCCATCTATTCT	366
78	CGTTCTCACCTCAGTTGCTGTTAG	CCTGTGTAGCTTTCAAATGCAGAT	374
79	CCTGAGTCAAAGTCCCTGAAAAGT	CGTGTTAGAAATGCACATTCTTCAGC	331
80	AGTCAATTCATTTTTCATGTGCATGT	GGTACTGACCCATAGAAAACAGTGAG	358
81	CTTCCATTTAACCGCATTCAACA	GTGCTACAGGCACACAAAACCCAT	354
82	ATAAAATACAGAACGAGTTCGGTATGCA	TGACAGAAACTAGGCTTCTGCTAC	318
83	TACCTAAATGTCCATCATTGGCAGAAA	GGCCGTAAGTCTAGTAGTGTAAACATTTT	373
84	GGGATGAAGGATTGAAGGTTAGAACAAT	CAGTCACCCAGCAATCAGTGTATATT	358
85	TGTTGTTATATGTGCTCCATCCTAGAAAATG	CTAACTGGAATGACTTCCAAGAAAAGT	303
86	GCCGCTTAATGCATTTTAAAAAGC	GCTCGTGATGCCTACCAGAT	309
87	GCGTTTTAACATTGGATTTTAAACATTCTGC	GCGCCTGGCTAAGTCCTTC	287
88	TCGACTTCTTGATGATGTAATTCACCCAT	CTGTCTGCAAACACCGTATTAGG	369
89	ATGGGACACCACGCCAGTAAT	TGAGGCAGGAGAAATTATCTAATGGGA	315



90	CAACTCTCTGAGTCTCCAATAGCTT	GGTACATAGCCAAAGGAAAAGAAAGAAAA	366
91	TTTATTTAAATTAATAAACTGGCTGGGTGCA	CACTTGAAATGTGGCTAACACAGC	370
92	CTGACATGTGGTCTGCTGTCTAG	GTTTGAAGAAAGCTTTAAGTAACACTTGC	304
93	AGACATGAGTTTTGTGTTGTTGTTGTTT	GTGGTGCTGGGCCACATATA	347

pb: pares de bases

### 5. Genotipado de alteraciones genéticas mediante sondas.

La tabla 6 muestra las alteraciones genéticas que en este estudio se genotiparon empleando un equipo de PCR en tiempo real (Sistema LightCycler<sup>®</sup> 480, Roche). Todas las sondas Taqman<sup>®</sup> fueron de Applied-Biosystem, Life Technologies. Las sondas de diseño propio fueron sintetizadas por Sigma-Aldrich (St Louis, MO).

En todos los casos, el reactivo empleado para el genotipado fue Premix Ex Taq<sup>™</sup> (Probe qPCR) de Takara Bio inc.

**Tabla 6. Alteraciones genéticas genotipadas con diferentes sondas.**

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]GACACCTGTGTGGAGGCT[BHQ1]3´ 5´[HEX]GACACCTGTATGGAGGCT[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

### 6. Análisis de grandes deleciones o inserciones en el gen *F11* mediante "Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification" (MLPA)

Para el paciente en el que no se detectaron ninguna alteración genética en los exones y/o regiones flanqueantes del gen *F11* mediante secuenciación de Sanger o NGS, se procedió a analizar grandes alteraciones genéticas mediante MLPA. Para ello se empleó el kit Salsa MLPA P440 F10+F11 probemix (MRC Holland, Amsterdam, Netherlands) que evalúa conjuntamente todos los exones de dos genes: *F10* y *F11*. Para el análisis de datos se utilizó el soporte informático Coffalyser.Net.

## **7. Confirmación de la inserción mediante PCR**

La validación de la inserción de 1653 pb que incluye al exón 8 y 9 del *F11* detectada mediante MLPA y NGS se realizó empleando los oligonucleótidos 4F y 5R (Tabla 1) con el objetivo de realizar una amplificación extensa (desde el inicio del exón 4 hasta el final del exón 5). Para ello, en la PCR se emplea una Taq polimerasa estándar y una ADN polimerasa con actividad exonucleasa 3'→5' (Herculase Enhanced DNA Polymerase, Agilent Technologies) con la que se consigue mayor rendimiento con una menor tasa de error. Las condiciones de amplificación son las mismas que las descritas previamente con la peculiaridad de que se aumenta el tiempo de extensión a 3 minutos y el de extensión final a 6 minutos.

El producto de esta PCR se secuencia por el método de Sanger empleando el oligonucleótido de secuencia F: 5'-GCCTCGGCCTTCCAGAGT-3' para la región de la inserción aguas arriba y los oligonucleótidos 8-9-10 F (Tabla 2) y un oligonucleótido específico del exón 9: 9-intF GTCACGAGGCCTGCCAGAA para la región aguas abajo.

## **8. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó usando el paquete de software SPSS. En cuanto al manejo de las variables continuas se comprobó la normalidad de su distribución mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Si la distribución de los datos es normal, la mayoría en nuestro estudio, los datos se presentan como media  $\pm$  desviación estándar. Si la variable continua tiene distribución no normal, se expresan como

mediana (P25-P75). Posteriormente hemos hecho un estudio analítico para comparar los resultados de los grupos a estudio. Para variables cualitativas por variables continuas con “n” (sujetos a estudio) > 30 y distribución normal se han usado test paramétricos, esto es, se ha obtenido la t de student si la variable cualitativa es dicotómica o la ANOVA si la variable cualitativa presenta más de dos categorías. Para variables cualitativas por variables continuas con  $n < 30$  o distribución no considerada normal se han aplicado test no paramétricos, como el test de U-Mann Whitney, si se trata de muestras independientes de sujetos, o test de Wilcoxon, en el caso de que se trate de la misma muestra de sujetos a la que se aplica diferentes pruebas. Para variables cualitativas por variables cualitativas con  $n > 30$  o distribución normal se ha aplicado el test de Chi-cuadrado ( $X^2$ ).

Se han considerado significativas desde el punto de vista estadístico las diferencias resultantes de los test comparativos cuando el valor de la “p bilateral” es inferior a 0.05.



# **RESULTADOS**



## **RESULTADOS**

### **Población de estudio e identificación de los pacientes con deficiencia de FXI.**

El estudio se realizó en el área de Salud del Hospital Comarcal Virgen del Castillo de Yecla, área que engloba una población de unos 60.000 habitantes (Principalmente de Yecla y Jumilla).

En 20 años (1995-2014) se realizaron 324.764 pruebas de TTPa a 51.366 pacientes. Los estudios se realizaron en plasma citratado de una muestra recién extraída al paciente. Para realizar los TTPa en un primer momento se utilizó como reactivo activador de la ruta de contacto SynthAFax (Instrumentation Laboratory, Italia). Este reactivo contiene cefalina de cerebro bovino como fuente de fosfolípidos, y ácido elágico como agente activador del FXII. Desde 2012 en adelante, el reactivo empleado fue SynthASil (Instrumentation Laboratory, Italia), en el que se emplea una mezcla de fosfolípidos sintéticos y sílica micronizada como activador del FXII. En todos los casos se empleó el plasma de calibración Hemosil y cloruro cálcico 0.02 M (Instrumentation Laboratory, Italia). Los ensayos se realizaron en primer lugar en un coagulómetro automático ACL 6000 y posteriormente en ACL Advance y en ACL TOP 500 (Instrumentation Laboratory, Italia).

Del total de pacientes analizados, se seleccionaron 1.700 que presentaron un TTPa prolongado, con ratio superior a 1,3. Descartados los que no se confirmaron, los anticoagulados y los que tenían anticoagulante lúpico, al resto les realizamos estudio de los factores de la vía intrínseca con plasmas deficientes (Instrumentation Laboratory, Italia), empleando los sistemas de activación y coagulómetros automáticos indicados anteriormente. Este estudio mostró que 44 casos presentaban un potencial déficit de FXI (Tabla 7). La forma de sustentar dicha deficiencia fue realizar una segunda determinación del FXI:C que confirmara la deficiencia (valores de FXI:C < 70%). Además, en la mayoría de los casos (N= 41), también se realizaron estudios familiares que permitieron identificar al menos un familiar que también presentaba deficiencia de FXI.

**Tabla 7. Características demográficas, genéticas y analíticas del los 44 casos índices incluidos en este estudio.**

<u>Caso</u>	<u>Edad</u>	<u>Sexo</u>	<u>TTPa r</u>	<u>FXI:C</u>	<u>Defecto genético en F11. Estatus</u>	<u>Tipo def</u>
P1	52	V	3.19	1	CM020681 (p.Cys56Arg)	CRM-
<b>Homocigosis</b>						
P2	45	M	1.91	3	CM020681 (p.Cys56Arg)	CRM-
<b>Homocigosis</b>						
P3	71	M	2.99	2	CM020681 (p.Cys56Arg)	CRM-
					CM053240 (p.Cys416Tyr)	
<b>Heterocigosis compuesta</b>						
P4	53	M	1.30	41	CM020681 (p.Cys56Arg)	CRM-
Heterocigosis						
P5	41	V	1.30	36	CM020681 (p.Cys56Arg)	CRM-
Heterocigosis						
P6	52	V	1.35	30	CM020681 (p.Cys56Arg)	CRM-
Heterocigosis						
P7	47	V	1.55	38	CM020681 (p.Cys56Arg)	CRM-
Heterocigosis						
P8	43	V	1.36	41	CM020681 (p.Cys56Arg)	CRM-
Heterocigosis						
P9	63	M	1.30	42	CM020681 (p.Cys56Arg)	CRM-
Heterocigosis						
P10	51	V	1.33	40	CM020681 (p.Cys56Arg)	CRM-
Heterocigosis						
P11	40	M	1.36	44	CM020681 (p.Cys56Arg)	CRM-
Heterocigosis						
P12	57	V	1.30	44	CM020681 (p.Cys56Arg)	CRM-



Heterocigosis						
P13	53	M	1.30	41	CM020681 (p.Cys56Arg)	CRM-
Heterocigosis						
P14	44	M	1.32	37	CM020681 (p.Cys56Arg)	CRM-
Heterocigosis						
P15	47	V	1.41	37	CM020681 (p.Cys56Arg)	CRM-
Heterocigosis						
P16	32	M	1.36	34	CM020681 (p.Cys56Arg)	CRM-
Heterocigosis						
P17	79	V	1.31	28	CM020681 (p.Cys56Arg)	CRM-
Heterocigosis						
P18	58	M	1.50	42	CM020681 (p.Cys56Arg)	CRM-
Heterocigosis						
P19	42	V	1.37	49	CM020681 (p.Cys56Arg)	CRM-
Heterocigosis						
P20	68	V	1.30	40	CM020681 (p.Cys56Arg)	CRM-
Heterocigosis						
P21	49	V	1.42	68	CM020681 (p.Cys56Arg)	CRM-
Heterocigosis						
P22	52	V	1.43	58	CM020681 (p.Cys56Arg)	CRM-
Heterocigosis						
P23	59	M	1.45	42	CM020681 (p.Cys56Arg)	CRM-
Heterocigosis						
P24	25	V	1.62	28	CM053240 (p.Cys416Tyr)	CRM-
Heterocigosis						
P25	50	M	1.50	22	CM053240 (p.Cys416Tyr)	CRM-
Heterocigosis						
P26	43	V	1.33	34	CM053240 (p.Cys416Tyr)	CRM-

Heterocigosis						
P27	32	M	1.49	26	CM053240 (p.Cys416Tyr)	CRM-
Heterocigosis						
P28	80	M	1.65	37	CM053240 (p.Cys416Tyr)	CRM-
Heterocigosis						
P29	38	V	1.31	33	CM053240 (p.Cys416Tyr)	CRM-
Heterocigosis						
P30	47	M	2.36	3	CM002953 (p.Lys536Asn)	CRM- & CRM+
<b><u>Nueva mutación</u></b> (p.Cys599Tyr)						
<b>Heterocigosis compuesta</b>						
P31	71	V	1.49	20	CM051916 (p.Pro538Leu)	CRM+
<b>Homocigosis</b>						
P32	88	M	1.35	59	CM051916 (p.Pro538Leu)	CRM+
Heterocigosis						
P33	26	M	1.36	30	CM051917 (p.Glu565Lys)	CRM-
Heterocigosis						
P34	44	M	1.39	41	CM051917 (p.Glu565Lys)	CRM-
Heterocigosis						
P35	49	M	1.32	36	CM051917 (p.Glu565Lys)	CRM-
Heterocigosis						
P36	32	V	1.30	45	CM051917 (p.Glu565Lys)	CRM-
Heterocigosis						
P37	55	M	1.34	32	CM051917 (p.Glu565Lys)	CRM-
Heterocigosis						
P38	72	M	1.48	63	CM051917 (p.Glu565Lys)	CRM-
Heterocigosis						
P39	25	V	1.56	28	<b><u>Nueva mutación</u></b> (p.Ile426Thr)	CRM-
Heterocigosis						

P40	42	V	1.35	47	CM950373 (p.Thr322Ile)	CRM-
Heterocigosis						
P41	60	V	1.45	37	CS081910 (c.325G>A)	CRM-
Heterocigosis						
P42	69	M	1.49	35	CM035499 (p.Arg268Cys)	CRM-
Heterocigosis						
P43	53	V	1.32	43	<b><u>Nueva mutación</u></b> (p.Ile592Thr)	CRM-
Heterocigosis						
P44	32	V	1.51	45	<b><u>Nueva alteración</u></b> (Inserción 1653 pb exones 8 & 9)	CRM-
Heterocigosis						

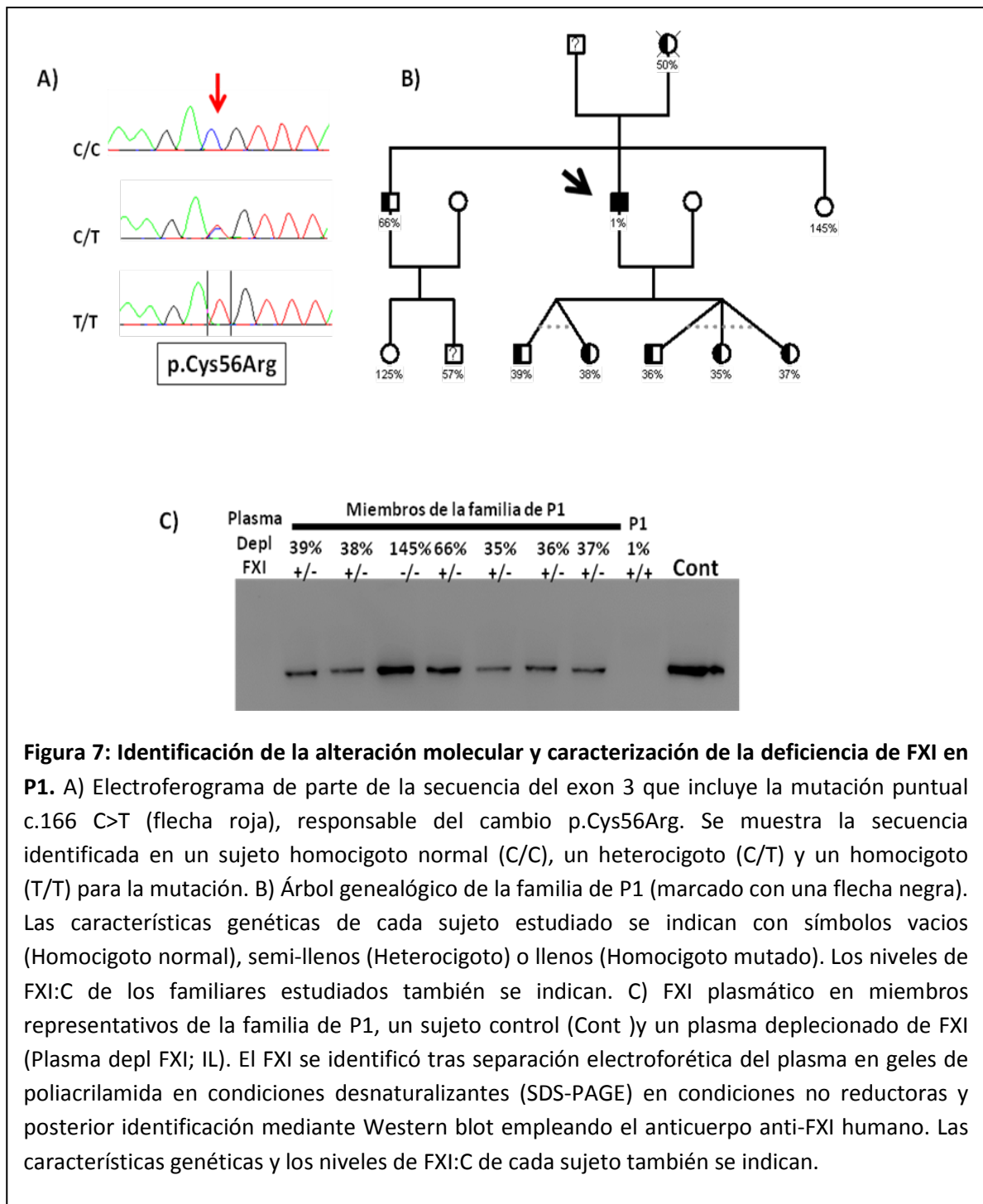
TTPa r: TTPa ratio. V: Varón. M: Mujer. Def: Deficiencia

### **Caracterización molecular de la deficiencia de FXI en nuestra serie.**

El estudio molecular de la serie se inició en un caso índice con deficiencia severa de FXI, **P1** (FXI:C: 1%). Para ello, los 15 exones y regiones flanqueantes del gen *F11* se amplificaron en 13 amplicones. Los productos de PCR se secuenciaron, comparándose los resultados con la secuencia de referencia. El estudio objetivó la presencia de una mutación puntual en homocigosis, en el exón 3, c.166 T>C, responsable del cambio p.Cys56Arg (p.Cys38Arg en la proteína madura una vez eliminado el péptido señal de 18 aminoácidos). La validación de este resultado se realizó con dos aproximaciones. En primer lugar, la mutación se verificó en una nueva amplificación y secuenciación del exón 3 del paciente, y en segundo lugar, se identificó la misma mutación en familiares con moderada reducción de los niveles de FXI en plasma (Figura 7). Esta mutación ha sido previamente descrita asociada a la deficiencia de FXI (CM020681) [102].

Como se describe en el trabajo que identificó esta mutación, los portadores presentan reducidos niveles de FXI circulante (Figura 7). De hecho, el residuo mutado se localiza en el dominio Ap1 y está implicado en la formación del puente disulfuro Cys50-Cys56, uno de los tres puentes disulfuro conservados que son responsables del correcto plegamiento de los dominios Ap. Por ello, la proteína mutada se sintetiza en células

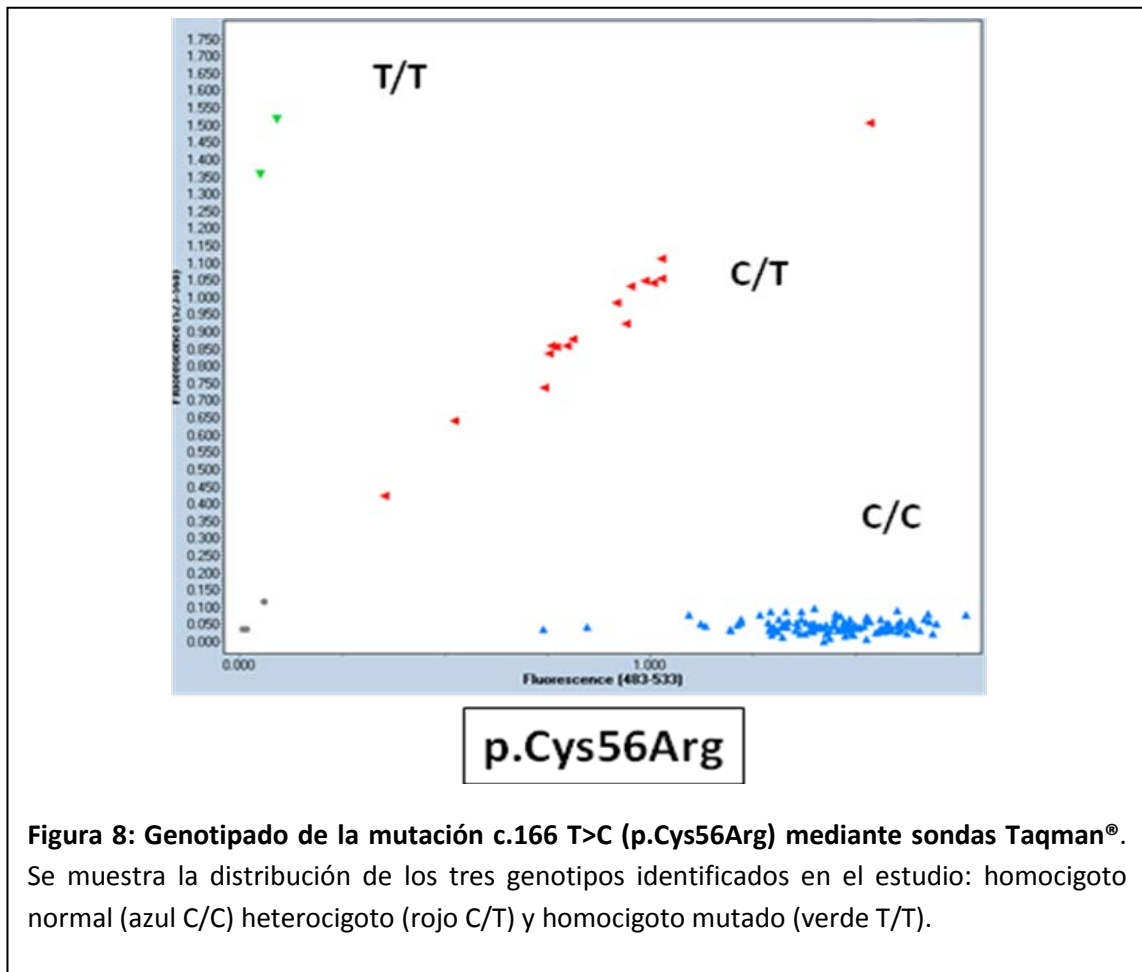
BHK pero no se secreta [102]. Todos estos datos confirman que esta mutación provoque una deficiencia CRM-.



El hecho de que esta mutación haya sido descrita previamente en alta frecuencia en otra población (Vasco-Francesa) [102], y el haberla identificado en homocigosis en uno de los pacientes de nuestra serie, nos llevó a plantear que la mutación p.Cys56Arg

podiera ser frecuente en nuestra población de estudio. Para comprobar esta hipótesis, diseñamos sondas Taqman® que permitieran el genotipado rápido y económico de la mutación p.Cys56Arg.

Como se muestra en la Figura 8, este ensayo permitía genotipar de forma correcta esta mutación en los miembros de la familia de P1.



**Figura 8: Genotipado de la mutación c.166 T>C (p.Cys56Arg) mediante sondas Taqman®.** Se muestra la distribución de los tres genotipos identificados en el estudio: homocigoto normal (azul C/C) heterocigoto (rojo C/T) y homocigoto mutado (verde T/T).

Con este método, se genotiparon los 43 casos índices del resto de las familias con deficiencia de FXI. Así, se identificó la mutación c.166 T>C (p.Cys56Arg) en 22 casos adicionales (**P2-P23**), incluyendo un segundo paciente con deficiencia severa P2, en el que la mutación también se encontraba en homocigosis (Tabla 7).

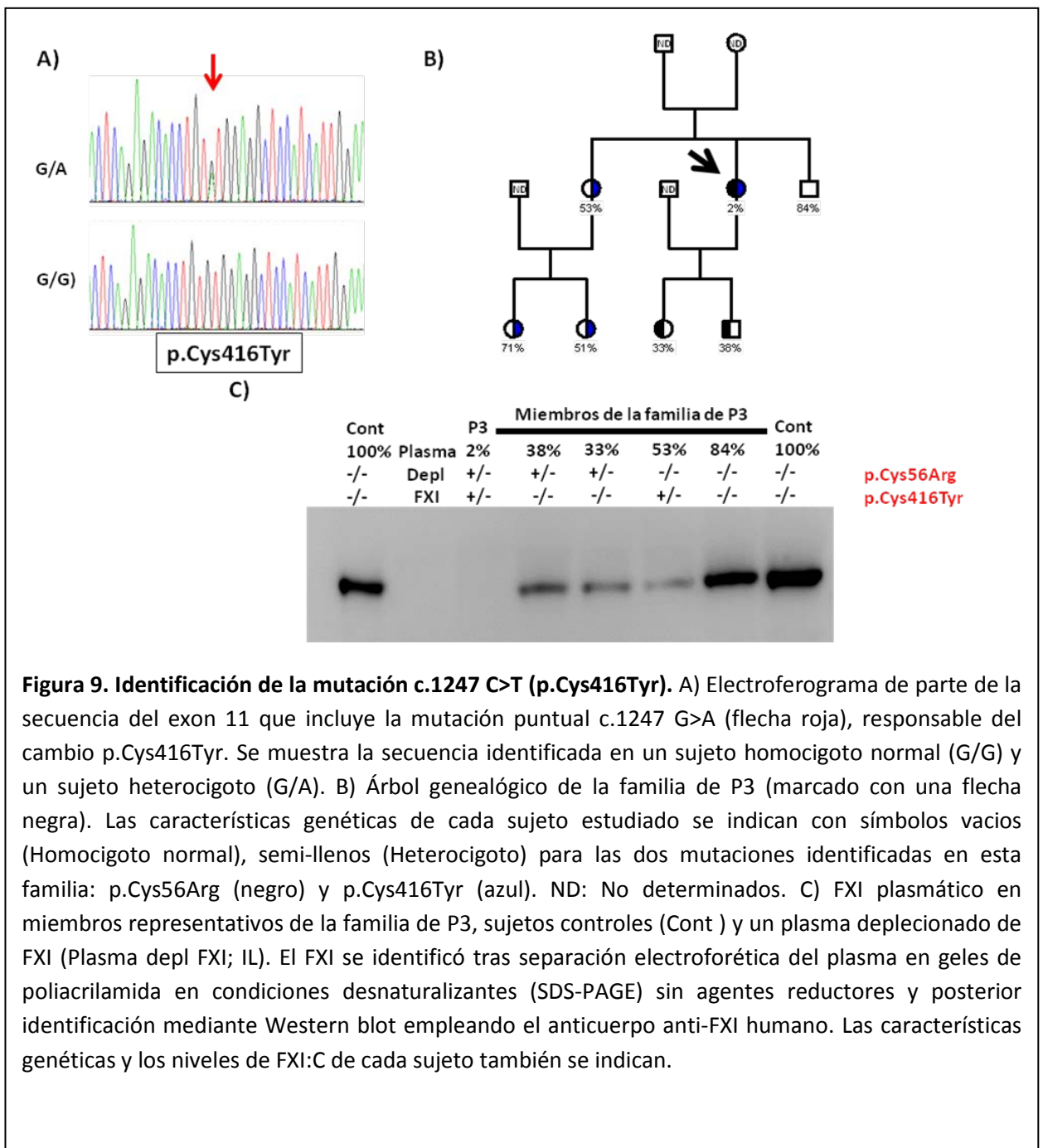
En todos los casos, la mutación del caso índice fue verificada mediante secuenciación y validada en la mayor parte de los casos en estudios familiares, encontrando un tercer

caso homocigoto para esta mutación con deficiencia severa de FXI, hermano de P2 (Tabla 8).

**Tabla 8.** Número de portadores de cada una de las alteraciones del *F11* identificadas en nuestro estudio. La variabilidad analítica en la ratio del TTPa (TTPa r) y el FXI:C de cada grupo de sujetos también se indica.

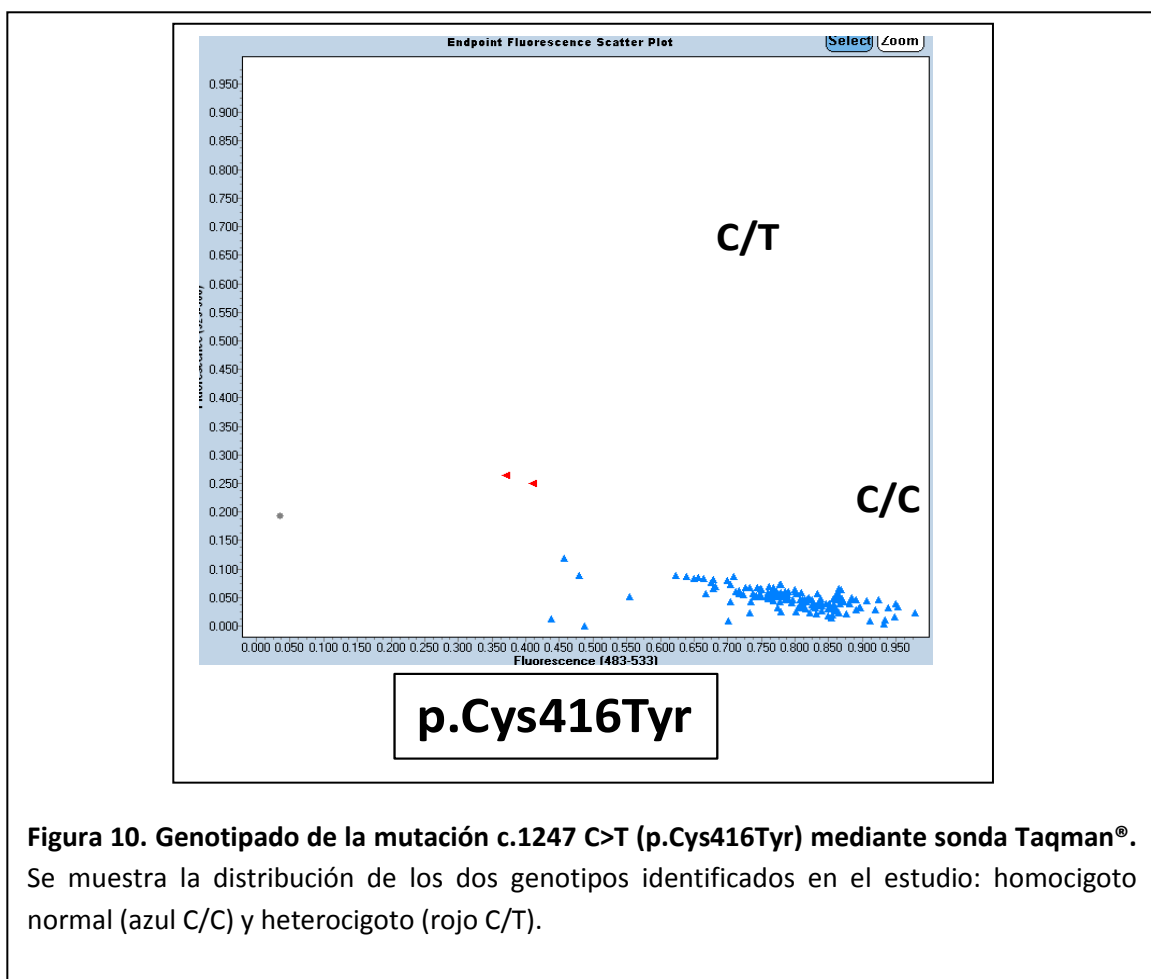
<i>Alteración F11</i>	<b>Estatus genético</b>	<b>N</b>	<b>Familias</b>	<b>TTPa r Media±DE (rango)</b>	<b>FXI:c Media±DE (rango)</b>
<b>p.C56R</b>	<b>Homocigosis</b>	3	2	2.50±0.65 (1.91-3.19)	2.3±1.2 (1-3)
	Heterocigosis	105	23	1.35±0.12 (1.10-1.73)	42.1±10.1 (21-68)
<b>p.C416Y</b>	Heterocigosis	19	7	1.37±0.15 (1.01-1.65)	39.7±14.4 (22-72)
<b>p.C56R &amp; p.C416Y</b>	<b>Heterocigosis compuesta</b>	1	1	2.99	2
<b>p.E565K</b>	Heterocigosis	27	6	1.37±0.13 (1.11-1.66)	46.6±13.9 (28-95)
<b>p.P538L</b>	<b>Homocigosis</b>	4	1	1.59±0.15 (1.49-1.81)	17±5.5 (11-23)
	Heterocigosis	32	2	1.31±0.12 (1.00-1.58)	51.6±9.1 (34-67)
<b>p.K536N &amp; p.C599Y</b>	<b>Heterocigosis compuesta</b>	2	1	2.38±0.03 (2.36-2.40)	2.5±0.7 (2-3)
<b>p.K536N</b>	Heterocigosis	1	1	1.32	22
<b>p.C599Y</b>	Heterocigosis	1	1	1.14	47
<b>p.T322I</b>	Heterocigosis	3	1	1.27±0.08 (1.20-1.35)	58.3±10.0 (47-66)
<b>p.R268C</b>	Heterocigosis	2	1	1.48±0.01 (1.47-1.49)	37.8±4.0 (35-41)
<b>CS081910</b>	Heterocigosis	4	1	1.37±0.07(1.31-1.45)	50.0±10.9 (37-59)
<b>p.I426T</b>	Heterocigosis	4	1	1.42±0.14 (1.24-1.56)	32.3±4.8 (28-39)
<b>p.I592T</b>	Heterocigosis	1	1	1.32	43
<b>Duplicación</b>	Heterocigosis	5	1	1.44±0.09 (1.35-1.55)	44.3±4.2 (40-50)

Destacamos que el paciente **P3**, también con deficiencia severa de FXI (2%), presentaba la mutación c.166 T>C (p.Cys56Arg) en heterocigosis, lo que sugería la existencia de una segunda mutación en heterocigosis compuesta. La búsqueda de esta segunda mutación se abordó de nuevo mediante secuenciación del resto del gen. Este estudio identificó una segunda mutación, también en heterocigosis en el exón 11, el cambio c.1247 G>A, responsable de la sustitución p.Cys416Tyr (Figura 9). La mutación fue validada en estudios familiares, identificándose en heterocigosis en tres familiares (Figura 9).



**Figura 9. Identificación de la mutación c.1247 C>T (p.Cys416Tyr).** A) Electroferograma de parte de la secuencia del exón 11 que incluye la mutación puntual c.1247 G>A (flecha roja), responsable del cambio p.Cys416Tyr. Se muestra la secuencia identificada en un sujeto homocigoto normal (G/G) y un sujeto heterocigoto (G/A). B) Árbol genealógico de la familia de P3 (marcado con una flecha negra). Las características genéticas de cada sujeto estudiado se indican con símbolos vacíos (Homocigoto normal), semi-llenos (Heterocigoto) para las dos mutaciones identificadas en esta familia: p.Cys56Arg (negro) y p.Cys416Tyr (azul). ND: No determinados. C) FXI plasmático en miembros representativos de la familia de P3, sujetos controles (Cont ) y un plasma deplecionado de FXI (Plasma depl FXI; IL). El FXI se identificó tras separación electroforética del plasma en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) sin agentes reductores y posterior identificación mediante Western blot empleando el anticuerpo anti-FXI humano. Las características genéticas y los niveles de FXI:C de cada sujeto también se indican.

Esta mutación, p.Cys416Tyr, ya había sido descrita en 9 pacientes con deficiencia de FXI, dos de ellos portugueses (CM053240): dos homocigotos, dos heterocigotos compuestos y 5 heterocigotos [1]. El cambio p.Cys416Tyr afecta a otro puente disulfuro (el que une Cys416 y Cys432) [83] y parece que permite la formación de dímeros intracelulares, aunque estos tienen una secreción reducida. Por ello esta mutación tiene un efecto dominante negativo sobre la secreción de la proteína silvestre [83], lo que justificaría el tipo CRM- que también observamos en la familia afectada (Figura 9). Como la familia que presentaba esta mutación tenía un apellido que era relativamente frecuente en los casos restantes con deficiencia de FXI, decidimos desarrollar de nuevo un método de genotipado del cambio c.1247 G>A (p.Cys416Tyr) basado en sondas Taqman®. Como se observa en la Figura 10, este método conseguía genotipar de forma correcta esta mutación.



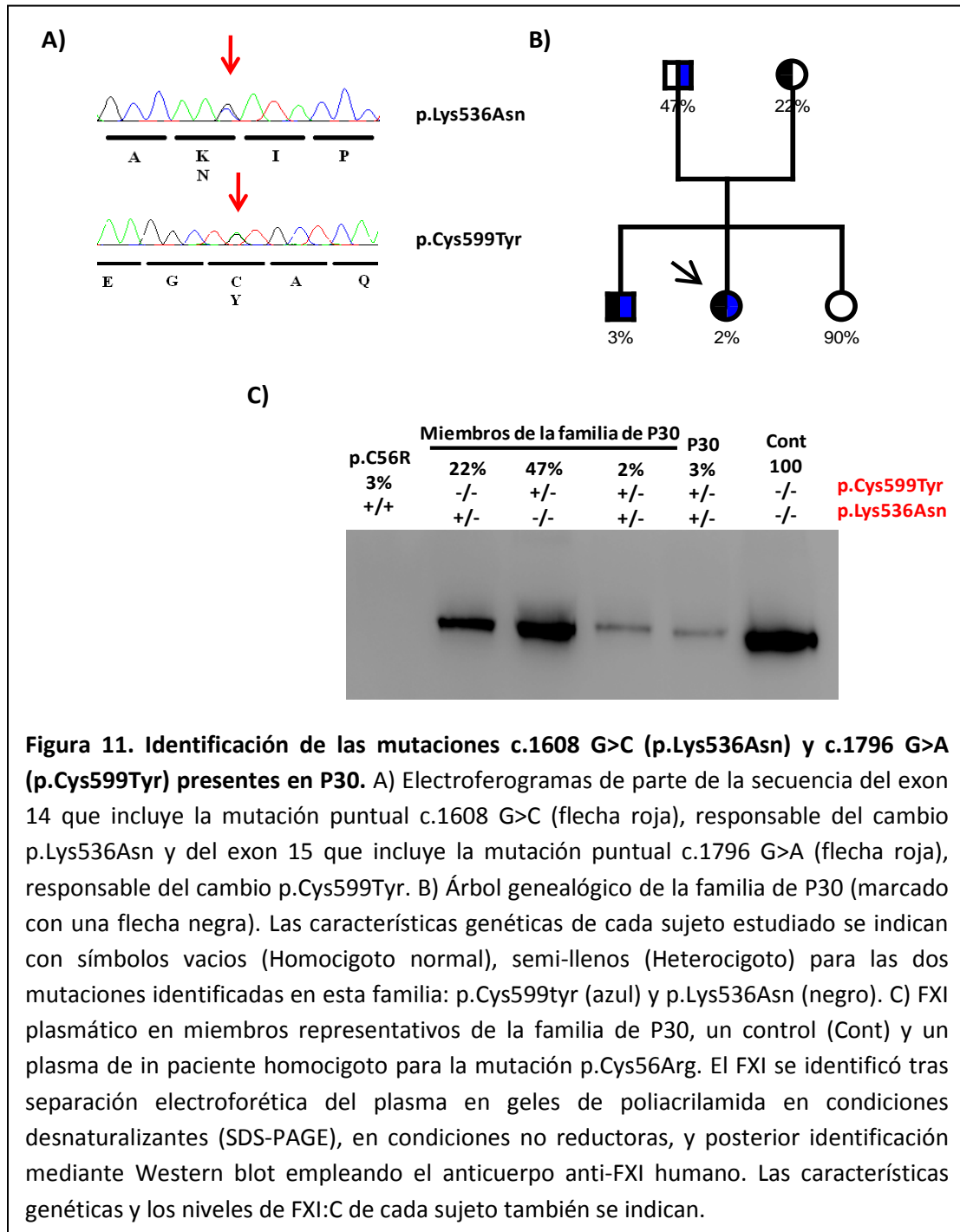
**Figura 10. Genotipado de la mutación c.1247 C>T (p.Cys416Tyr) mediante sonda Taqman®.** Se muestra la distribución de los dos genotipos identificados en el estudio: homocigoto normal (azul C/C) y heterocigoto (rojo C/T).



Aplicando este método a los 21 casos restantes, con deficiencia de FXI en los que no se había descrito la mutación p.Cys56Arg, descubrimos que 6 pacientes (**P24-P29**) presentaban la mutación p.Cys416Tyr en heterocigosis, todos con deficiencia moderada de FXI (Tabla 1).

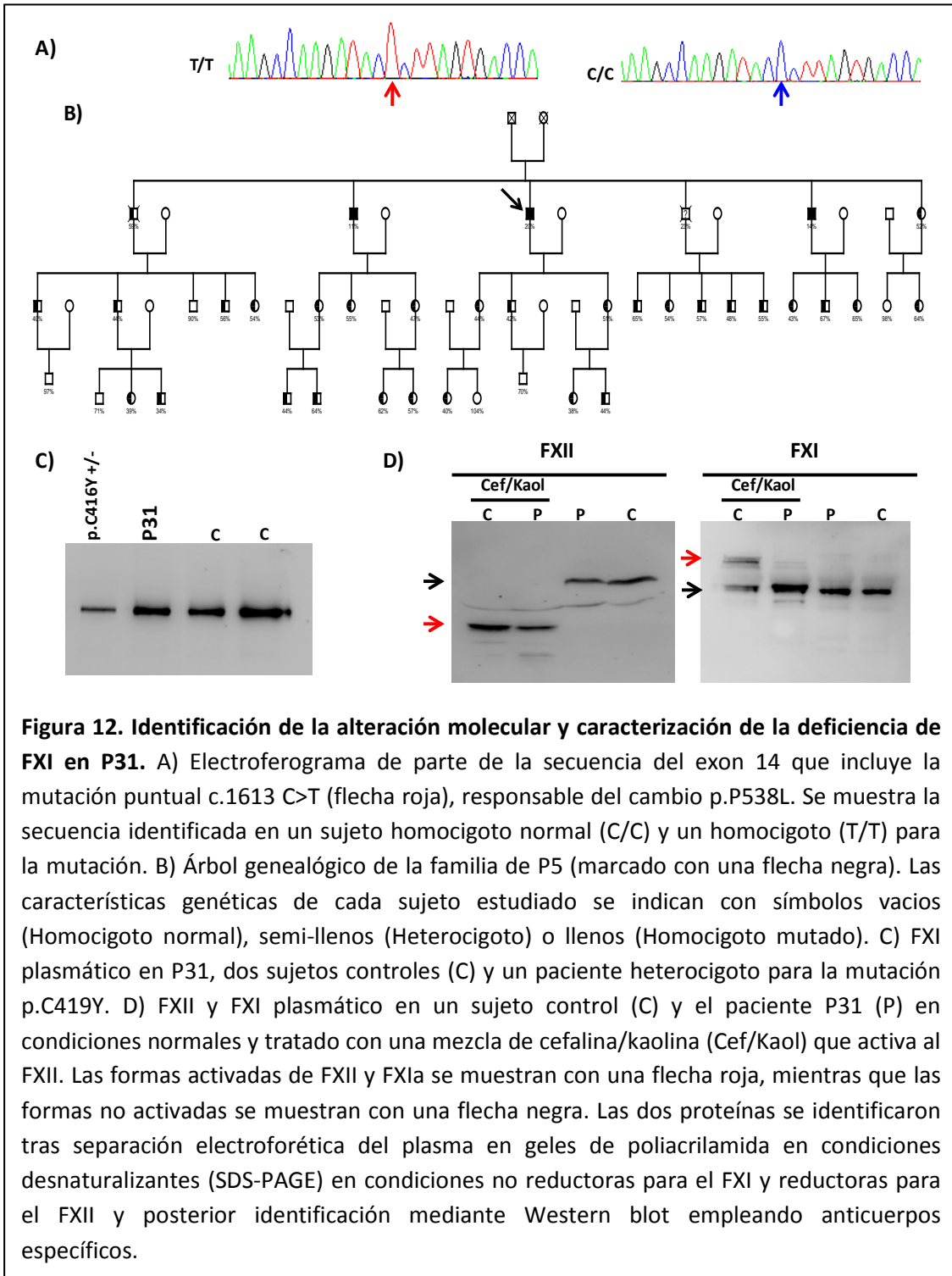
El estudio molecular de los casos restantes continuó con el cuarto paciente con deficiencia severa, **P30 (1%)**. Como se muestra en la Figura 11, P30 presentaba dos mutaciones en heterocigosis compuesta confirmada mediante estudios familiares (Figura 11). De hecho, el hermano de P30 también con deficiencia severa de FXI, era portador de las dos mutaciones, mientras que cada progenitor solo presentaba una. La primera, una mutación puntual en el exón 14 c.1608 G>C, provocaba el cambio p.Lys536Asn. Esta mutación ya se había descrito en tres pacientes portugueses con deficiencia de FXI, dos en heterocigosis compuesta y uno en heterocigosis (CM002953) [187]. En nuestro caso era de origen materno (Figura 11). La Lys536 forma parte del motivo LxxxxxPxxxxxC (x-es cualquier aminoácido) que aparece en diferentes subfamilias de serín proteasas. Aunque este motivo está altamente conservado en FXI y PK (86% de identidad de secuencia), el residuo Lys536 no está conservado. Sin embargo, se trata de un residuo muy conservado filogenéticamente (en el FXI de humanos, ratones y ovejas), lo que sugiere que es un aminoácido específico de FXI. Un modelo molecular de FXI predice que las cadenas laterales de este residuo se localizan en la superficie de la molécula, formando posiblemente puentes de hidrógeno con Trp515. La sustitución de la carga positiva de la lisina por la asparragina (más pequeña y neutral) podría interferir con el plegamiento y/o secreción de la molécula de FXI explicando los niveles bajos de FXI en plasma que detectamos en los portadores de la familia analizada (Figura 11). No obstante, no se puede descartar que la vida media del FXI variante pudiera ser mucho más corta [187]. Independientemente del mecanismo implicado, la mutación p.Lys538Asn causa una deficiencia CRM-, aparentemente subtipo 3 (Figura 11). La segunda mutación de P30, localizada en el exón 15 c.1796 G>A, provocaría el cambio p.Cys599Tyr y es de origen paterno. Esta segunda mutación no se ha descrito previamente en pacientes con deficiencia de FXI, pero afecta a una cisteína implicada en un puente disulfuro (Cys571-Cys599) localizado en el dominio catalítico del FXIa y muy cercano al tercer aminoácido de la triada catalítica del FXIa

(Ser575). Por ello, esta mutación podría interferir con la actividad catalítica del FXIa [97], y por tanto podría esperarse que la mutación p.Cys599Tyr se asociara con una deficiencia de FXI CRM+. De hecho, los portadores de la mutación en heterocigosis compuesta presentan trazas detectables de FXI en plasma con práctica ausencia de actividad funcional, y el padre presenta niveles antigénicos completamente normales, con una actividad coagulante (FXI:C) moderada (47%) (Figura 11).



**Figura 11. Identificación de las mutaciones c.1608 G>C (p.Lys536Asn) y c.1796 G>A (p.Cys599Tyr) presentes en P30.** A) Electroferogramas de parte de la secuencia del exon 14 que incluye la mutación puntual c.1608 G>C (flecha roja), responsable del cambio p.Lys536Asn y del exon 15 que incluye la mutación puntual c.1796 G>A (flecha roja), responsable del cambio p.Cys599Tyr. B) Árbol genealógico de la familia de P30 (marcado con una flecha negra). Las características genéticas de cada sujeto estudiado se indican con símbolos vacíos (Homocigoto normal), semi-llenos (Heterocigoto) para las dos mutaciones identificadas en esta familia: p.Cys599tyr (azul) y p.Lys536Asn (negro). C) FXI plasmático en miembros representativos de la familia de P30, un control (Cont) y un plasma de un paciente homocigoto para la mutación p.Cys56Arg. El FXI se identificó tras separación electroforética del plasma en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), en condiciones no reductoras, y posterior identificación mediante Western blot empleando el anticuerpo anti-FXI humano. Las características genéticas y los niveles de FXI:C de cada sujeto también se indican.

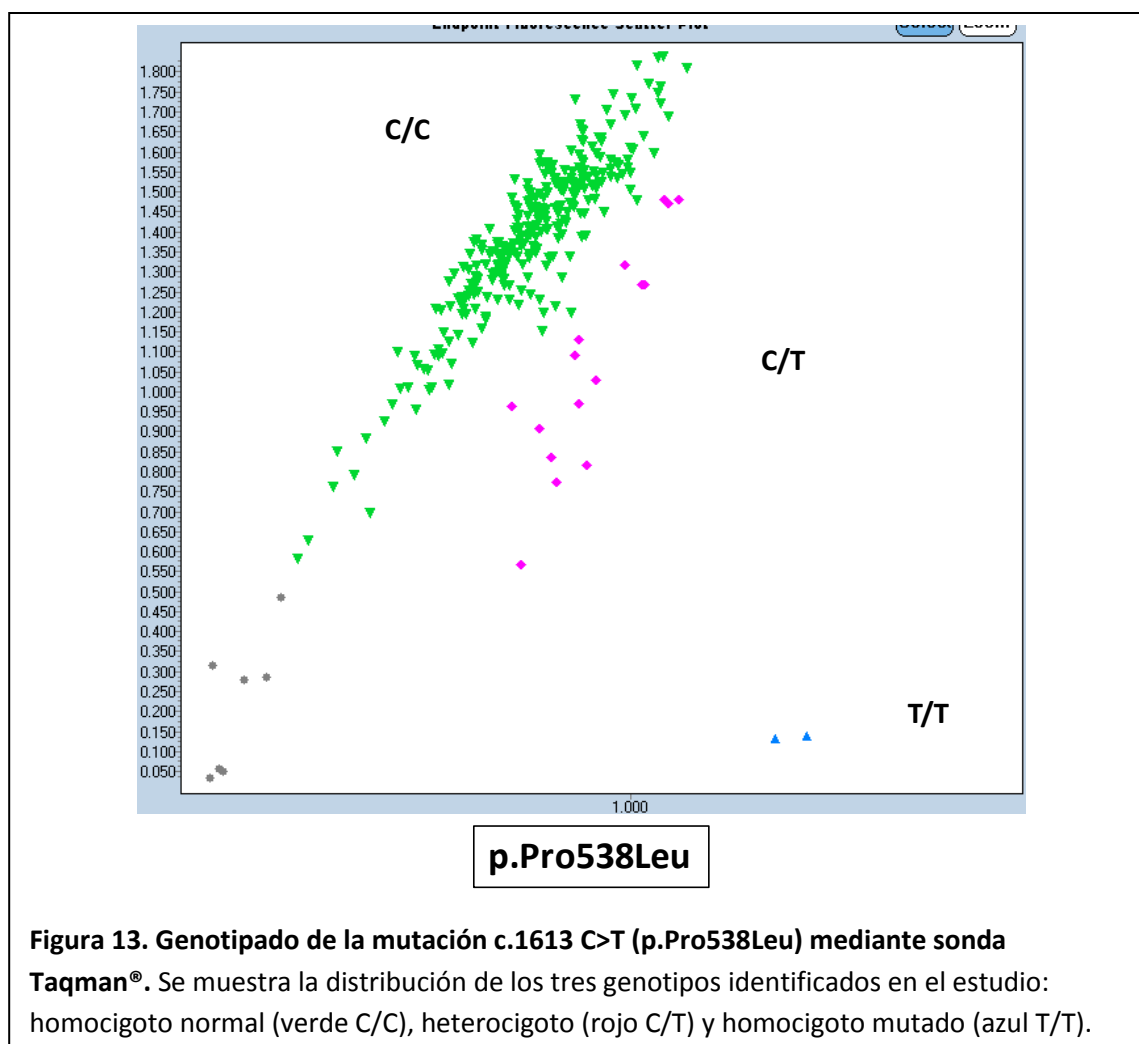
El último caso con sospecha de deficiencia severa de FXI, **P31** el primer paciente identificado en este estudio, tenía la característica de contar en su familia con otros cuatro miembros que también presentaban niveles bajos de FXI (11-23%). La secuenciación del *F11* reveló que P31 presentaba una mutación en homocigosis afectando al exón 14: c.1613 C>T (Figura 12).



Esta mutación provoca el cambio p.Pro538Leu, una mutación ya descrita en 7 pacientes ingleses y franceses con deficiencia de FXI, uno de ellos en heterocigosis compuesta y el resto en heterocigosis (CM051916) [188]. Estudios preliminares sugieren que la proteína mutada con Leu538 se expresa correctamente por las células 293 pero tiene modesta actividad catalítica en ensayos funcionales. La base del defecto catalítico que provoca el cambio p.Pro538Leu se explica por la importancia que el residuo Pro538 tiene en el mantenimiento de la conformación normal del sitio activo del FXIa [116].

De hecho, la Pro538 está conservada en FX y FVII, y su mutación en cualquiera de estas dos proteasas causa fenotipos tipo II [83], CRM+ para el FXI. Nosotros confirmamos este tipo de deficiencia en el paciente P31 (Figura 12). Al disponer de pacientes homocigotos para esta mutación pudimos aportar un nuevo dato relacionado con esta mutación. El cambio p.Pro538Leu hace que la variante no se active correctamente por el FXIIa (Figura 12).

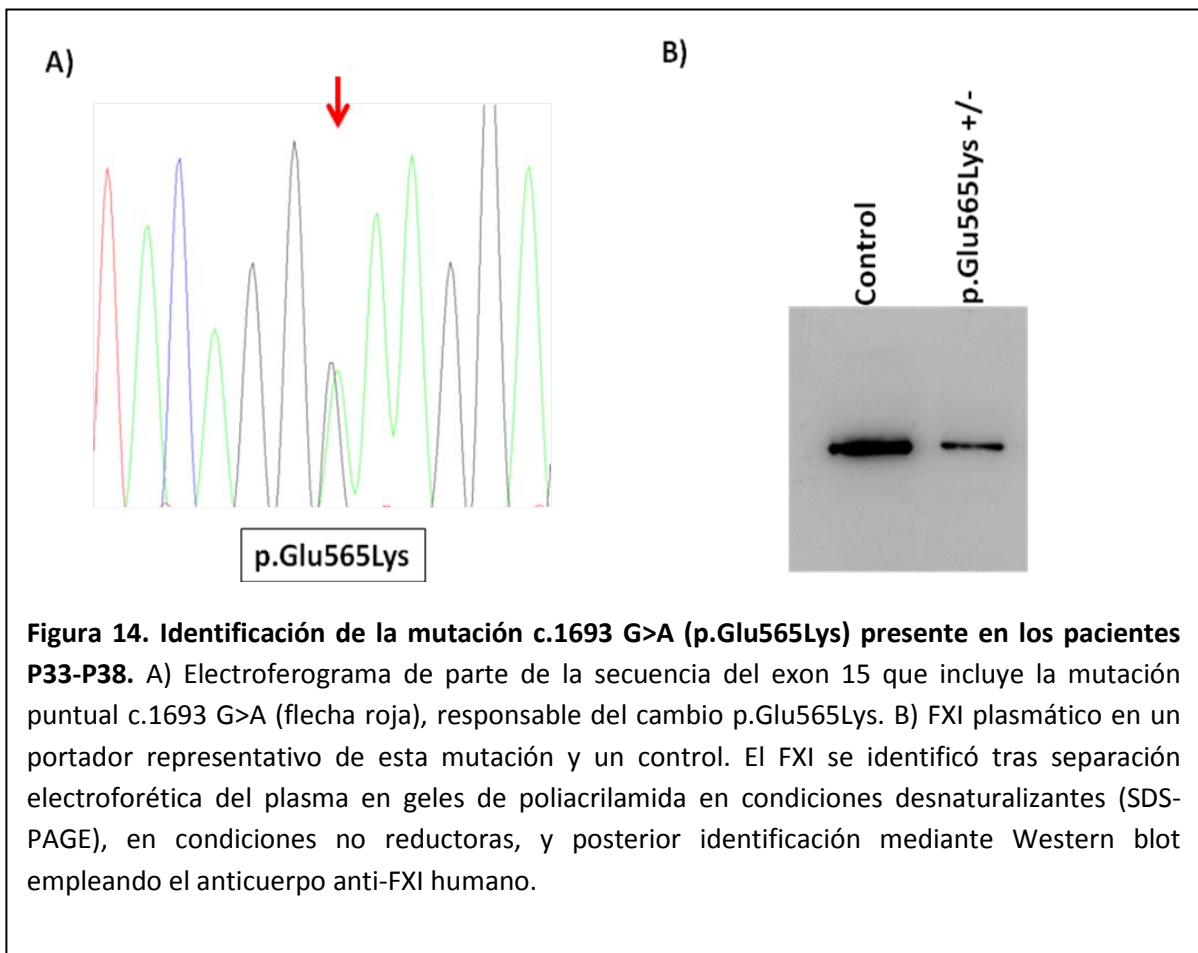
El genotipado de la mutación en la familia afectada se realizó de nuevo con una sonda Taqman® (Figura 13).



En los restantes 13 casos identificados con deficiencia de FXI (P32-P44), la búsqueda del defecto molecular responsable se realizó mediante secuenciación de los exones y regiones flanqueantes del gen *F11* y en un caso mediante NGS.

En primer lugar, destacamos que el paciente **P32** también presentaba la mutación CM051916; p.Pro538Leu, en heterocigosis (Tabla 7).

Pero el hecho más destacable es la identificación de la mutación c.1693 G>A en el exón 15 y que provoca el cambio p.Glu565Lys en 6 pacientes de nuestra serie (**P33-P38**), todos en heterocigosis. (Figura 14).

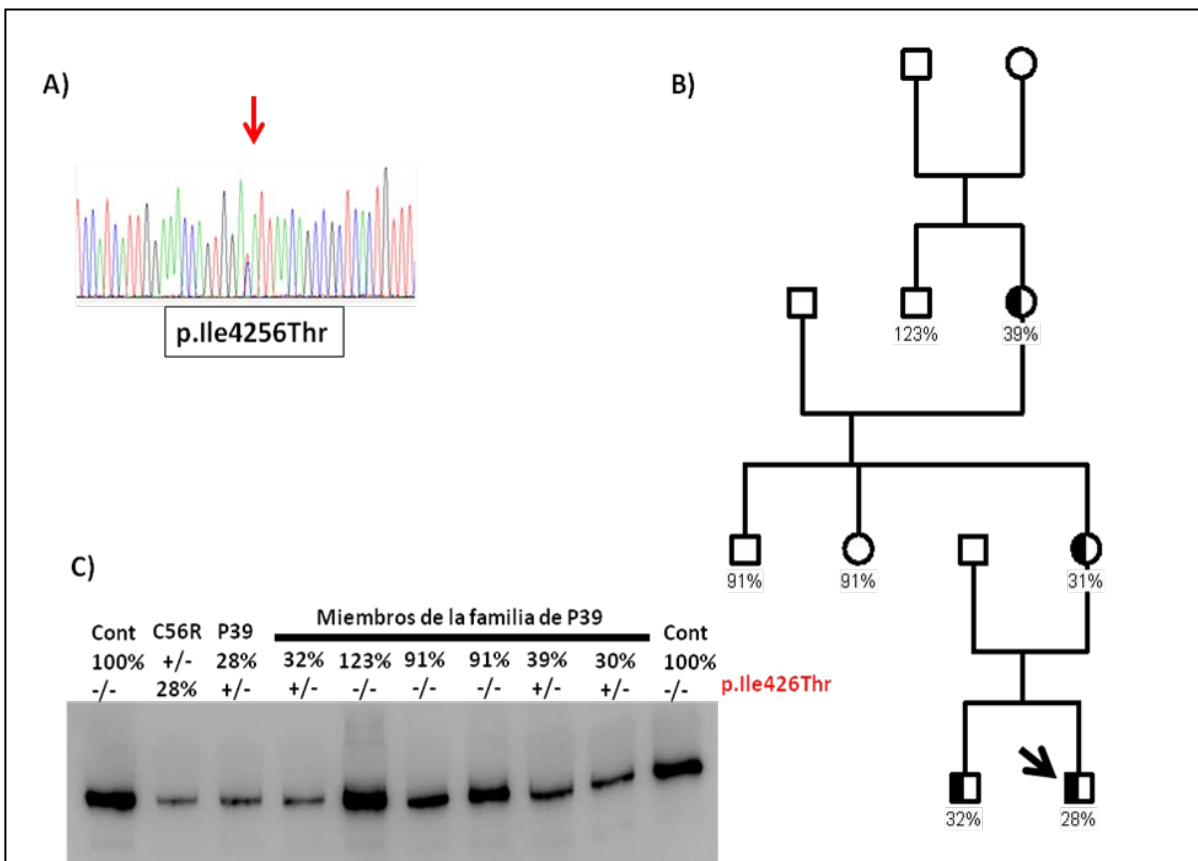


Esta mutación ya había sido descrita previamente, también en heterocigosis, en 4 pacientes de diferente razas con deficiencia de FXI, uno en heterocigosis compuesta y tres en heterocigosis (CM051917) [188]. De esta variante disponemos de poca información bioquímica. Se localiza en el dominio serín proteasa, y parece que

condiciona una deficiencia CRM-, resultados que nuestro estudio confirma en las 6 familias en las que se ha identificado y sugiere un subtipo 3 por el bajo nivel de FXI:C en portadores heterocigotos (Tabla 2; Figura 14).

En los pacientes P39-P43, se identificó una mutación diferente en cada caso potencialmente responsable de la deficiencia de FXI, en todos los casos en heterocigosis.

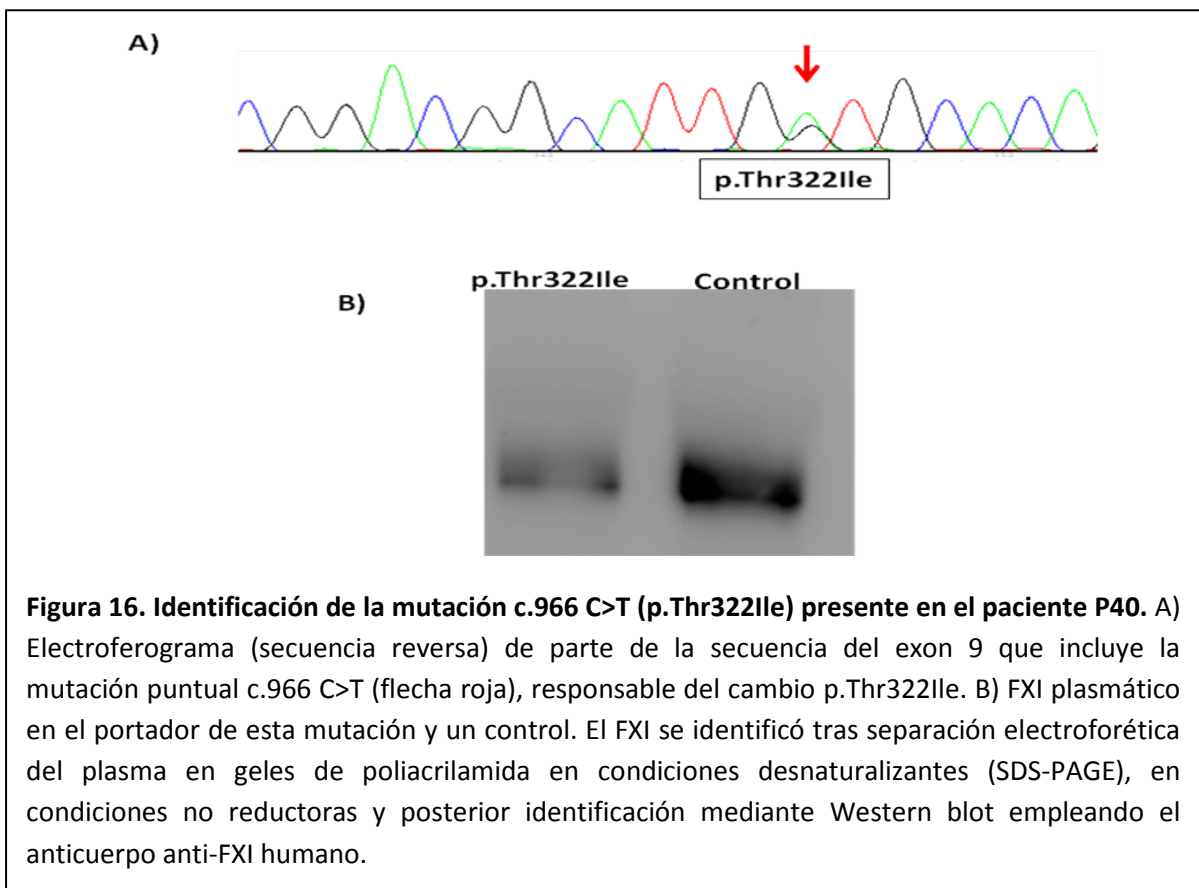
**P39** presentaba la mutación c.1277 T>C en el exón 11, responsable del cambio p.Ile426Thr (Figura 15).



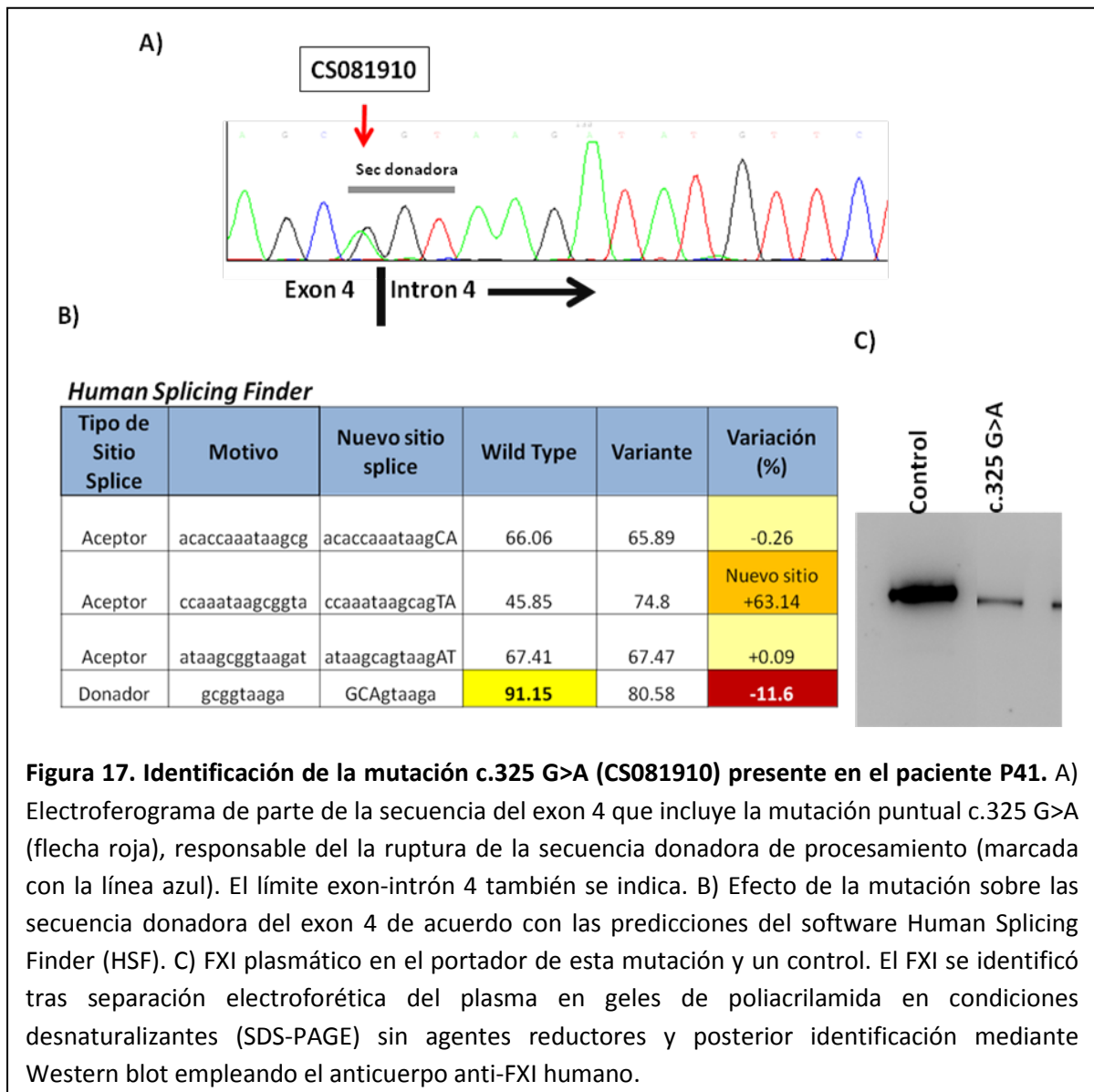
**Figura 15. Identificación de la mutación c.1277 T>C (p.Ile426Thr) en P39.** A) Electroferograma (secuencia reversa) de parte de la secuencia del exón 11 que incluye la mutación puntual c.1277 T>C (flecha roja), responsable del cambio p.Ile426Thr. Se muestra la secuencia identificada en un sujeto heterocigoto. B) Árbol genealógico de la familia de P39 (marcado con una flecha negra). Las características genéticas de cada sujeto estudiado se indican con símbolos vacíos (Homocigoto normal), semi-llenos (Heterocigoto) para la mutación p.Ile426Thr identificada en esta familia. Los valores de FXI:C de cada caso estudiado también se indican. C) FXI plasmático en miembros representativos de la familia de P39, sujetos controles (Cont) y un plasma de un sujeto heterocigoto para la mutación p.Cys56Arg. El FXI se identificó tras separación del plasma en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), en condiciones no reductoras, y posterior identificación mediante Western blot empleando el anticuerpo anti-FXI humano. Las características genéticas y los niveles de FXI:C de cada sujeto también se indican.

Esta mutación no está descrita en las bases de datos de deficiencia de FXI. La validación de esta mutación, y su asociación con la deficiencia de FXI se realizó mediante su estudio en los 7 familiares disponibles (Figura 15). Todos los casos con deficiencia (N= 4) eran portadores de esta mutación, mientras que los no deficientes (N= 3) carecían de esta mutación (Figura 15). La mutación provoca el cambio de un residuo apolar por otro polar, localizado en el dominio serín proteasa. Una mutación adyacente (p.Thr428Ile) provoca tanto defectos de plegamiento como funcionales [83]. Este hecho es compatible con los resultados antigénicos observados en los portadores de esta mutación (Figura 15) y sugiere que da lugar a una deficiencia CRM-.

P40 presentaba la mutación c.966 C>T en el exón 9, responsable del cambio p.Thr322Ile (Figura 16). Esta mutación está descrita en las bases de datos de deficiencia de FXI (CM950373/rs281875269) [91]. La mutación se ha identificado en dos pacientes, uno francés en homocigosis [189] y otro inglés, en heterocigosis [190]. La mutación afecta al dominio Ap4, y su expresión recombinante se asocia con reducción de la secreción y por tanto con deficiencia CRM- [91], resultado que confirmamos en nuestro caso gracias a los estudios mediante Western Blot (Figura 16).

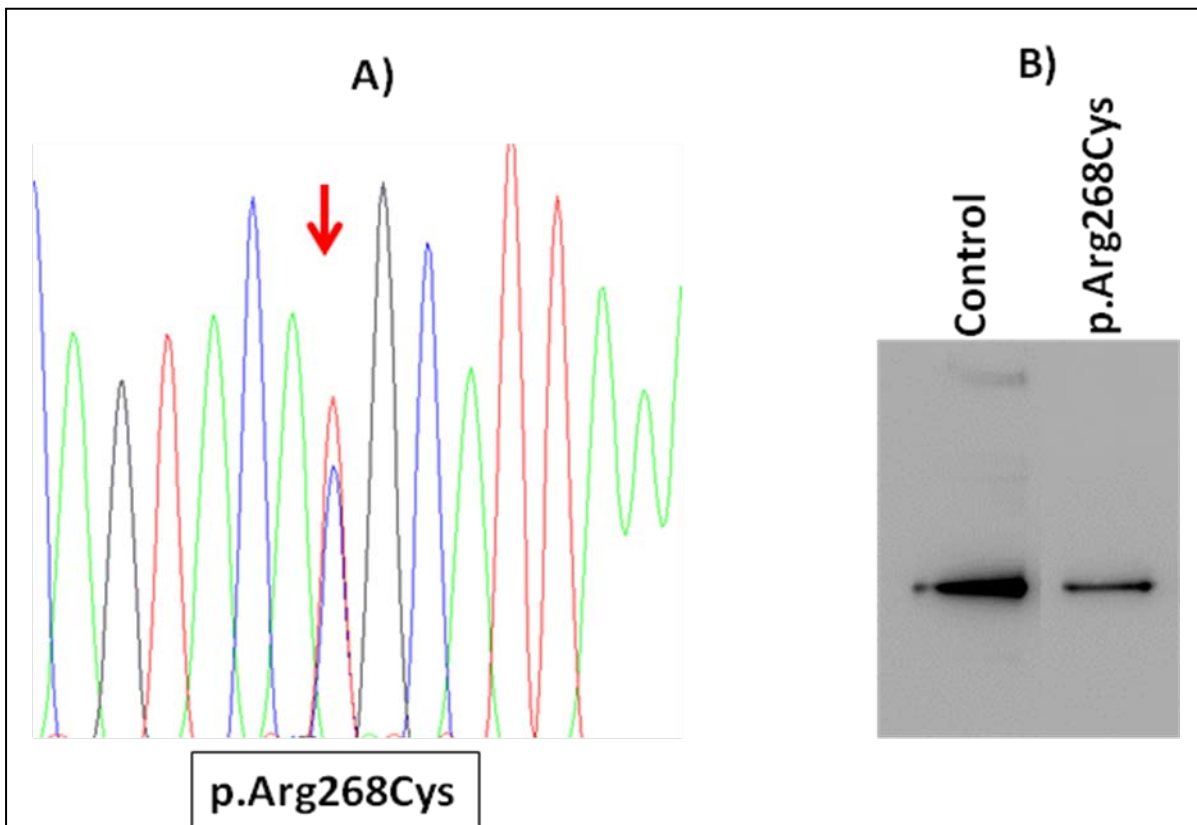


**P41** presentaba una mutación que afecta al último nucleótido del exón 4 c.325 G>A (Figura 17) ya descrita previamente en heterocigosis compuesta en un paciente inglés con deficiencia de FXI [111]. Este cambio no tiene como consecuencia ningún cambio de aminoácido (si se atendiera exclusivamente a la secuencia primaria, debería provocar un cambio p.Ala91Thr), ya que elimina la secuencia donadora de procesamiento de intrones y altera el correcto procesamiento de exones (en inglés “exon skipping”) (CS081910), lo que justifica la ausencia de proteína mutada en plasma (CRM-) tal y como observamos en el estudio de Western blot (Figura 17).





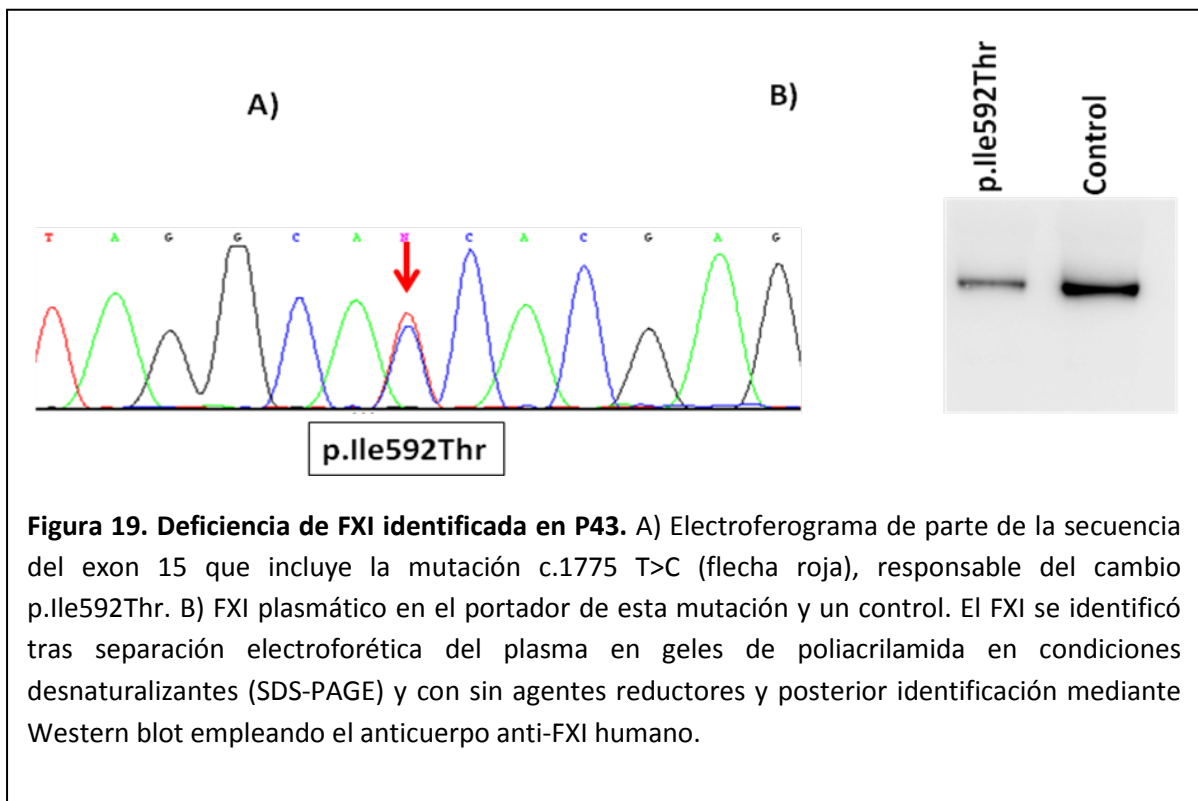
**P42** presentaba la mutación c.802 C>T en el exón 8, responsable del cambio p.Arg268Cys (+/-) (Figura 18). Esta mutación está descrita en las bases de datos de deficiencia de FXI (CM035499) [108] y se identificó previamente en 4 pacientes (dos ingleses), en dos casos en homocigosis y en dos casos en heterocigosis [190]. Esta mutación afecta al dominio Ap3, pero hay escasa información de las consecuencias que tiene. En nuestro caso presentaba reducidos niveles circulantes de FXI (CRM-) (Figura 18).



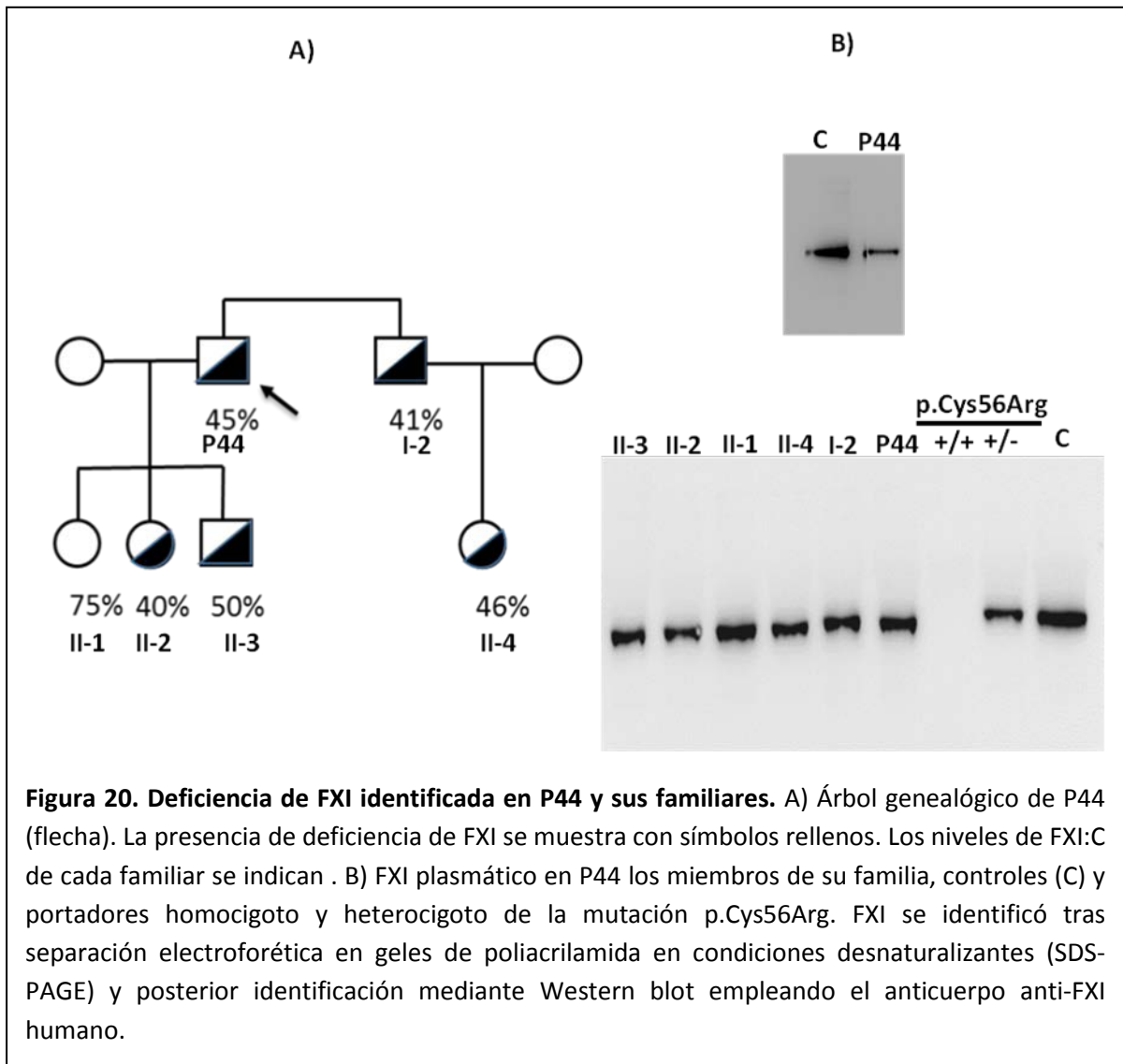
**Figura 18. Identificación de la mutación c.802 C>T (p.Arg268Cys) presente en el paciente P42.** A) Electroferograma de parte de la secuencia del exón 8 que incluye la mutación puntual c.802 C>T (flecha roja), responsable del cambio p.Arg268Cys. B) FXI plasmático en el portador de esta mutación y un control. El FXI se identificó tras separación electroforética del plasma en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), en condiciones no reductoras, y posterior identificación mediante Western blot empleando el anticuerpo anti-FXI humano.

En **P43** la mutación ya se identificó empleando metodología NGS. En el exón 15 este paciente presentaba la mutación c.1775 T>C en heterocigosis, que fue verificada mediante secuenciación clásica (Figura 19). Esta mutación no ha sido descrita

previamente en ningún paciente con deficiencia de FXI, pero se encuentra muy cercana a la identificada en un paciente con una deficiencia CRM+, c.1778C>T (p.Thr593Met: CM042343) [103], que afecta al dominio catalítico [115]. Sin embargo, los niveles de FXI que hemos observado en plasma del sujeto portador P43 son claramente inferiores a los controles lo que sugiere una deficiencia CRM- (Figura 19). Desgraciadamente no disponemos de familiares para verificar la asociación de la mutación con la deficiencia de FXI y el tipo de deficiencia asociada.

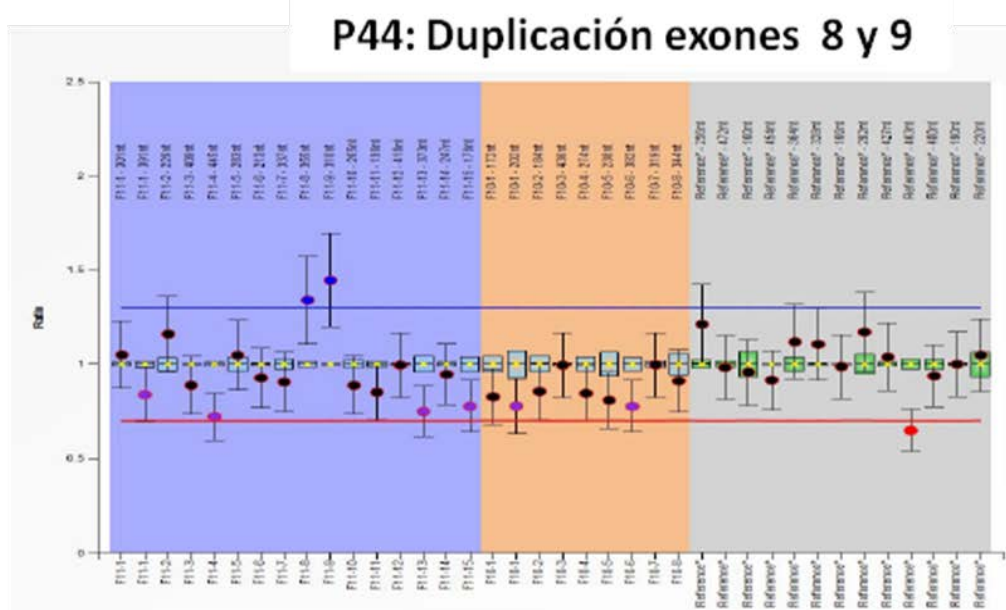
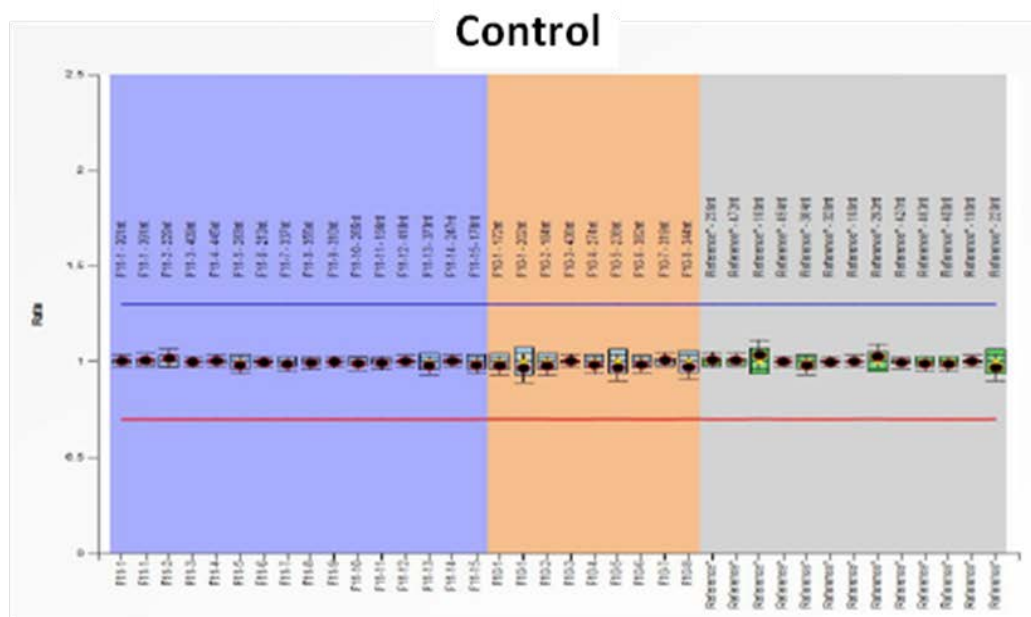


El caso **P44** es excepcional ya que no presentaba ninguna mutación en los 15 exones y regiones flanqueantes de *F11* secuenciados con los oligonucleotidos diseñados en este estudio. La base congénita de la deficiencia de FXI de P44 fue confirmada con el estudio familiar, ya que 5 miembros de su familia, tanto con métodos coagulométricos (FXI:C) como inmunológicos (Western Blot) presentaban deficiencia de FXI y en todos los casos CRM- (Figura 20).



**Figura 20. Deficiencia de FXI identificada en P44 y sus familiares.** A) Árbol genealógico de P44 (flecha). La presencia de deficiencia de FXI se muestra con símbolos rellenos. Los niveles de FXI:C de cada familiar se indican . B) FXI plasmático en P44 los miembros de su familia, controles (C) y portadores homocigoto y heterocigoto de la mutación p.Cys56Arg. FXI se identificó tras separación electroforética en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) y posterior identificación mediante Western blot empleando el anticuerpo anti-FXI humano.

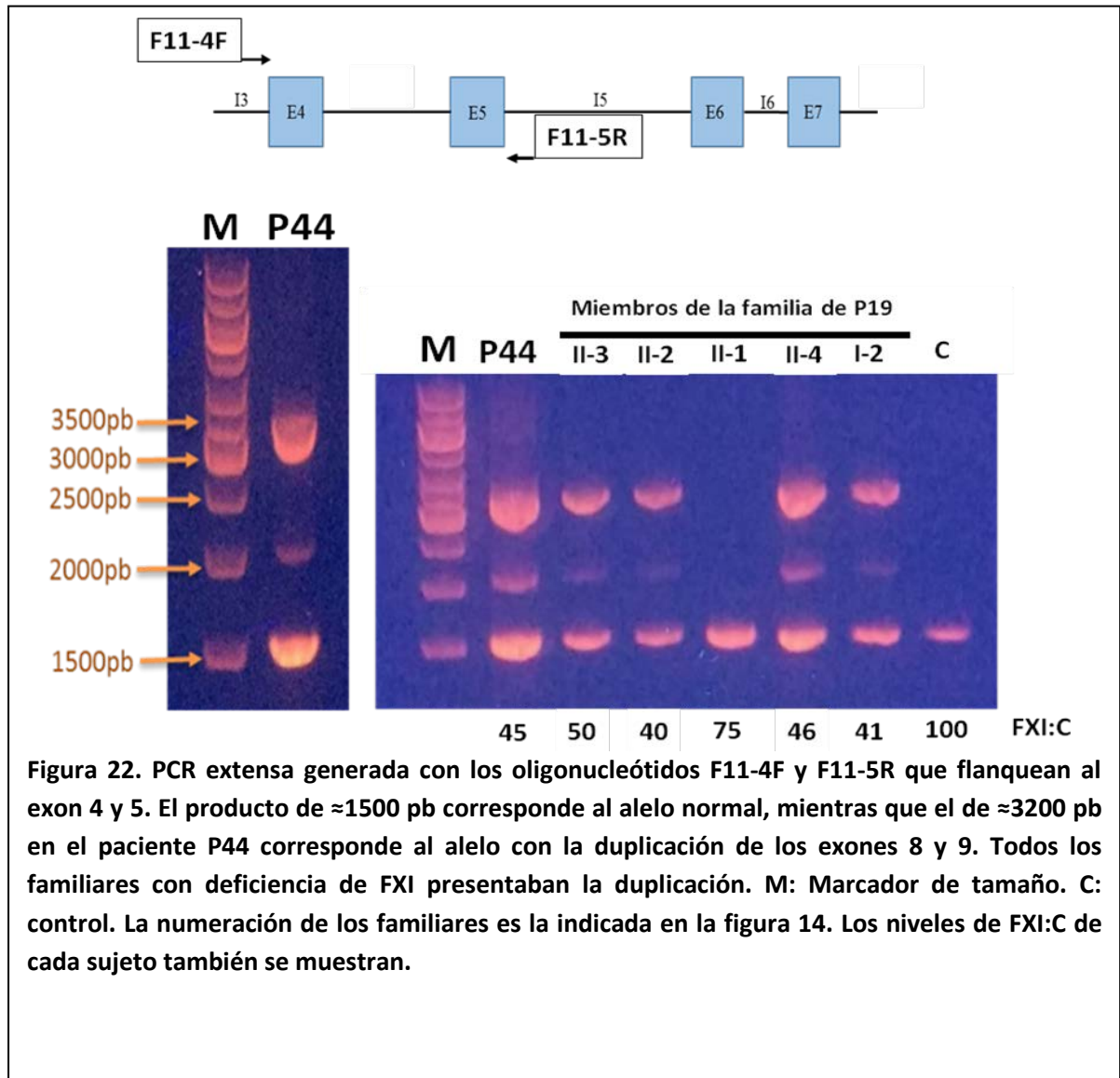
La búsqueda de la alteración genética de este paciente se abordó inicialmente mediante MLPA, buscando grandes deleciones que justificasen la deficiencia CRM-. Aunque la prueba se repitió dos veces, el resultado no era concluyente pero sugería una duplicación de los exones 8 y 9 (Figura 21).



**Figura 21. Detección mediante MLPA de la duplicación de los exones 8 y 9 del *F11* en heterocigosis en el paciente P44.**

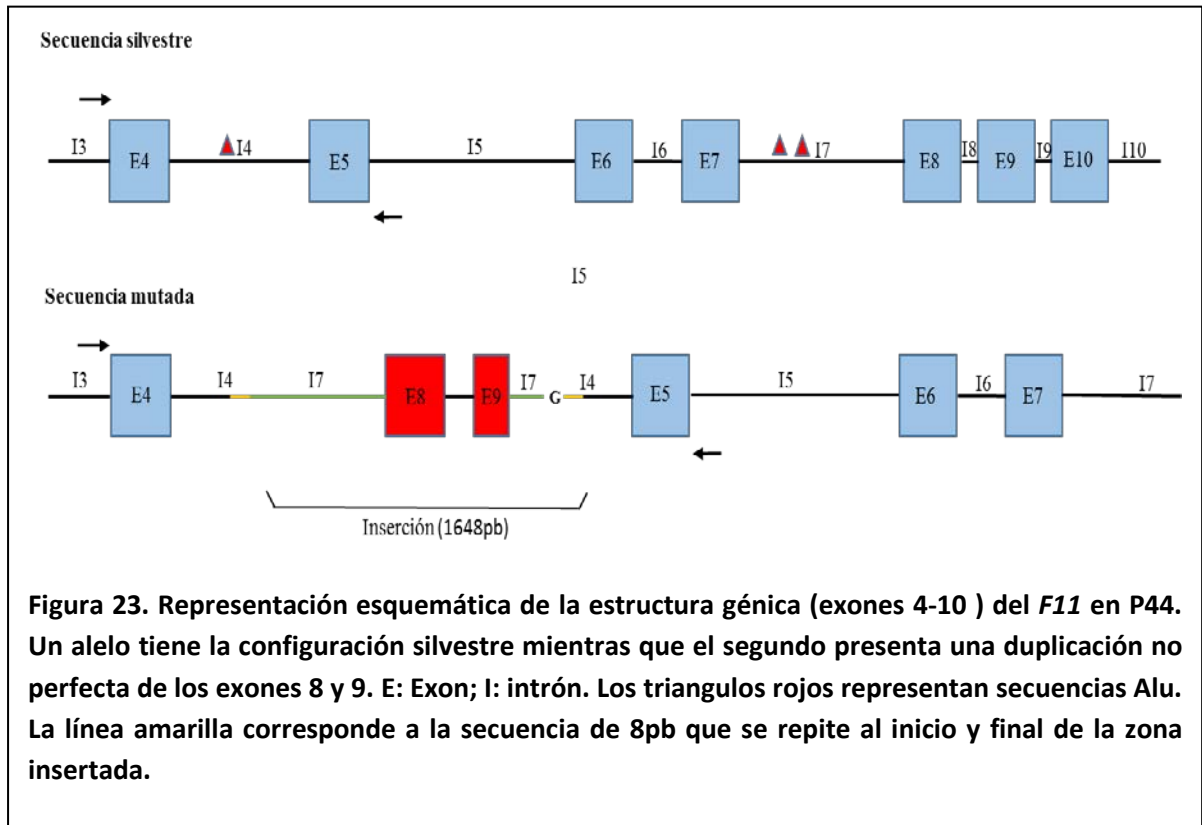
La secuenciación masiva realizada en una plataforma de Illumina (Hospital Sant Pau, Barcelona), mostró una inserción de 1648 pb en el intrón 4 que contiene los exones 8 y parte del 9. La realización de una PCR extensa empleando oligonucleótidos

flanqueantes de esta inserción (F11-4F y F11-5R) confirmó la existencia de la misma en el probando y también en heterocigosis en los familiares afectados (Figura 22).



La purificación del amplicón de mayor tamaño y su posterior secuenciación utilizando los oligonucleótidos internos (F11-8F, F11-9F y F11-in4F) mostró una arquitectura alélica que se resume esquemáticamente en la figura 23. Brevemente, a 616 pb del inicio del intrón 4 se integra parte del intrón 7, continuado del exón 8, el intrón 8 y 54 pb del exón 9 en secuencia silvestre. Llamativamente, tras este fragmento del exón 9 se identifican 191 pb del intrón 7, y tras una guanina que se inserta en el punto de ruptura, continua el intrón 4 que se inicia con una secuencia de 8 pb que es idéntica a

la que finaliza en el punto de ruptura anterior (Figura 23) para continuar con la arquitectura normal del *F11* (Figura 23).



**Figura 23. Representación esquemática de la estructura génica (exones 4-10 ) del *F11* en P44. Un alelo tiene la configuración silvestre mientras que el segundo presenta una duplicación no perfecta de los exones 8 y 9. E: Exon; I: intrón. Los triángulos rojos representan secuencias Alu. La línea amarilla corresponde a la secuencia de 8pb que se repite al inicio y final de la zona insertada.**

### Estudios familiares

Con la finalidad de incrementar el número de portadores de las mutaciones identificadas y poder caracterizar mejor la deficiencia de FXI, tanto desde el punto de vista analítico y diagnóstico como desde el punto de vista clínico, nuestro proyecto también incluyó 170 familiares de los 44 casos índices. En total, el estudio incluyó 214 sujetos con deficiencia de FXI.

Como ya se indicó, nuestro estudio identificó 4 mutaciones recurrentes en al menos dos familias en principio no relacionadas. La mutación más prevalente, p.Cys56Arg, se encontró en 3 homocigotos de dos familias y 105 heterocigotos de 23 familias (Tabla 2). La mutación p.Cys416Tyr se detectó en heterocigosis en 20 casos de 7 familias (un caso en heterocigosis compuesta p.Cys56Arg& p.Cys416Tyr) (Tabla 8). La mutación p.Glu565Lys se detectó en heterocigosis en 27 casos pertenecientes a 6 familias (Tabla

8). Finalmente, la mutación p.Pro538Leu se identificó en 4 homocigotos y 32 heterocigotos de dos familias (Tabla 8).

El resultado más relevante de este estudio familiar es la heterogeneidad que existe en los portadores de cada mutación para las dos pruebas que se emplean en el diagnóstico de la deficiencia de FXI, la ratio del TTPa y el FXI:C. Esta heterogeneidad fue especialmente relevante para las mutaciones recurrentes, de las que tenemos más portadores (Tabla 8). Este tema lo abordaremos más adelante.

La recogida de muestras de familiares permitió realizar, como veremos posteriormente, estudios de haplotipos que permiten evaluar el efecto fundacional de las mutaciones recurrentes.

Finalmente, la recogida de un elevado número de pacientes con deficiencia de FXI nos permitió analizar las implicaciones clínicas de este desorden.

### **Estudio de haplotipos. Identificación de mutaciones fundadoras**

Con la finalidad de sustentar un efecto fundador para las cuatro mutaciones recurrentes identificadas en nuestro estudio, realizamos un estudio del haplotipo asociado con cada mutación en los casos homocigotos y en los casos heterocigotos de cada familia portadora de cada una de las mutaciones recurrentes.

El primer estudio, centrado en la mutación p.Cys56Arg, la más frecuente de nuestro estudio, se realizó mediante secuenciación Sanger de las regiones que contenían las variantes marcadoras del haplotipo asociado con la mutación descrita en población vasco-francesa y que permitió definir el efecto fundador de esta mutación en esa población [102]. De esta forma, secuenciamos los intrones 1, 5, y 13 además de los exones 5, 8, 9 11, y 15 en dos sujetos homocigotos de dos familias en principio no relacionadas. Identificamos 13 marcadores polimórficos, incluidos 7 de los indicados por Zivelin y col. [102]. El resultado fue que los homocigotos de nuestro estudio comparten el mismo haplotipo entre sí y coincide plenamente con el descrito por Zivelin (Figura 24), confirmando que la mutación p.Cys56Arg identificada en Yecla tiene el mismo origen que la descrita en población vasco-francesa.

<u>Posición F11</u>	<u>rs</u>	<u>Loc gen</u>	<u>MAF</u>	<u>Zivelin</u>	<u>Familia 1</u>	<u>Familia 2</u>
<b>c.-23 C/T</b>	--	I-1	ND	<b>C</b>	<b>C/C</b>	<b>C/C</b>
c.-1-229T/C	4253398	I-1	0.28	-	C/C	C/C
c.-1-149G>T	200009304	I-1	ND	-	G/G	G/G
c.-1-149_-1-148insAT	35709976	I-1	0.10	-	AT/AT	AT/AT
<b>c.-1-138A&gt;C</b>	<b>3822057</b>	<b>I-1</b>	<b>0.48</b>	<b>A</b>	<b>A/A</b>	<b>A/A</b>
c.429C>T	5973	E-5	0.03	C	C/C	C/C
c.486-431G>A	<b>2055916</b>	<b>I-5</b>	<b>0.49</b>	<b>A</b>	<b>A/A</b>	<b>A/A</b>
c.486-361C>T	4253413	I-5	0.29	-	T/T	T/T
<b>c.801A&gt;G</b>	<b>5974</b>	<b>E-8</b>	<b>0.18</b>	<b>A</b>	<b>A/A</b>	<b>A/A</b>
<b>c.1194T&gt;C</b>	<b>5970</b>	<b>E-11</b>	<b>0.17</b>	<b>T</b>	<b>T/T</b>	<b>T/T</b>
c.1580-93_1580-92insAT	377566180	I-13	ND	9	9/9	9/9
c.1815G>T	5971	E-15	0.05	G	G/G	G/G
c.1842G>A	5976	E-15	0.05	G	G/G	G/G

Figura 24. Haplotipo de la mutación p.Cys56Arg identificado por Zivelin y col. (negrita) y el detectado mediante secuenciación de Sanger en 2 de los pacientes homocigotos de nuestra serie pertenecientes a dos familias no relacionadas. I: Intron; E: Exon. ND: No determinada.

El estudio de haplotipos de las mutaciones recurrentes identificadas en nuestro estudio se completó secuenciando el gen *F11* (NM\_008051.1) en 95 deficientes de FXI mediante la tecnología de secuenciación masiva empleando una plataforma Ion Torrent. La distribución de portadores y el estatus genético para cada mutación se recoge en la tabla 9.

Tabla 9. Características genéticas y procedencia de los casos con deficiencia de FXI en los que se ha secuenciado el gen *F11* completo mediante NGS para determinación del haplotipo asociado con cada mutación.

Mutación	Nº de Familias	Potadores Homocigotos	Portadores Heterocigotos
p.Cys416Tyr	6	-	16
p.Glu565Lys	6	-	14
p.Cys56Arg	19	3	27
p.Pro538Leu	2	3	32



Las variantes genéticas informativas y presentes en los portadores de cada una de las 4 mutaciones sirvieron para definir el haplotipo asociado con cada mutación, y se resumen en las Tablas 10-13. Los resultados muestran que cada mutación recurrente comparte el mismo haplotipo, apoyando la existencia de un efecto fundacional.

**Tabla 10. Haplotipo de la mutación p.Cys416Tyr.**

Var	Coordenada	Gen	Loc	HGVSc	HGVSp	dbSNP ID	Frecuencia Alélica (%)*
A>A/T	chr4:187190285	het	Intron 2	c.55+1940T>A		rs925452	1
T>T/A	chr4:187193308	het	Intron 3	c.218+383A>T		rs4253407	13
A>A/T	chr4:187195551	het	Intron 4	c.323+1222T>A		rs1593	10
G>G/A	chr4:187199497	het	Intron 7	c.203-1669A>G		rs4253418	2
G>G/A	chr4:187204937	het	Intron 10	c.974-309A>G		rs4253421	7
G>G/A	chr4:187205357	het	Exon 11	c.1247G>A	<b>p.Cys416Tyr</b>	NA	0
C>C/T	chr4:187205929	het	Intron 12	c.1142+515T>C		rs4253425	7

**Var: Variante; Gen: Genotipo; Het: Heterocigoto; Loc: localización gen F11; ID: nº identificación.**

\* Frecuencia alélica recogida de los datos de 1000 genomas, Abril 2012 versión 3 (www.1000genomes.org) [Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, Handsaker RE, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. Nature. 2012;491: 56–65].

**Tabla 11. Haplotipo de la mutación p.Glu565Lys.**

Var	Coordenada	Gen	Loc	HGVSc	HGVSp	dbSNP ID	Frecuencia Alélica (%)*
A>A/G	chr4:187189326	het	Intron 2	c.55+981A>G		rs4253403	2
A>A/T	chr4:187195551	het	Intron 4	c.323+1222T>A		rs1593	10
A>A/G	chr4:187204937	het	Intron 11	c.974-309A>G		rs4253421	8
C>C/T	chr4:187205929	het	Intron 12	c.1142+515T>C		rs4253425	7
G>G/A	Chr4:187208954	het	Exon 14	c.1693G>A	<b>p.Glu565Lys</b>	NA	0

**Var: Variante; Gen: Genotipo; Het: Heterocigoto; Loc: localización gen F11; ID: nº identificación.**

\* Frecuencia alélica recogida de los datos de 1000 genomas, Abril 2012 versión 3 (www.1000genomes.org) [Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, Handsaker RE, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. Nature. 2012;491: 56–65].

**Tabla 12. Haplotipo de la mutación p.Cys56Arg.**

Var	Coordenada	Alelo marcador	Loc	HGVSc	HGVSp	dbSNP ID	Frecuencia Alélica (%)*
T>T/C	chr4:187188061	C	Intron 1	c.-1-229T>C		rs4253398	21
A>A/G	chr4:187190810	G	Intron 2	c.56-1953A>G		rs4253405	30
T>T/C	chr4:187192873	C	Exon 3	c.166T>C	<b>p.Cys56Arg</b>	rs121965069	0
C>C/T	chr4:187194685	T	Intron 4	c.323+356C>T		rs4253409	25
G>G/A	chr4:187196510	A	Intron 5	c.324-431G>A		rs2055916	44
C>C/T	chr4:187196580	T	Intron 6	c.324-361C>T		rs4253413	25
C>C/T	chr4:187197994	T	Intron 7	c.202+450C>T		rs4253416	24
T>T/C	chr4:187199005	C	Intron 7	c.202+1461T>C		rs4253417	30
C>C/A	chr4:187206249	A	Intron 12	c.1143-543C>A		rs3756011	33
C>C/T	chr4:187207381	T	Intron 12	c.1319-188C>T		rs2289252	33

**Var: Variante; Loc: localización gen F11; ID: nº identificación.**

\* Frecuencia alélica recogida de los datos de 1000 genomas, Abril 2012 versión 3 (www.1000genomes.org) [Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, Handsaker RE, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. Nature. 2012;491: 56–65].

**Tabla 13. Haplotipo de la mutación p.Pro538Leu**

Var	Coordenada	Alelo marcador	Loc	HGVSc	HGVSp	dbSNP ID	Frecuencia Alélica (%)*
C>C/A	chr4:187202125	A	Intron 8	c.582+391C>A		rs4253846	8
G>G/A	chr4:187202977	A	Intron 10	c.583-112G>A		rs3775306	8
C>C/T	chr4:187204447	T	Intron 11	c.974-799C>T		rs12498667	8
T>T/A	chr4:187204525	A	Intron 11	c.974-721T>A		rs12503530	8
C>C/T	chr4:187207354	T	Intron 13	c.1319-215C>T		rs2289251	8
G>G/T	chr4:187207535	T	Intron 13	c.1319-34G>T		rs2289253	9
C>C/A	chr4:187207715	A	Intron 13	c.1414+51C>A		rs2289254	8
C>C/T	chr4:187208874	T	Exon 14	c.1613C>T	<b>p.Pro538Leu</b>	rs139695003	0
A>A/G	chr4:187209559	G	Intron 14	c.1555-48A>G		rs5966	9
G>G/T	chr4:187209702	T	Exon 15	c.1812G>T		rs5971	9
G>G/A	chr4:187209729	A	Exon 15	c.1677G>A		rs5976	6
G>G/C	chr4:187210064	C	3'UTR	c.*296G>C		rs4253430	37
A>A/T	chr4:187210247	T	3'UTR	c.*479A>T		rs1062547	37
C>C/T	chr4:187210870	T	3'	NA		rs4253433	37
C>C/T	chr4:187210990	T	3'	NA		rs4253434	37

**Var: Variante; Loc: localización gen F11; ID: nº identificación.**

\* Frecuencia alélica recogida de los datos de 1000 genomas, Abril 2012 versión 3 (www.1000genomes.org) [Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, Handsaker RE, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. Nature. 2012;491: 56–65].

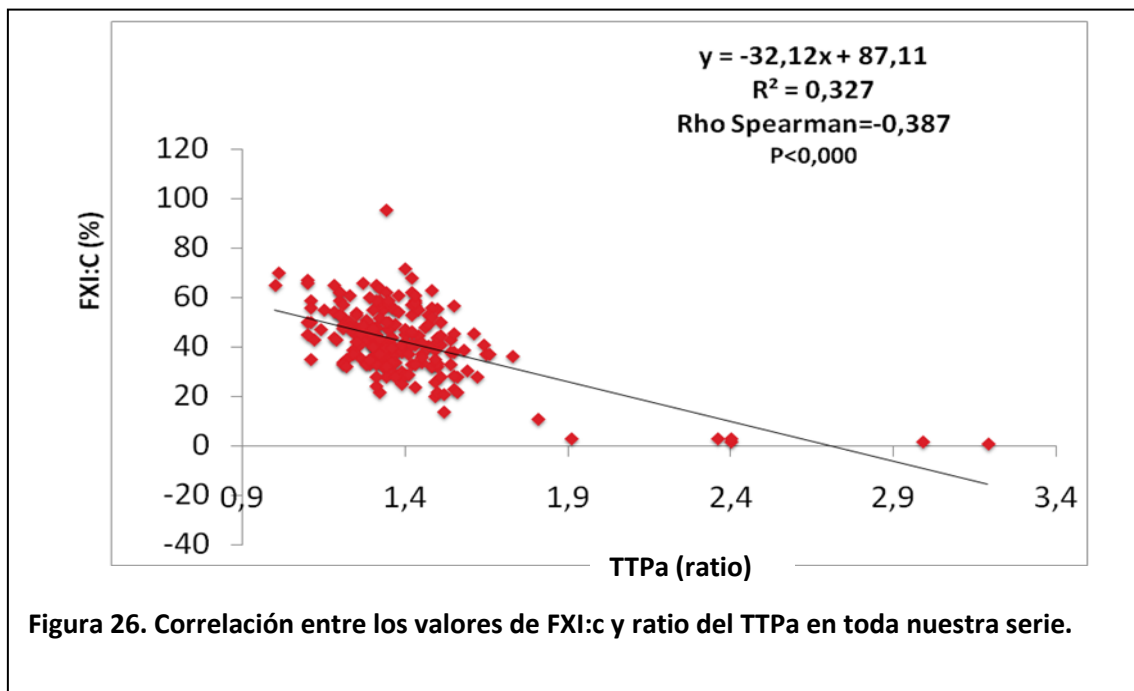


**a) TTPa como método de cribado para la deficiencia de FXI.**

Nuestro proyecto se sustentó en la identificación de pacientes con deficiencia de FXI basada en una prolongación del TTPa, dado que este método de estudio de la coagulación se aplica prácticamente en todas las pruebas pre-quirúrgicas y se solicita de forma rutinaria en un porcentaje elevado de analíticas generales. Además, este método es sensible a alteraciones que afecten a los elementos de la ruta de contacto de la coagulación, ya que se basa precisamente en la activación de la coagulación mediada por esta ruta. De hecho, es el método que ha permitido diagnosticar gran parte de los déficits de FXI descritos en la bibliografía.

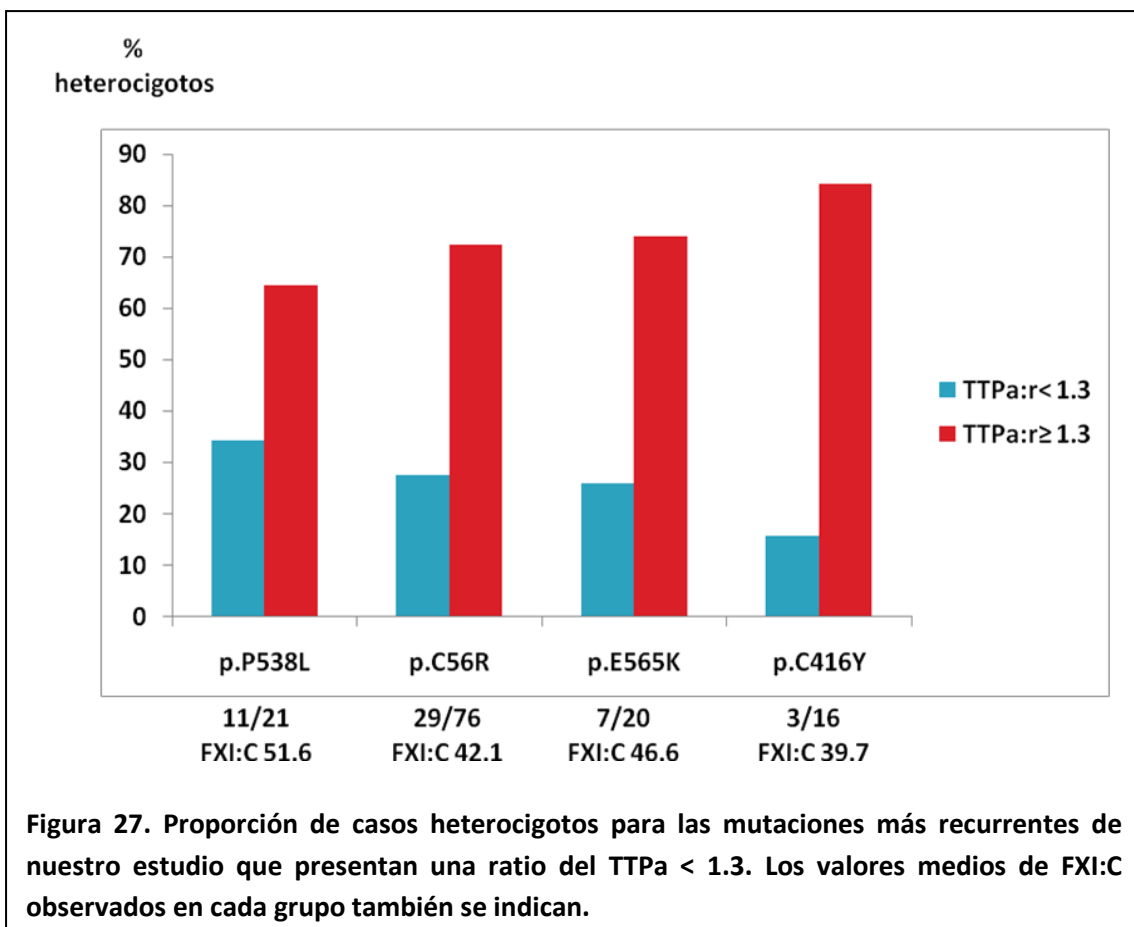
Como ya se ha indicado, todos los casos índice se seleccionaron por presentar un TTPa prolongado (ratio > 1,3) (Tabla 7).

Del primer análisis en los 214 casos con deficiencia de FXI se comprobó que la prolongación del TTPa dependía de forma significativa de los niveles de FXI, dado que en los casos con deficiencia severa (FXI:C < 20%) la prolongación del TTPa es más notoria que en los casos con deficiencia moderada o leve: ratio  $2,23 \pm 0,60$  vs.  $1,35 \pm 0,13$ ; respectivamente ( $p < 0,01$ ). De hecho, observamos una correlación negativa entre los valores de la ratio del TTPa y el FXI:C ( $p < 0,000$  Rho de Spearman:  $-0,387$ ) (Figura 26).



**Figura 26. Correlación entre los valores de FXI:c y ratio del TTPa en toda nuestra serie.**

Destacamos que el parámetro definido para la inclusión de casos con deficiencia de FXI, el TTPa prolongado, resultaba poco específico. De hecho, 54 pacientes con demostrada deficiencia de FXI por estudios moleculares, presentaban un TTPa normal (ratio < 1,3). En otras palabras, el 25,2% de los pacientes con deficiencia de FXI de nuestra serie no se habrían identificado en base al resultado del TTPa. Este resultado muestra claramente que el TTPa no es un fiable para el diagnóstico preciso de la deficiencia de FXI, especialmente en sujetos con deficiencia leve/moderada. Esta limitación diagnóstica fue especialmente destacable para los portadores de la mutación p.Pro538Leu, pues hasta el 34,4% de los pacientes con esta mutación presentaban una ratio de TTPa < 1,3 (Figura 27), porcentaje menor para los portadores heterocigotos del resto de mutaciones recurrentes: 27.6% para los portadores de la mutación p.Cys56Arg; 25,9% para la mutación p.Glu565Lys y solo un 15,8% para la mutación p.Cys416Tyr (Figura 27), posiblemente reflejando la severidad de la deficiencia asociada con estas mutaciones (Tabla 8 y Figura 27).

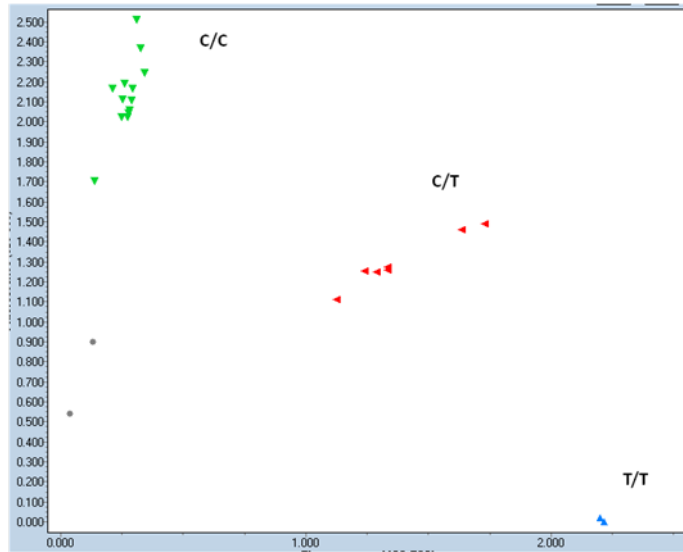


**Figura 27.** Proporción de casos heterocigotos para las mutaciones más recurrentes de nuestro estudio que presentan una ratio del TTPa < 1.3. Los valores medios de FXI:C observados en cada grupo también se indican.

Varias pueden ser las causas que justifiquen este resultado, desde la variabilidad en los niveles de fibrinógeno u otras proteínas procoagulantes y anticoagulantes, a factores adquiridos que interfieran en dicha prueba. Entre todos los potenciales candidatos, los niveles de FXII nos pareció que podría ser un elemento relevante por tres razones:

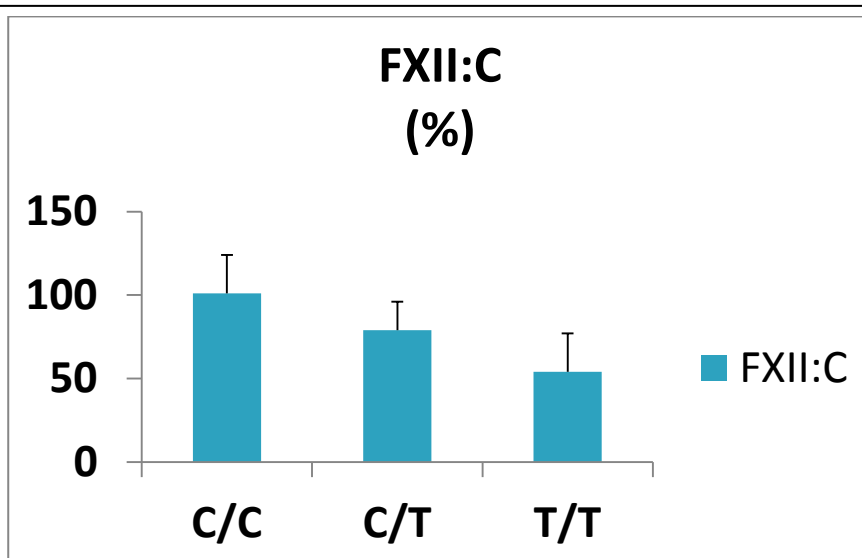
- 1) La primera por ser el primer elemento activado en la ruta de contacto y por tanto el que mayor peso puede tener en el TTPa.
- 2) En segundo lugar por existir en la población Caucásica un polimorfismo frecuente, rs1801020 (MAF: 0.345) que al afectar a la secuencia Kozak del gen *F12* (c.-4 C>T) que codifica para el FXII, tiene un significativo efecto sobre los niveles de FXII en circulación [191,192]. Así, los sujetos con el genotipo homocigoto silvestre (C/C, que en población murciana suponen un 68%) presentan más del doble de FXII en plasma que los sujetos homocigotos mutados (T/T que representan al 4% de nuestra población), presentando los heterocigotos (C/T) valores intermedios [193].
- 3) Pero sobre todo el estudio del FXII y del polimorfismo rs1801020 en los pacientes de nuestra serie con deficiencia de FXI nos pareció relevante porque nuestro grupo ya demostró en población general (de hecho el estudio se realizó en niños, en los que la influencia de factores externos es menos importante), que este polimorfismo afectaba de forma significativa al TTPa, retrasando este tiempo de coagulación en los sujetos portadores de la variante asociada con menores niveles de FXII [194].

Por esta razón, genotipamos el polimorfismo rs1801020 del *F12* en los pacientes con deficiencia de FXI identificados en nuestro estudio. El estudio se realizó empleando una sonda Taqman que permitía un genotipado inequívoco de este polimorfismo (Figura 28).



**Figura 28. Genotipado del polimorfismo rs1801020 c. -4 C>T del gen *F12* mediante sonda Taqman®. Se muestra la distribución de los tres genotipos identificados en el estudio: homocigoto normal (verde C/C) heterocigoto (rojo C/T) y homocigoto mutado (azul T/T).**

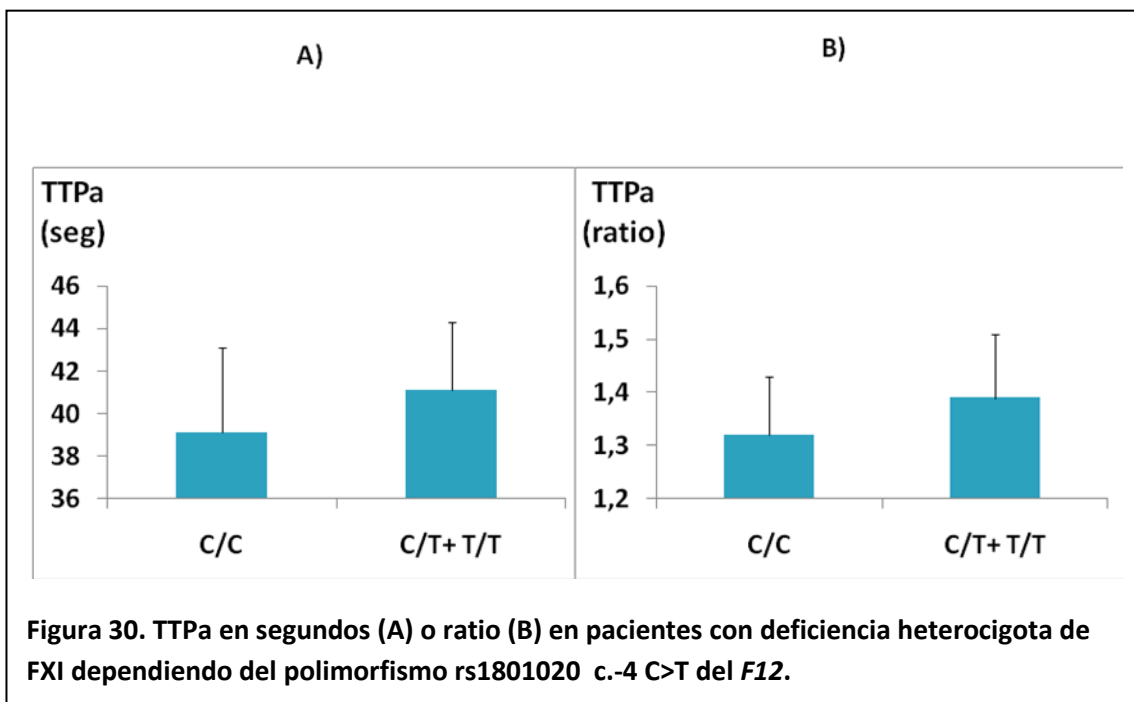
Las prevalencias de cada genotipo obviamente se encuentran sesgadas por tratarse de un estudio de familiares, y por tanto no pueden compararse con la prevalencia de este polimorfismo en la población general. No obstante, el efecto funcional de este polimorfismo era el descrito y por ello, los portadores del alelo T en nuestra serie presentaban menores niveles de FXII en plasma que los portadores del genotipo



**Figura 29. Niveles de FXII (FXII:C) en pacientes con deficiencia heterocigota de FXI dependiendo del polimorfismo rs1801020 c.-4 C>T del *F12*.**

ancestral (C/C) (Figura 29).

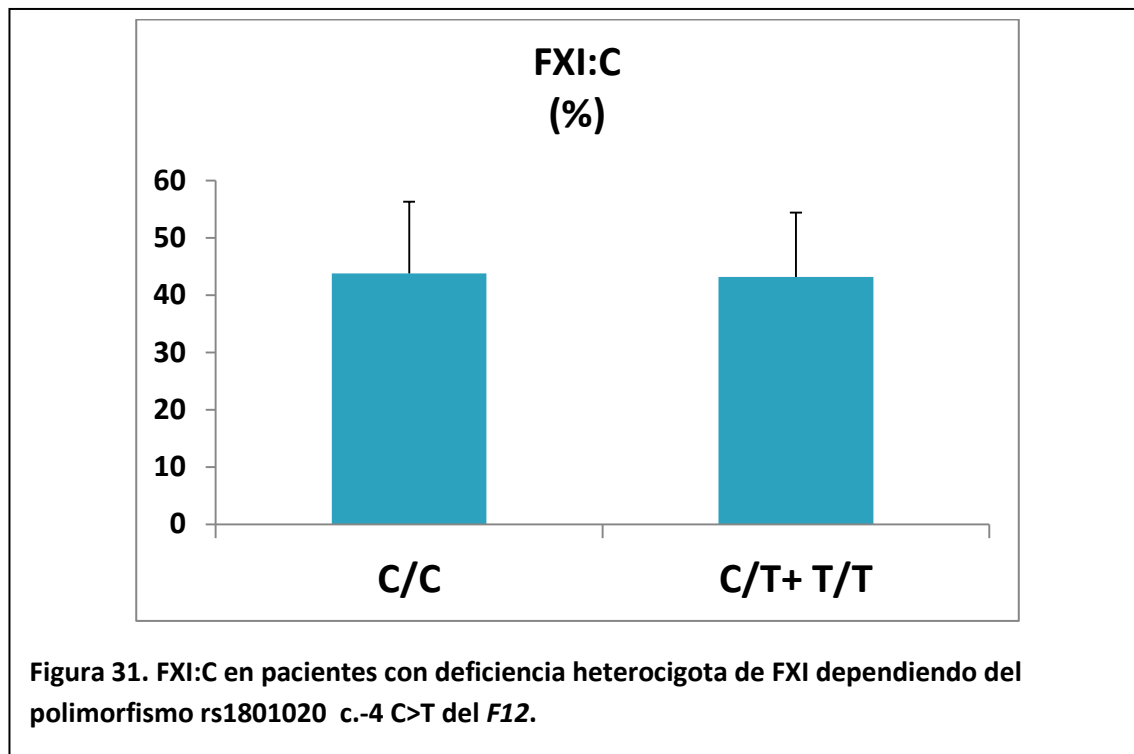
Cuando analizamos el papel de este polimorfismo en el TTPa que presentan los pacientes con deficiencia de FXI, observamos que la presencia del alelo mutado del *F12* (T) se asociaba con una prolongación estadísticamente significativa del TTPa, tanto en tiempos absolutos como en el valor de la ratio ( $p < 0,05$  en los dos casos) (Figura 30). Este estudio se realizó exclusivamente en los sujetos heterocigotos, ya que la deficiencia severa de FXI causada por alteraciones en homocigosis o heterocigosis compuesta tenía un peso específico *per se* en ese parámetro como ya hemos comentado.



**Figura 30. TTPa en segundos (A) o ratio (B) en pacientes con deficiencia heterocigota de FXI dependiendo del polimorfismo rs1801020 c.-4 C>T del *F12*.**

Sin embargo, el polimorfismo rs1801020 del *F12* no tenía efectos significativos sobre los niveles de FXI:C (Figura 31), puesto que para esta prueba, el plasma del paciente se diluye en plasma deficiente de FXI que uniforma los niveles de FXII.





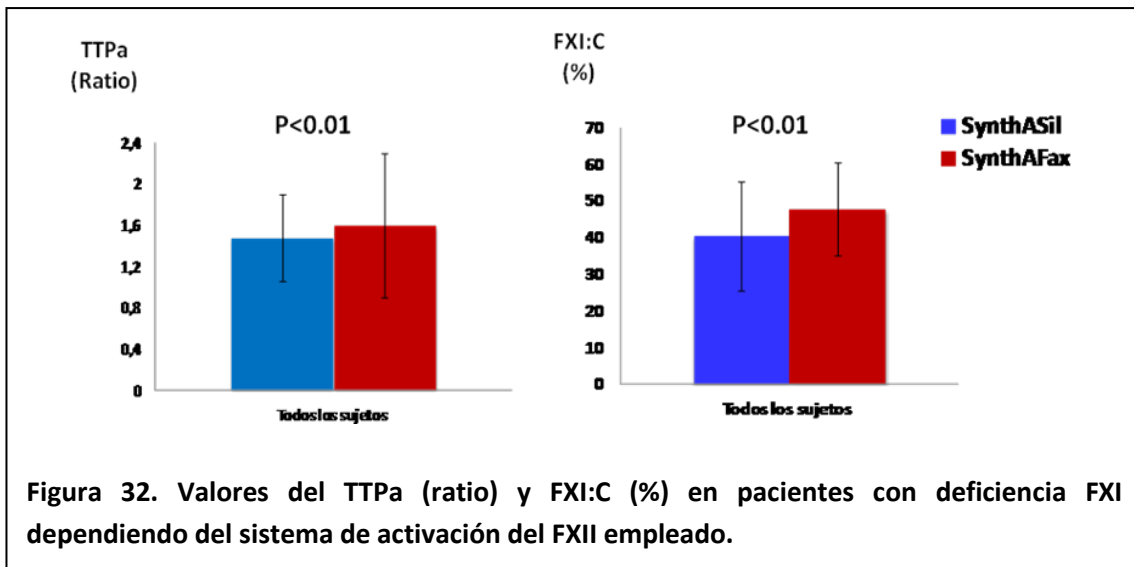
**b) Método de cribado de la deficiencia de FXI. Papel de diferentes activadores de la ruta de contacto**

En este apartado quisimos evaluar si el cambio del activador de la ruta de contacto, disponible en diferentes sistemas comerciales, podría tener influencia en el diagnóstico de la deficiencia de FXI. El objetivo último era disponer de un método diagnóstico más preciso y específico. Para ello empleamos dos sistemas comerciales de la misma empresa (IL): SynthASil™ que emplea sílica micronizada, y SynthAFax™ en el que el activador del FXII es el ácido elágico. El estudio se realizó el mismo día, con el mismo lote de reactivos, la misma calibración y cloruro cálcico, y en el mismo coagulómetro (ACL Top 500 del Servicio de Hematología y Oncología Médica del Hospital Universitario Morales Meseguer) con plasma citratado de 140 pacientes con deficiencia de FXI, 6 homocigotos, 3 heterocigotos compuestos y 131 heterocigotos portadores de 42 alteraciones genéticas diferentes. Todas las muestras se habían procesado en menos de 24 horas tras su extracción en una muestra diferente de las que se utilizaron para su diagnóstico (en todos los casos recogidas entre 2015 y 2016), y el plasma fue congelado en alícuotas a -80°C hasta su estudio. Los resultados observados se resumen en la tabla 14.

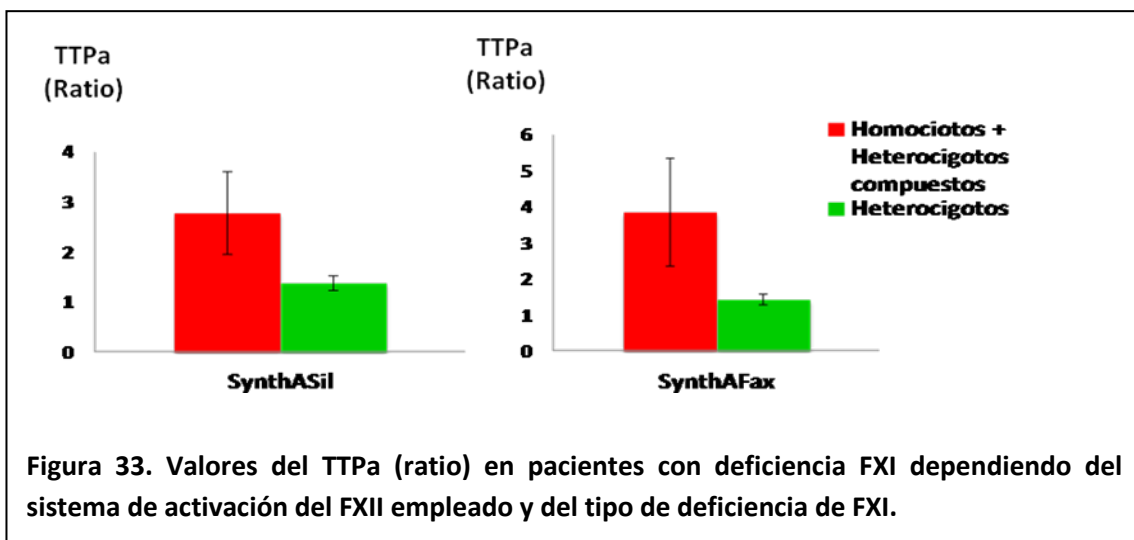
**Tabla 14.** Comparación de los resultados de TTPa (tanto en segundos como en ratio) y FXI:C obtenidos con SinthASil y SinthAFax en los pacientes con deficiencia de FXI incluidos en nuestro estudio.

	TTPa (segundos)		TTPa (ratio)		FXI:C (%)	
	SinthASil	SinthAFax	SinthASil	SinthAFax	SinthASil	SinthAFax
<b>Todos los sujetos (n=140)</b>	44.64±12.75 (29.4-15.9)	36.40±16.23 (26.7-132.6)	1.48±0.42 (0.98-3.86)	1.60±0.7 (1.18-5.84)	40.4±14.9 (0.40-73.1)	47.7±12.7 (12.0-83.3)
<b>p</b>	<b>&lt; 0.01</b>		<b>&lt; 0.01</b>		<b>&lt; 0.01</b>	
<b>Todos los homocigotos (n=9)</b>	84.03±25.07 (47.1-115.9)	87.77±34.27 (43.3-132.6)	2.8±0.83 (1.57-3.8)	3.86±1.5 (1.91-.84)	4.45±5.67 (0.40-12.9)	<b>17.93±1.81</b> (16-19.6)
<b>p</b>	<b>0.85</b>		<b>0.10</b>		<b>No comparable, error en SinthAFax para deficiencia severa</b>	
<b>Homocigotos p.P538L (n=3)</b>	52.13±5.26 (47.10-57.6)	46.66±5.23 (43.3-57.2)	1.73±0.17 (1.57-1.92)	2.05±0.22 (1.91-2.32)	11.96±1.28 (10.5-12.9)	17.93±1.81 (16-16.9)
<b>p</b>	<b>0.10</b>		<b>0.10</b>		<b>0.10</b>	
<b>Homocigotos severos* (n=6)</b>	99.98±8.88 (90.4-115.9)	108.33±18.6 (82.2-132.6)	3.33±0.29 (3.01-3.86)	4.77±0.82 (3.62-5.84)	0.7±0.36 (0.4-1.40)	<b>ERROR</b>
<b>p</b>	<b>0.34</b>		<b>0.02</b>		<b>No comparable, error en SinthAFax para deficiencia severa</b>	
<b>Todos los heterocigotos (n=131)</b>	41.92±4.40 (29.40-55.1)	32.85±3.50 (26.7-44.7)	1.39±0.14 (0.98-1.84)	1.44±0.15 (1.18-1.97)	42.82±11.8 (11.4-73.1)	48.42±12 (12-83.3)
<b>p</b>	<b>&lt; 0.01</b>		<b>&lt; 0.01</b>		<b>&lt; 0.01</b>	
<b>Heterocigoto p.C56R (n=51)</b>	41,70±3.31 (35,20-51,1)	33,20±3,05 (27,1-42,9)	1,38±0.11 (1,17-1,70)	1,46±0,13 (1,19-1,89)	37,91±8.33 (19,7-65,5)	44,11±8,87 (18,3-71)
<b>P</b>	<b>&lt; 0.01</b>		<b>&lt; 0.01</b>		<b>&lt; 0.01</b>	
<b>Heterocigoto p.P538L (n=29)</b>	39,78±4.20 (29,4-52,4)	31,08±2,4 (27,6-37,1)	1,32±0.14 (0,98-1,75)	1,36±0,10 (1,22-1,63)	53,73±10.3 (31,7-73,1)	61,15±9,97 (44-83,3)
<b>p</b>	<b>&lt; 0.01</b>		<b>0.01</b>		<b>&lt; 0.01</b>	
<b>Heterocigoto p.E565K (n=19)</b>	42,84±5.42 (36,9-55,1)	33,38±4,30 (26,7-42,3)	1,42±0.18 (1,23-1,84)	1,45±0,18 (1,18-1,86)	40,46±11.1 (22-70,9)	40,91±11.3 (12-70,2)
<b>p</b>	<b>&lt; 0.01</b>		<b>0.15</b>		<b>0.04</b>	
<b>Heterocigoto p.C416Y (n=18)</b>	43,58±5.23 (35,40-54,3)	34,53±4,63 (29,6-44,7)	1,45±0.17 (1,18-1,81)	1,52±0,20 (1,30-1,97)	42,58±12.0 (23,9-68,8)	46,7±9,81 (27,5-66,7)
<b>p</b>	<b>&lt; 0.01</b>		<b>0.01</b>		<b>0.01</b>	

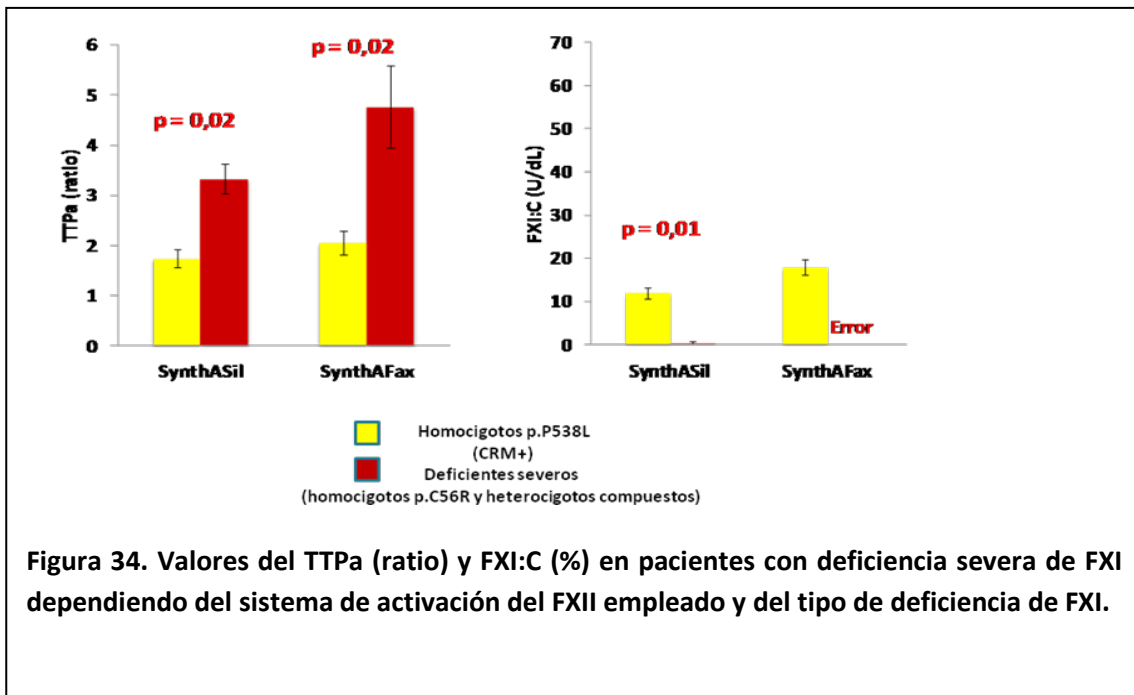
El primer resultado importante que obtenemos de nuestro estudio es que SynthAFax genera resultados significativamente más altos que SynthASil para la ratio del TTPa y para el FXI:C en pacientes con deficiencia de FXI ( $p < 0,01$  para los dos parámetros) (Figura 32).



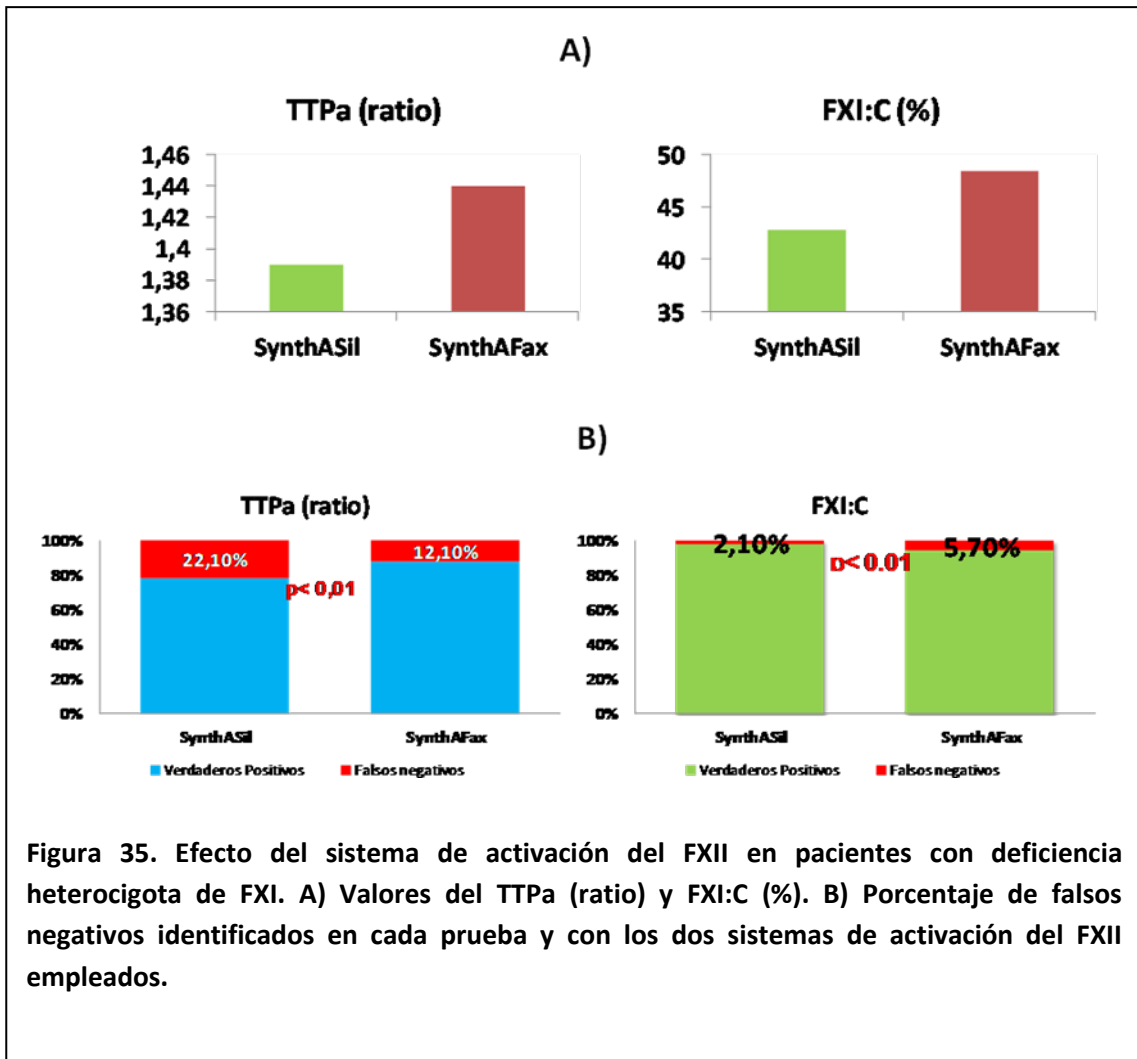
Como era esperable, y para ambos sistemas de activación, los homocigotos y heterocigotos compuestos presentan TTPa significativamente más prolongados que los heterocigotos, con ratios que siempre superan el 2, por lo que su diagnóstico es sencillo (Figura 33).



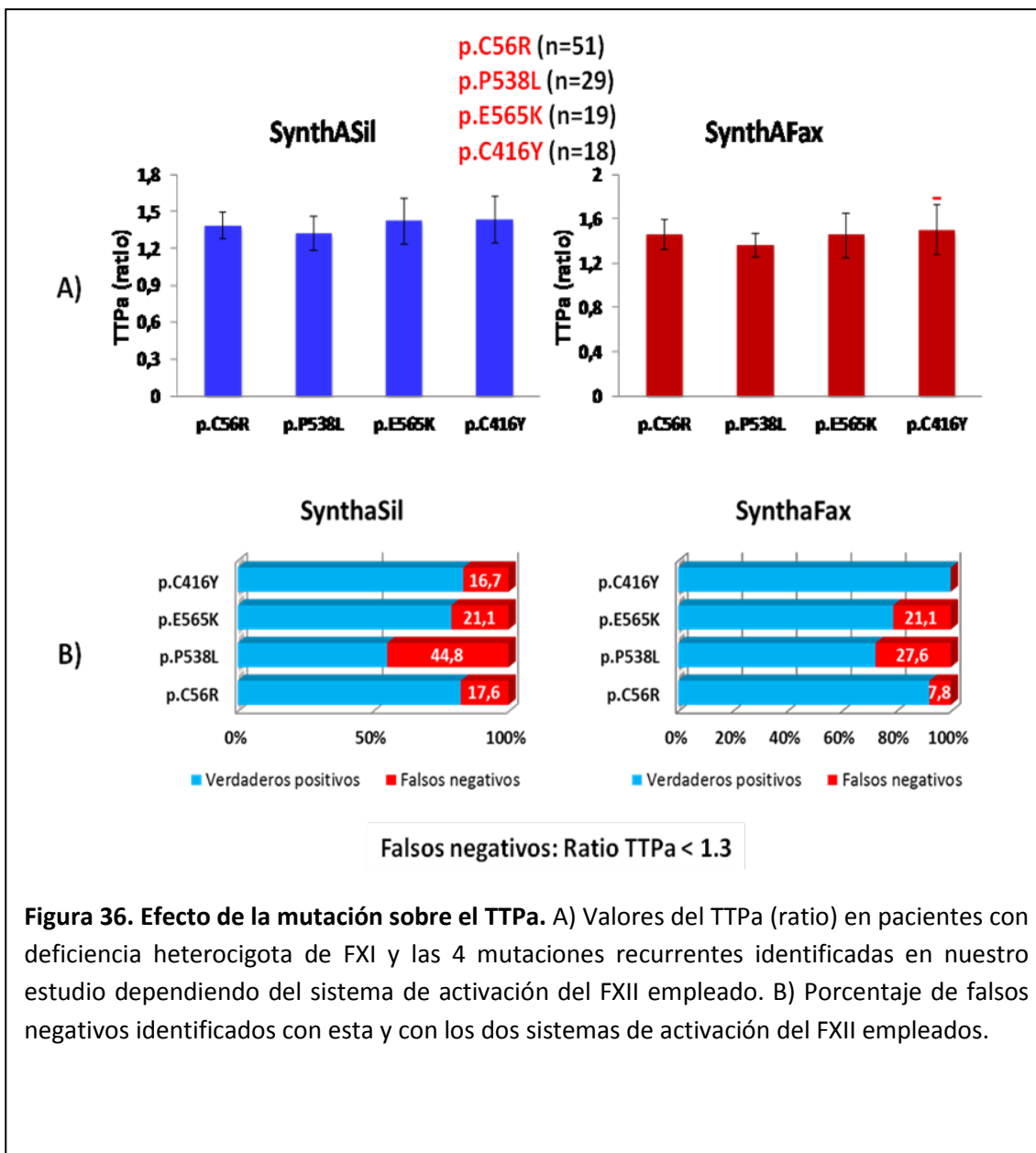
Si profundizamos en el grupo de casos con deficiencia severa, observamos diferencias significativas entre los deficientes severos (homocigotos p.Cys56Arg y heterocigotos compuestos) respecto a homocigotos p.Pro535Leu. Los primeros presentan ratio de TTPa mas altas con los dos sistemas y niveles de FXI:C más bajos con SynthASil, no pudiéndose cuantificar si se emplea SynthAFax (Figura 34).



Pero mucha más relevancia diagnóstica tienen los resultados observados en heterocigotos, porque estos casos son mucho más frecuentes en la población (recordemos, más del 1% según estimamos). En primer lugar destacamos que el diagnóstico de la deficiencia moderada de FXI por el TTPa puede ser complicada, especialmente si se emplea SynthASil, ya que hasta un 22% de los casos no llamarían la atención por tener una ratio < 1,3, porcentaje significativamente menor si se emplea SynthAFax (12.1%) (Figura 35). También los resultados son diferentes si analizamos el FXI:C. En este caso con SynthAFax, el número de casos con deficiencia molecular que tendrían niveles dentro del rango de normalidad (FXI:C >70%) llegarían a casi el 6%, casi el triple que con SynthASil (p< 0.01) (Figura 35).

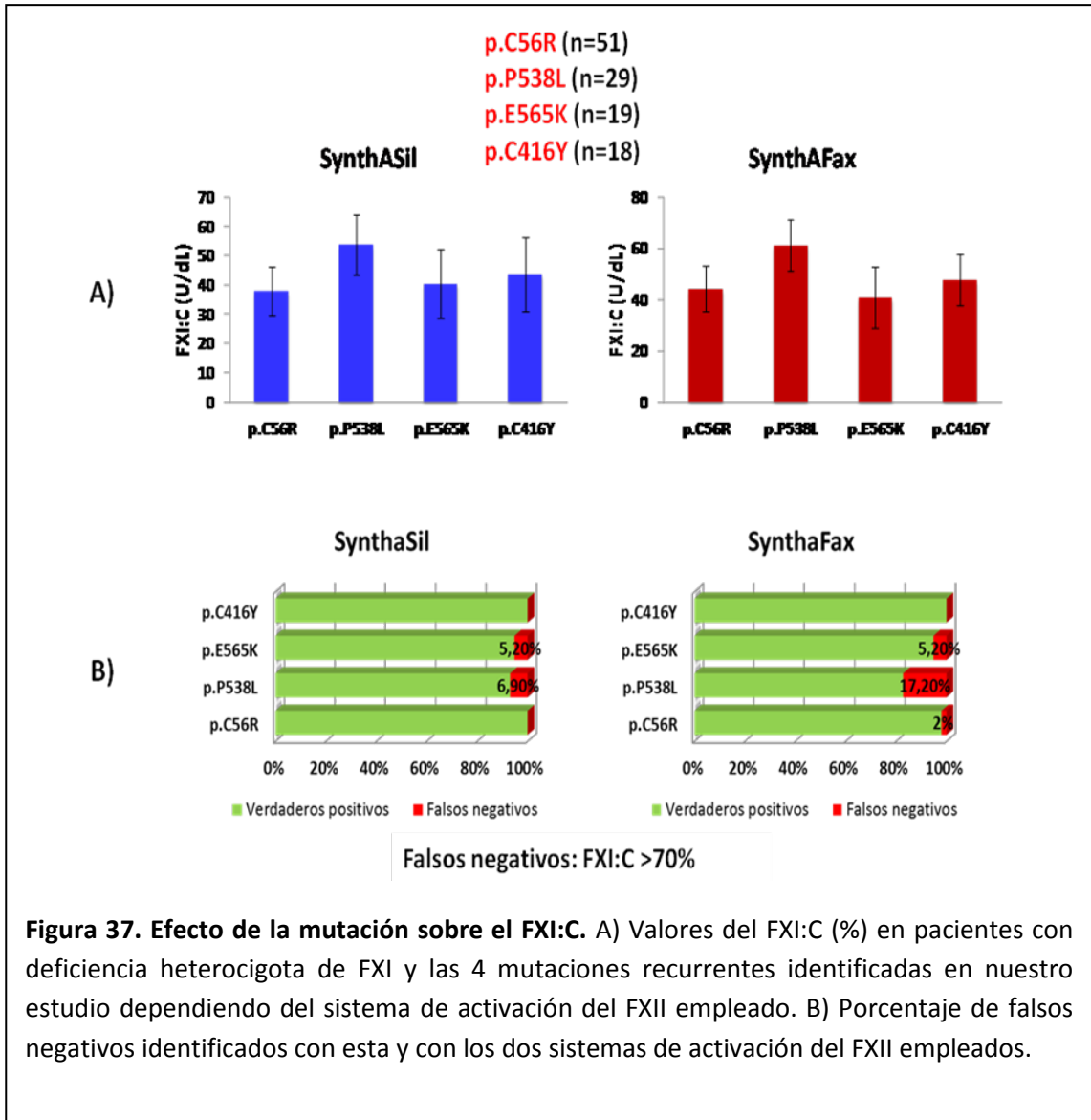


Si el estudio lo restringimos a los heterocigotos de las 4 mutaciones recurrentes, observamos que los portadores de la mutación p.Pro538Leu son los que presentan un TTPa más corto con los dos sistemas de activación y por tanto los que mayor tasa de falsos negativos daría este método (Figura 36), porque presentan mayores niveles de FXI:C.



**Figura 36. Efecto de la mutación sobre el TTPa.** A) Valores del TTPa (ratio) en pacientes con deficiencia heterocigota de FXI y las 4 mutaciones recurrentes identificadas en nuestro estudio dependiendo del sistema de activación del FXII empleado. B) Porcentaje de falsos negativos identificados con esta y con los dos sistemas de activación del FXII empleados.

Por esta misma razón, también los portadores de la mutación p.Pro538Leu son también los que mayor tasa de falsos negativos también presentarían con el método FXI:C empleando cualquiera de los dos sistemas de activación del FXII (Figura 37).



Finalmente, el peso del polimorfismo del FXII en el TTPa determinado por los dos métodos es diferente. Mientras que este polimorfismo retrasaba significativamente el TTPa (tanto en valores absolutos como en ratio) si se empleaba SynthaSil (Tabla 15A), el polimorfismo funcional del FXII tenía menor efecto si se empleaba SynthaFax (Tabla 15B). Sin embargo, y como se esperaba, este polimorfismo no ejercía ningún efecto sobre los niveles de FXI:C determinados por cualquiera de los dos métodos (Tabla 15).

**Tabla 15.** Comparación de los resultados de TTPa (en segundos y ratio), TTPa ratio y valores de FXI:C (%) obtenidos con SinthASil (A) y SynthAFax (B), según presenten o no el polimorfismo rs1801020 del *F12*.

A)

SinthASil	Genotipo rs1801020	N	TTPa (Segundos)	TTPa (ratio)	FXI:C (%)
Todos los heterocigotos (n=131)	CC	89	41.33±4.45	1.37±0.14	42.99±12.70
	CT&TT	42	43.20±4.05	1.44±0.13	42.46 ± 9.65
p			<b>0.02</b>	<b>0.02</b>	0.81
Heterocigoto p.C56R (N=51)	CC	36	41.23± 3.61	1.37±0.12	36.7±8.34
	CT&TT	15	42.82± 2.22	1.43±0.07	40.77±7.86
p			0.12	0.11	0.11
Heterocigoto p.P538L (n=29)	CC	23	39.2±3.61	1.31±0.12	54.66±10.45
	CT&TT	6	42.48±6.04	1.42±0.2	50.2±9.71
p			0.38	0.31	0.32
Heterocigoto p.E565K (n=19)	CC	12	42.98±5.16	1.43±0.17	40.85±11.92
	CT&TT	7	42.61±6.26	1.42±0.21	39.81±10.55
p			0.86	0.89	1.00
Heterocigoto p.C416Y (n=18)	CC	11	43.21±5.7	1.44±0.19	41.40±11.99
	CT&TT	7	44.17±4.79	1.47±0.16	44.46±12.78
p			0.55	0.55	0.49



B)

SynthAFax	Genotipo rs1801020	N	TTPa (segundos)	TTPa (ratio)	FXI:C (%)
<b>Todos los heterocigotos (n=131)</b>	CC	89	32.77 ± 3.44	1.44 ± 0.15	48.60 ± 3.07
	CT&TT	42	33.02 ± 3.66	1.45 ± 0.16	48.06 ± 9.6
<b>p</b>			0.70	0.67	0.81
<b>Heterocigotos p.C56R (N=51)</b>	CC	36	33.4 ± 3.27	1.47 ± 0.14	42.84 ± 9.13
	CT&TT	15	32.7 ± 2.5	1.44 ± 0.11	47.15 ± 7.68
<b>p</b>			0.45	0.46	0.11
<b>Heterocigotos p.P538L (n=29)</b>	CC	23	31.01 ± 2.25	1.37 ± 0.1	62.3 ± 9.7
	CT&TT	6	31.4 ± 3.32	1.38 ± 0.15	56.92 ± 9.6
<b>p</b>			0.86	0.83	0.32
<b>Heterocigotos p.E565K (n=19)</b>	CC	12	33.20 ± 4.22	1.46 ± 0.18	39.95 ± 13.07
	CT&TT	7	32.74 ± 5.16	1.44 ± 0.23	42.55 ± 8.04
<b>p</b>			0.55	0.55	0.42
<b>Heterocigotos p.C416Y (n=18)</b>	CC	11	34.28 ± 4.38	1.51 ± 0.19	45.54 ± 8.38
	Kozak	7	34.94 ± 5.35	1.54 ± 0.24	48.63 ± 2.21
<b>p</b>			0.89	0.92	0.34

### Importancia clínica de la deficiencia de FXI

La importancia clínica de la deficiencia de FXI se analizará con dos perspectivas: el papel que tiene en patología hemorrágica y en patología trombótica.

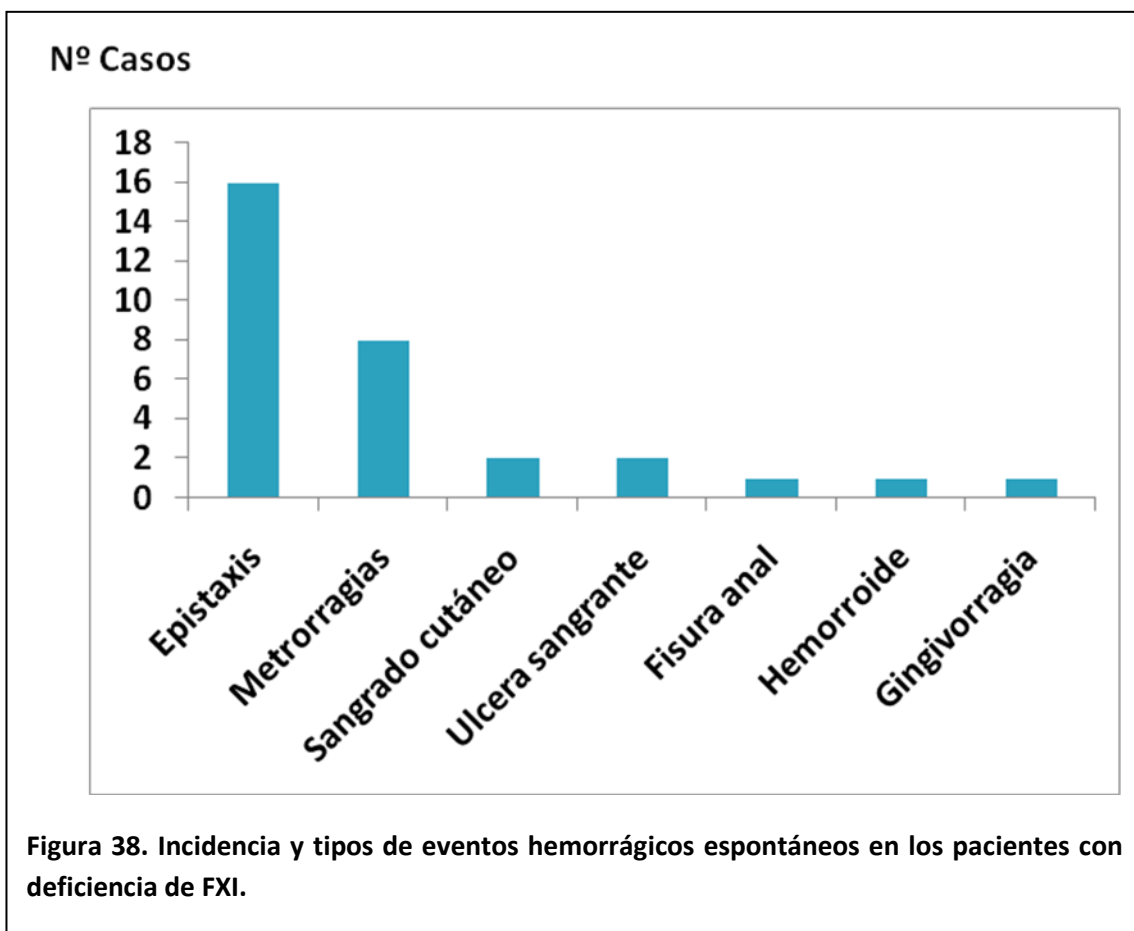
#### a) Deficiencia de FXI y riesgo hemorrágico.

Existen amplias evidencias del moderado riesgo hemorrágico asociado con la deficiencia de FXI, aunque la mayoría de estudios se han realizado en pacientes con deficiencia severa y mayoritariamente de poblaciones con una mutación recurrente predominante [195,196].

Nuestro estudio en relación con el riesgo hemorrágico se enfocó con tres perspectivas diferentes: por una parte estudiar el efecto en el riesgo hemorrágico espontáneo o asociado con situaciones de riesgo; por otra evaluar el beneficio del tratamiento profiláctico del plasma fresco congelado y otras terapias antihemorrágicas; y finalmente a valorar el efecto del tratamiento anticoagulante con cumarínicos y antiagregantes en estos pacientes.

### 1.- Riesgo hemorrágico.

La incidencia de hemorrágicas espontáneas en nuestra serie de 214 pacientes con deficiencia de FXI es muy baja. Tan solo 29 casos (13.7%) indicaron eventos hemorrágicos espontáneos, mayoritariamente epistaxis (en 16 de ellos) seguidos de metrorragias (en 8 casos) (Figura 38).



Es llamativo que solo 2 de los 10 sujetos homocigotos o heterocigotos compuestos y deficiencia severa (20% de estos casos) presentaron eventos hemorrágicos espontáneos.

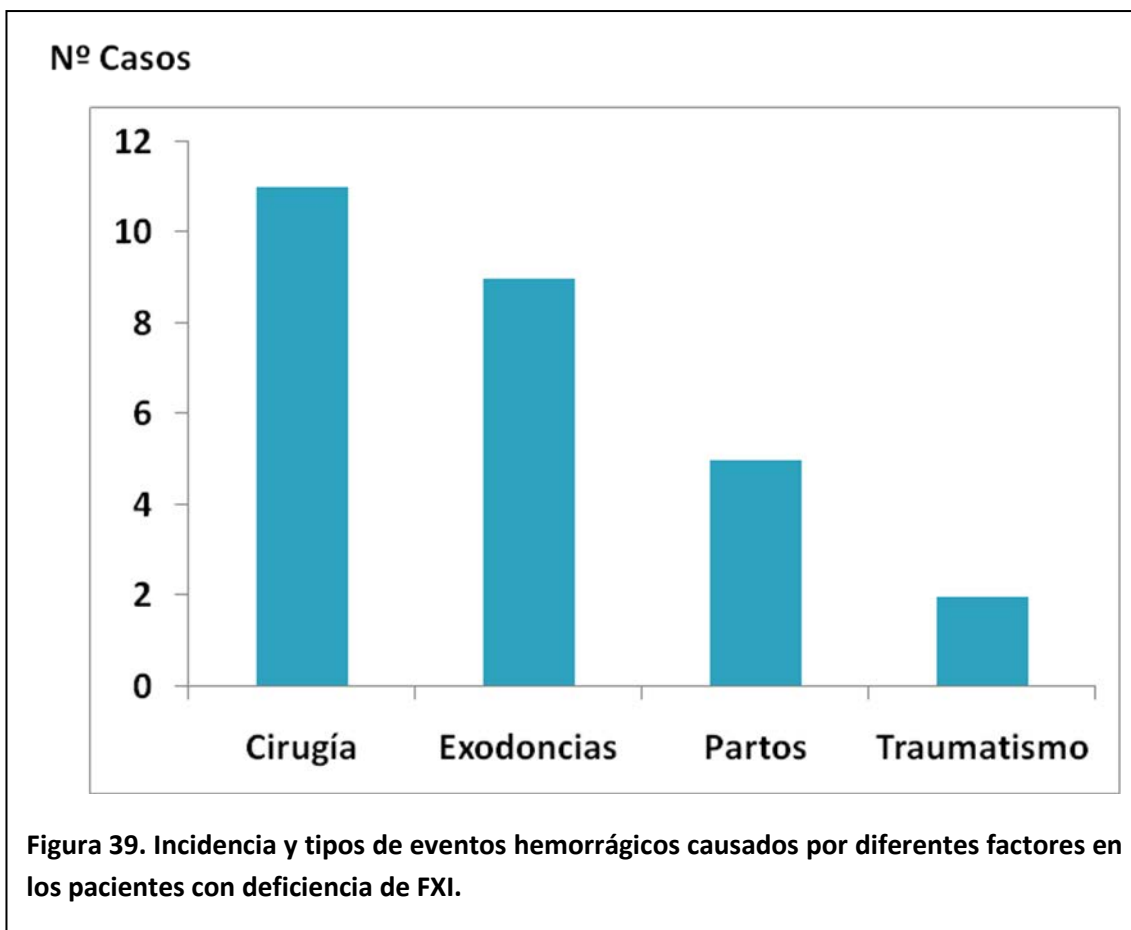
Los niveles de FXI no tienen que ver con el riesgo de hemorragia espontánea ya que los niveles de FXI:C son similares en los casos que tuvieron hemorragia espontánea ( $41,6 \pm 13,7\%$ ) que en los que no describen eventos hemorrágicos espontáneos ( $43,0 \pm 13,6\%$ ).

El papel del grupo ABO en el riesgo hemorrágico de los pacientes con deficiencia de FXI nunca se ha evaluado. Sin embargo, no parece desempeñar un papel relevante de acuerdo con nuestros resultados ya que el grupo sanguíneo O, asociado con mayor riesgo hemorrágico por tener menores niveles de factor von Willebrand y FVIII [197], no está más representado en el grupo de pacientes con deficiencia de FXI que han tenido hemorragias, sino que incluso es más frecuente en los que no las han tenido (38,5% vs. 54,6%).

Merece la pena destacar la baja incidencia de metrorragias entre las mujeres con deficiencia de FXI. De las 81 mujeres con deficiencia de FXI incluidas en nuestro estudio solo 8 reportan metrorragias (10%).

Si analizamos las hemorragias provocadas por situaciones de riesgo, tampoco observamos una importante incidencia de eventos hemorrágicos. Tan solo 28 casos con deficiencia de FXI presentaron hemorragias en situaciones de riesgo (Figura 39). La mayor parte de estos eventos se produce tras intervención quirúrgica. Doce casos presentaron hematomas o hemorragias post-quirúrgicas, si bien es un porcentaje bajo de los 126 casos que han presentado algún tipo de intervención quirúrgica (8,7%), resultado que se reduce aún más si atendemos a las 207 intervenciones realizadas en estos pacientes, ya que supone el 5,8% de complicaciones hemorrágicas en intervenciones quirúrgicas de pacientes con deficiencia de FXI. Además, las complicaciones de estos eventos son escasas, ya que solo 3 pacientes precisaron de terapia transfusional. En un caso fue necesaria re-intervención por la extensión del hematoma, y solo identificamos un único caso con una hemorragia grave: un sujeto homocigoto para la mutación p.Pro538Leu que presentó un hemiperitoneo post-

herniorrafia. Solo un paciente con deficiencia severa de FXI presentó sangrado post quirúrgico, pero el sangrado fue moderado. Entre los pacientes que presentaron hemorragia o hematoma post-quirúrgico, no observamos mayor incidencia de grupo 0, o una mayor deficiencia de FXI, o un mayor alargamiento del TTPa (Tabla 16).



**Tabla 16.** Características de los pacientes con deficiencia de FXI que han presentado intervenciones quirúrgicas.

<i>Hemorragia</i>	<b>N</b>	<b>AB0: 0/No0</b>	<b>FXI:C (%)</b>	<b>TTPa (ratio)</b>	<b>Trasfusión</b>
<b>Si</b>	11	4/6	38.8±18.6	1.54±0.49	3 casos
<b>No</b>	114	46/43	42.9±13.0	1.38±0.24	
<b>p</b>		0.525	0.492	0.313	

El porcentaje de casos que presentaron hemorragia tras una exodoncia no es alto (9/77 casos: 11,7%), porcentaje que baja si atendemos al número de exodoncias

realizadas (19 eventos hemorrágicos de 181 extracciones documentadas: 10,5% de las intervenciones). Ninguno de los parámetros analizados, niveles de FXI (solo hay un deficiente severo que sangra en estas intervenciones), grupo ABO y TTPa mostraban relación con el riesgo hemorrágico en pacientes con deficiencia de FXI sometidos a exodoncias (Tabla 17). Ninguno de los dos casos con extracción completa de las piezas dentales presentó hemorragias. Es importante destacar que en ninguno de los casos con hemorragias tras exodoncia fue preciso realizar ninguna intervención adicional.

**Tabla 17.** Características de los pacientes con deficiencia de FXI que han presentado exodoncias

<i>Hemorragia</i>	<b>N</b>	<b>AB0: 0/No0</b>	<b>FXI:C (%)</b>	<b>TTPa (ratio)</b>
<b>Si</b>	9	5/4	36.6±16.4	1.52±0.33
<b>No</b>	68	34/28	42.4±15.1	1.40±0.19
<b>p</b>		0.999	0.339	0.310

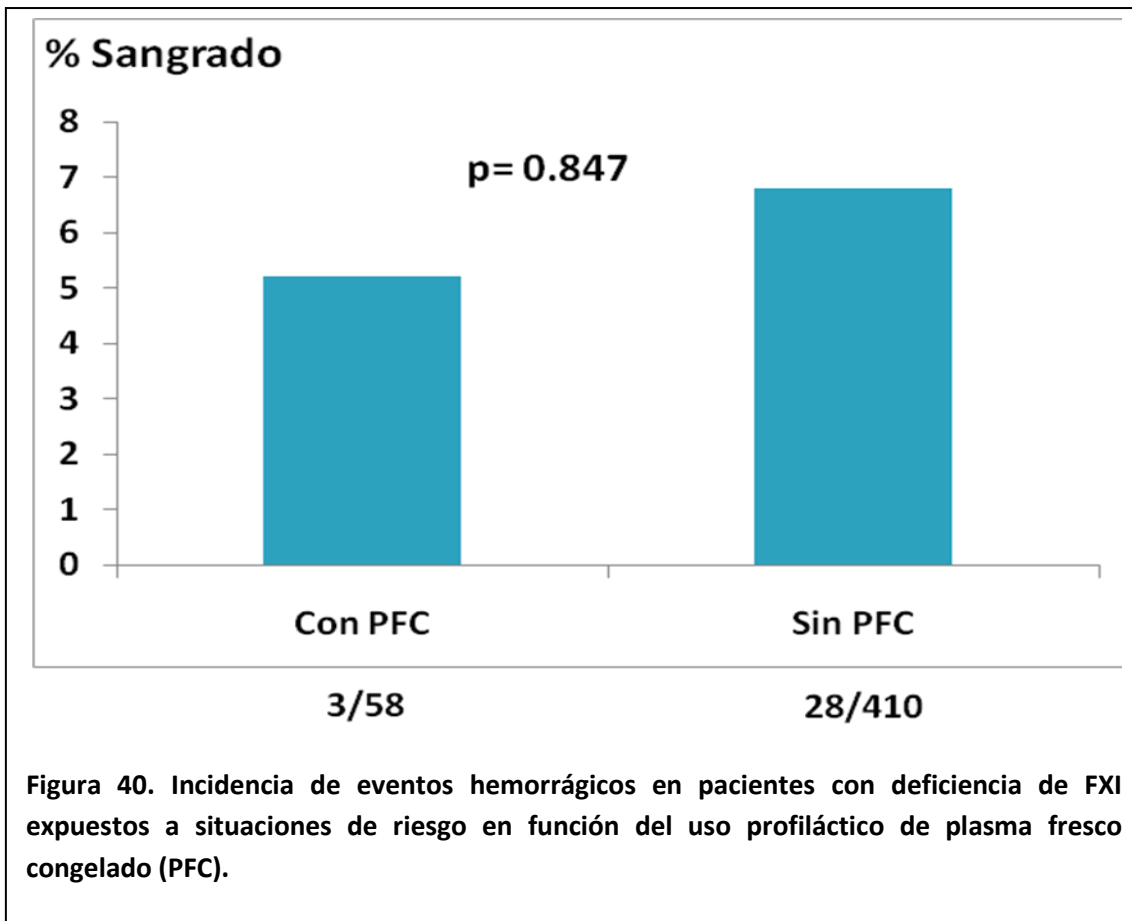
50 mujeres, 1 homocigota, otra doble heterocigota y el resto heterocigotas, dieron a luz en 122 ocasiones, 3 gemelares, y solo en 5 de ellas se presentó hemorragia postparto que precisó transfusión de hematíes en 2 ocasiones (Figura 39). Es interesante destacar que dos de los pacientes homocigotos uno tuvo 2 pares de gemelos y otro gemelos y trillizos.

Finalmente, dos pacientes presentaron hemorragias post-traumáticas (Figura 39).

## **2.- Tratamiento profiláctico antihemorrágico.**

Dos han sido los tratamientos de profilaxis antihemorrágicas empleados en 64 pacientes con deficiencia de FXI en situaciones de riesgo, amchafibrin (ácido tranexámico) y plasma fresco congelado. El ácido tranexámico se aplicó a 6 pacientes, ninguno con deficiencia severa. En 3 casos se administró antes de exodoncias y en 3 prequirúrgico, y ninguno de ellos presentó complicaciones hemorrágicas. El uso de plasma fresco congelado fue mayor, ya que se administró profilácticamente en 58 ocasiones, 3 partos, 4 exodoncias y 51 operaciones. Se aplicó a 5 de los casos con

deficiencia severa. A pesar de esta profilaxis antihemorrágica, se objetivaron complicaciones hemorrágicas en 3 casos sometidos a cirugía, incluyendo el caso con hemiperitoneo tras herniorrafia, un caso tras una apendicitis que además precisó de soporte transfusional por la hemorragia, y un gran hematoma tras operación por un fibroadenoma. Por tanto, las complicaciones hemorrágicas en pacientes con deficiencia de FXI con profilaxis con plasma fresco congelado fueron escasas (5,2%), pero tenemos que destacar que la incidencia de hemorragias no fue mayor en los 410 situaciones de riesgo en las que no se aplicó profilaxis antihemorrágicas (28/410: 6,8%) ( $p= 0,847$ ) (Figura 40).



Sin embargo, el uso de plasma fresco congelado puede tener efectos adversos destacados. De hecho, en dos de los pacientes a los que se administró este producto se objetivaron daño pulmonar agudo relacionado con la transfusión. La lesión pulmonar aguda asociada transfusión (LPAT o TRALI) es un edema pulmonar de origen no

cardiogénico, producido por la transferencia pasiva de anticuerpos antigranulocitos o anti HLA del donante al receptor, a través del plasma contenido en el componente sanguíneo transfundido. Los anticuerpos del donante reaccionan con los neutrófilos en el pulmón del receptor, dando lugar a la agregación y la activación de los neutrófilos en la microcirculación pulmonar.

Los neutrófilos activados liberan sustancias que producen una alteración de la permeabilidad vascular y un síndrome de encharcamiento capilar pulmonar, acabando en un edema pulmonar no cardiogénico, con un cuadro clínico similar al del distress respiratorio del adulto con signos clínicos y radiológicos de edema agudo de pulmón. El diagnóstico se realiza por exclusión descartando otras causas de edema agudo de pulmón como una sobrecarga de líquidos o fallo cardíaco por infarto de miocardio [198].

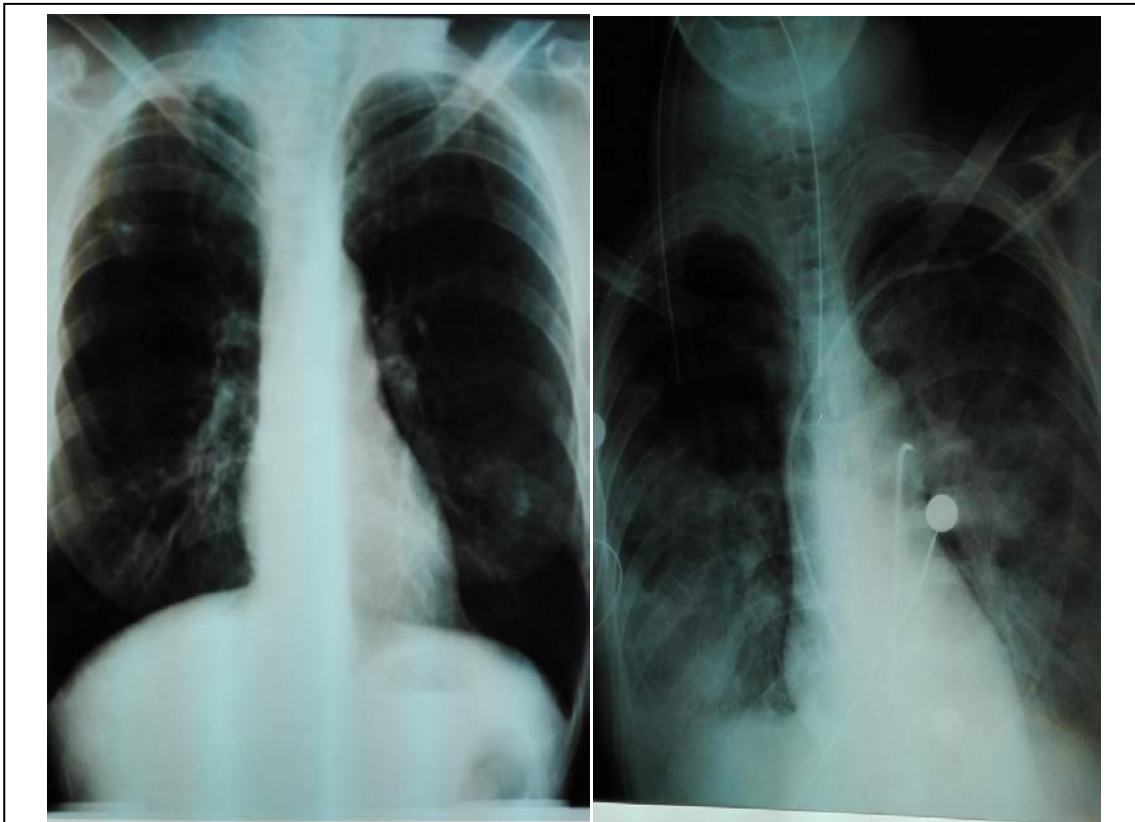
La gravedad de efecto adverso merece una descripción detallada de estos dos casos:

#### **CASO Nº1**

Mujer actualmente de 68 años que a la edad de 50 años y presentando un déficit del FXI del 25% portadora de la mutación p.Cys56Arg en heterocigosis. Fue operada por padecer un carcinoma de ovario bilateral, prescribiéndole la transfusión profiláctica de tres unidades de PFC previamente a la intervención y otras tres unidades 12 horas después. Se le realizó histerectomía con doble anesectomía, ooforectomía y linfedectomía sin incidencias durante la intervención.

Tras la intervención quirúrgica, la paciente pasó a la unidad de reanimación donde permaneció estable hasta que coincidiendo con el final de la administración de la última unidad de PFC presentó un cuadro de tiritona y fiebre, acompañado de insuficiencia respiratoria que precisó intubación orotraqueal y ventilación mecánica. En la analítica destacó una gasometría con  $SO_2$  de 58%,  $pO_2$  de 36 mmHg y  $pCO_2$  de 39,5 mmHg, en la Rx de tórax apareció una infiltración exudativa algodonosa bilateral con una PVC de +2 (Figura 41), por lo que se diagnosticó de Distress Respiratorio del Adulto y fue tratada con Drogas vasoactivas (Noradrenalida, Dopamina y Dobutamina).

La paciente evolucionó favorablemente de su cuadro respiratorio, al cuarto día se le retiraron las drogas vasoactivas y se extubó sin incidencias.



**Figura 41. Documentación radiológica de la insuficiencia respiratoria causada por el TRALI en el caso nº1 con deficiencia de FXI. En la izquierda radiografía previa de la paciente. En la derecha imagen tras el cuadro de insuficiencia respiratoria postransfusional, donde destaca una infiltración exudativa alveolar bilateral**

Posteriormente se ha realizado tipaje HLA a la paciente: (A\*30,\*68/B\*13,\*53/DRB1\*01,\*13) y determinación de anticuerpos en los tres donantes de las segundas unidades de plasma siendo negativos en dos de ellos y encontrando en la otra donante: Anticuerpos Anti-A33,34,66,25,29,26,43,32,31,74,68,69,B7,DQ3,5,6,4,DR16,13,51,01,15,12,52,8,4,14,10 y DR11 con MFI<sub>max</sub>=12500. Estos resultados permitieron concluir que los anticuerpos anti-DR-13 (MFI=9400), DQ6 (MFI=5950) y A-68 (MFI=3300) encontrados en la donante son contra antígenos portados por la receptora del plasma.



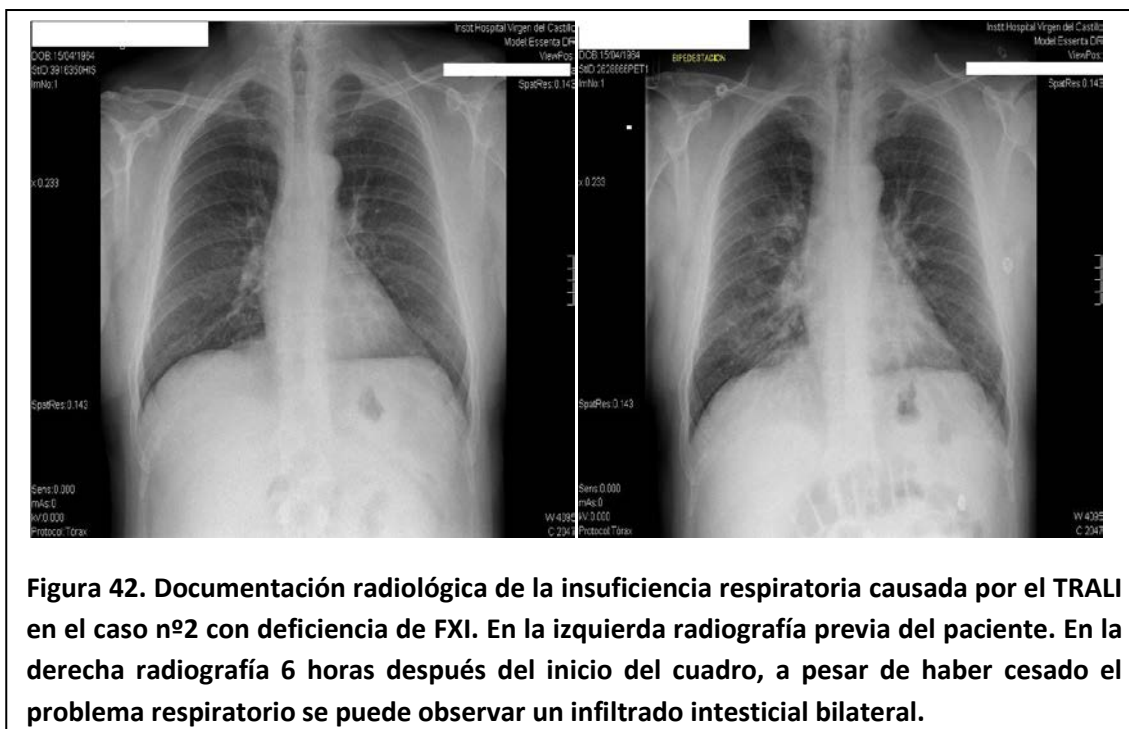
## CASO Nº2-

Varón de 50 años, actualmente 52, con déficit severo de FXI del 1% causado por la mutación p.Cys56Arg en homocigosis, que ingresa en la unidad de cirugía ambulatoria programado para transfundirle, previamente a colonoscopia con resección de pólipo, cuatro unidades de plasma fresco congelado. A los 30 minutos tras la administración de la última unidad presenta cefalea con palidez, FR 27 y desaturación al 75-80 % y disminución del murmullo vesicular.

En la analítica presentó una gasometría con pO<sub>2</sub> 40,2 mmHg pCO<sub>2</sub> 36,9 mmHg y SO<sub>2</sub> 75,5%. No hubo alteraciones en el hemograma, el estudio de coagulación, la orina y la bilirrubina fue 0,2.

El paciente fue tratado de forma inmediata con Hidrocortisona, Paracetamol, y Oxigenoterapia con lo que la SO<sub>2</sub> mejoró al 90% y también el cuadro clínico.

La radiografía de tórax realizada 6 horas después todavía dejaba ver un infiltrado intersticial bilateral (Figura 42) y unas horas después el paciente fue dado de alta a su domicilio.



**Figura 42. Documentación radiológica de la insuficiencia respiratoria causada por el TRALI en el caso nº2 con deficiencia de FXI. En la izquierda radiografía previa del paciente. En la derecha radiografía 6 horas después del inicio del cuadro, a pesar de haber cesado el problema respiratorio se puede observar un infiltrado intersticial bilateral.**

Se realizó tipaje HLA en el paciente y fue: HLA-A\*02,\*68//B\*14,\*44//DRB1\*01,- y el estudio de anticuerpos anti-HLA en tres de los donantes fue negativo pero en el cuarto se detectaron anticuerpos anti HLA B7,81,27,40,13,47,48,A2 y A68 con MFI<sub>max</sub>= 7500. Concluyendo que los anticuerpos anti A2 y A68 son dirigidos contra antígenos del receptor de la transfusión.

### **3.- Terapia anticoagulante y antiagregante en pacientes con déficit de FXI.**

No existe información sobre las consecuencias que el tratamiento anticoagulante que reduce los niveles funcionales de las proteínas dependientes de vitamina K pudiera tener en pacientes con niveles reducidos de FXI por causas genéticas. Tampoco hay datos sobre el efecto sinérgico que pudieran tener las terapias antiagregantes con la deficiencia de FXI en cuanto al esperado incremento en el riesgo de sangrado.

Por ello, nos pareció interesante estudiar el comportamiento y las características clínicas de los 9 pacientes con deficiencia de FXI (uno de ellos con deficiencia severa causada por la mutación p.Pro538Leu en homocigosis) (Tabla 18) que a lo largo de los 20 años del estudio han sido expuestos a terapia anticoagulante (uno de ellos en dos ocasiones distintas), mayoritariamente por fibrilación auricular. Es interesante destacar que 3 casos además de la terapia anticoagulante presentaban terapia antiagregante con ácido acetil salicílico (AAS), clopidogrel, o con doble antiagregación (AAS más clopidogrel, en un caso) (Tabla 18). En ninguno de los casos, uno de los cuales ha estado más de 15 años con terapia anticoagulante, se ha objetivado ningún episodio de sangrado (Tabla 18). En total han recibido acenocumarol durante 382 meses, estando con INR superior a 2 durante 317,2 meses sin ningún evento hemorrágico. La dosis necesaria de sintrom para alcanzar el INR diana no ha sido menor del esperado para las características de los pacientes y el ajuste ha sido correcto (Tabla 18).

**Tabla 18.** Características de los pacientes con deficiencia de FXI que han presentado sido tratados con terapia anticoagulante oral (TAO: Sintrom). El tratamiento con terapias antiagregantes en tres de estos pacientes también se indica. SCASEST (síndrome coronario agudo sin elevación del ST); F.A. (fibrilación auricular); AIT (accidente isquémico transitorio); ACVA (accidente cerebrovascular agudo); TVP (trombosis venosa profunda); TGA (transposición de grandes arterias); EP (estenosis pulmonar).

<i>Mutación (estatus)</i>	<i>FXI:C (%)</i>	<i>Diagnóstico</i>	<i>Edad</i>	<i>TAO (meses)</i>	<i>Dosis Semana</i>	<i>% INR&gt;2</i>	<i>Meses INR&gt;2</i>	<i>Antiagreg</i>
p.P538L (Homoc)	23	FLUTTER AU, SCASEST	68	2	10,5	66	1,4	AAS y Clopidogrel
p.C56R (Het)	50	F.A, By-pass	70	9	11	92	8,5	Clopidogrel
p.C416Y (Het)	24	F.A. AIT repetición pese INR 3,2	80-85	56	3,5-6	75	45	
p.C599Y (Het)	47	F.A.	79	6	11	85	5,5	
p.C416Y (Het)	70	F.A. ACVA	58-73	186	26-16	88	159	
p.C56R (Het)	31	TVP	34	4	7	83	3,3	
p.C416Y (Het)	40	F.A.	63-68	67	28-35	88	56	
Ins 1600 (Het)	46	Post intev ventrículo único, TGA y EP	7	31	14	55	23	AAS
		post stent	26	3	29	40	1,5	AAS
p.R268C (Het)	35	F.A	68-69	18	16	80	14	

*Antiagreg: Terapia antiagregante concomitante.*

## **b) Deficiencia de FXI y riesgo trombótico.**

Este apartado se ha dividido en dos grandes secciones: trombosis arterial y venosa

### **1. Trombosis arterial.**

La incidencia de eventos trombóticos arteriales, tanto accidentes isquémicos cerebrovasculares (AICV) como enfermedad cardiovascular, especialmente infarto agudo de miocardio (IAM), en sujetos con deficiencia de FXI fue elevada.

Hemos registrado 6 casos de IAM, lo que supone una incidencia del 2,8%. Los pacientes con IAM tenían una edad media de 69±13 años, 4 eran varones (67%) y presentaban una alta incidencia de factores de riesgo cardiovascular (Tabla 19). Dos pacientes eran homocigotos para la mutación p.Pro538Leu, presentan una TTPa ratio promedio de 1,32±0,19 y una actividad del FXI de 37,8±17,9%. El resto de sujetos con deficiencia de FXI que no han sufrido IAM (N= 208), tienen una media de edad de 41±22 años, el 53% son hombres, presentan una TTPa ratio promedio de 1,39±0,25, una actividad del FXI de 42,6±13,6%, y una menor incidencia de factores de riesgo cardiovascular (Tabla 19).

**Tabla 19.** Características clínicas y demográficas de los sujetos con deficiencia de FXI que han sufrido un infarto agudo de miocardio o síndrome coronario agudo.

<b>IAM</b>	<b>N</b>	<b>Varones (%)</b>	<b>Edad</b>	<b>TTPa (ratio)</b>	<b>FXI:C (%)</b>	<b>HT (%)</b>	<b>HC (%)</b>	<b>Fum (%)</b>	<b>Diab (%)</b>
<b>Si</b>	6	4/6 (67%)	68±13	1.32±0.19	37.8±17.9	4/6 (67%)	4/6 (67%)	2/4 (50%)	3/6 (50%)
<b>No</b>	208	111/208 (53%)	42±22	1.39±0.25	42.6±13.6	25/205 (12%)	27/203 (13%)	40/195 (21%)	14/203 (7%)
<b>p</b>		0.688	0.003	0.885	0.542	0.004	0.005	0.190	0.008

Hemos registrado 8 casos de AICV, lo que supone una incidencia del 3,7%. Los pacientes con AICV tenían una edad media de 74±21 años, 4 eran varones (50%) y presentaban una alta incidencia hipertensión arterial (Tabla 20). Un paciente era homocigoto para la mutación p.Pro538Leu y otro paciente era heterocigoto compuesto (p.Cys56Arg & p.Cys416Tyr), presentaban una TTPa ratio promedio de 1,56±0,61 y una actividad del FXI de 35,0±21,0%. El resto de sujetos con deficiencia de FXI que no han sufrido AICV (N= 204), tenían menor edad media (41±22 años), el 54% son hombres, presentaban una TTPa ratio promedio de 1,38±0,22, una actividad del FXI de 42.7±13.4%, y una menor incidencia de factores de riesgo cardiovascular (Tabla 20).

**Tabla 20.** Característica clínicas y demográficas de los sujetos con deficiencia de FXI que han sufrido un accidente isquémico cerebrovascular.

<b>AICV</b>	<b>N</b>	<b>Varones (%)</b>	<b>Edad</b>	<b>TTPa (ratio)</b>	<b>FXI:C (%)</b>	<b>HT (%)</b>	<b>HC (%)</b>	<b>Fum (%)</b>	<b>Diab (%)</b>
<b>Si</b>	8	4/8 (50%)	73±22	1.56±0.61	35.3±21.0	4/8 (50%)	2/8 (25%)	1/6 (17%)	1/8 (13%)
<b>No</b>	204	110/208 (54%)	41±21	1.38±0.22	42.7±13.4	25/202 (12%)	29/201 (14%)	41/193 (21%)	16/201 (8%)
<b>p</b>		0.999	0.004	0.045	0.353	0.014	0.338	0.999	0.499

Tres pacientes presentaron tanto IAM como AICV, uno de ellos homocigoto p.Pro538Leu.

## 2. Trombosis venosa

Solo dos de los 214 pacientes recogidos y con una mediana de edad de 42 años han presentado eventos tromboticos localizados en territorio venoso. La escasa incidencia de estos eventos nos lleva a presentar individualmente cada uno de estos dos casos, ya que en los dos existen factores predisponentes que justifican los eventos tromboticos.

### CASO 1

Mujer de 72 años diagnosticada de déficit heterocigótico del FXI de la coagulación, con 53% de actividad y portadora heterocigota de la mutación p.Cys416Tyr, hermana de una paciente doblemente heterocigótica para este déficit.

Sin hábitos tóxicos, hipertensión arterial, diabetes ni dislipemia, con antecedentes de padecer asma y depresión y habiendo sido intervenida de colecistectomía, herniorrafia umbilical, fisura anal, ooforectomía y cataratas en ojo izquierdo.

Seis meses después de la intervención de cataratas, teniendo hasta ese momento un postoperatorio sin problemas y recuperando la visión normalmente, nota bruscamente pérdida de la agudeza visual en el ojo izquierdo y es diagnosticada de trombosis de la vena temporal inferior de la retina con afectación macular.

No tenía poliglobulia, en el estudio de coagulación no tenía más alteración que el moderado alargamiento del TTPa ya conocido, las pruebas de hipercoagulabilidad fueron negativas, y el resto de analítica rutinaria fue normal. El ecocardiograma (ECG) fue normal, con cavidades y válvulas cardíacas normales, sin trombosis intracavitarias.

La paciente fue tratada con fotocoagulación con láser Argón y diclofenaco, para favorecer la cicatrización en el área del edema y el secado del mismo y paulatinamente fue mejorando la visión en ese ojo.

## **CASO 2**

Hombre de 33 años, con retraso madurativo y destreza fina disminuida. Por su profesión (camarero) pasa mucho tiempo de pie, y padece desde hace años en las dos extremidades inferiores un síndrome varicoso importante con úlceras sangrantes que había sido evaluado en varias ocasiones en el servicio de cirugía vascular del hospital de referencia. Años antes había sido diagnosticado de déficit heterocigoto de FXI con una actividad coagulante del 31% causada por la mutación p.Cys56Arg.

Ingresó por presentar un aumento progresivo del tamaño de la extremidad inferior derecha con dolor y signos inflamatorios a nivel infrarotuliano. La analítica rutinaria fue normal así como la radiografía de tórax y el ECG.

En la ecografía Doppler de las extremidades inferiores además de unas adenopatías de apariencia reactivas y que eran iguales a las que tenía en ecografías de años anteriores, se aprecian signos de trombosis venosa profunda que afecta al tercio medio y distal de la vena femoral superficial y a la vena poplitea de la pierna derecha (Figura 43).



El paciente fue tratado con heparina de bajo peso molecular (HBPM) y posteriormente con acenocumarol, evolucionando rápidamente de forma favorable con desaparición de la tumefacción en la pierna derecha. Estuvo anticoagulado durante 4 meses.

Posteriormente, se realizó estudios de trombofilia dando todos ellos un resultado negativo.

En relación con el papel que la deficiencia de FXI pudiera tener en el riesgo de desarrollo de trombosis, especialmente en territorio venoso, es importante destacar que en la serie de 214 pacientes con deficiencia de FXI incluidos en nuestro estudio detectamos 19 pacientes con polimorfismos protrombóticos. Así, 10 pacientes, 9 de la misma familia, portadores de la mutación p.Pro538L y un portador de la mutación p.Cys56Arg presentaron el FV Leiden en heterocigosis. También identificamos 9 sujetos deficientes de FXI que eran portadores en heterocigosis del polimorfismo protrombótico de la protrombina (G20210A): 5 portadores de la mutación p.Cys56Arg de dos familias diferentes, 2 portadores de la mutación p.Cys416Tyr de una familia, 1 portador de la mutación p.Ile426Thr y 1 portador de la mutación p.Glu565Lys. Las características demográficas de estos pacientes quedan resumidas en la Tabla 21. A pesar de presentar estos polimorfismos protrombóticos, y de haber tenido otros factores de riesgo trombótico, como 14 embarazos (dos con cesáreas), 19 cirugías, y dos pacientes con tumores (un portador del FV Leiden sometido a radioterapia por glioma cerebral y un portador de la protrombina G20210A que presentó cáncer de mama y fue operada dos veces) (Tabla 21), ninguno de estos pacientes presentaron eventos trombóticos venosos o arteriales.

**Tabla 21.** Característica clínicas y demográficas de los sujetos con deficiencia de FXI portadores de un polimorfismo protrombótico.

<i>Polimorfismo protrombótico</i>	<b>N</b>	<b>Varones</b>	<b>Edad</b>	<b>TTPa (ratio)</b>	<b>FXI:C (%)</b>	<b>Cirugías</b>	<b>Partos</b>	<b>Tumor</b>
<b>FV Leiden +/-</b>	10	5	45±15	1.30±0.16	42.0±12.2	13	6	1
<b>PT 20210 +/-</b>	9	5	29±20	1.36±0.09	37.4±10.2	6	8	1



# DISCUSIÓN



## DISCUSIÓN

La exposición de la sangre a superficies artificiales como el vidrio acelera su coagulación. Hace más de 50 años que se conocen los elementos de la cascada de coagulación que forman parte de esta vía de activación conocida como ruta de contacto o vía intrínseca (Figura 1): El FXII, la prekalikreína, el kininógeno y el FXI. Clásicamente, se considera que la ruta de contacto se inicia por la autoactivación del FXII en superficies cargadas negativamente como hemos visto en la introducción de este trabajo. El FXII activado (FXIIa) activa a su vez a la prekalikreína plasmática a kalikreína, en un mecanismo de retroalimentación positiva ya que la kalikreína activa nuevas moléculas de FXII. Concurrentemente, el FXIIa activa proteolíticamente al FXI, generando la forma activa FXIa que es un eficiente activador del FIX. El FIX es un elemento ya de la ruta común de coagulación que finalmente lleva a la formación de trombina con la consiguiente generación del coagulo de fibrina (Figura 44). Además de las dos serín proteasas (FXIIa y FXIa) y de la kalikreína, la ruta de contacto cuenta con una proteína auxiliar, el kininógeno de alto peso molecular. Éste es esencial para una eficiente activación de la ruta de contacto, ya que tanto FXI como prekalikreína circulan formando complejos binarios con el kininógeno (Figura 44).

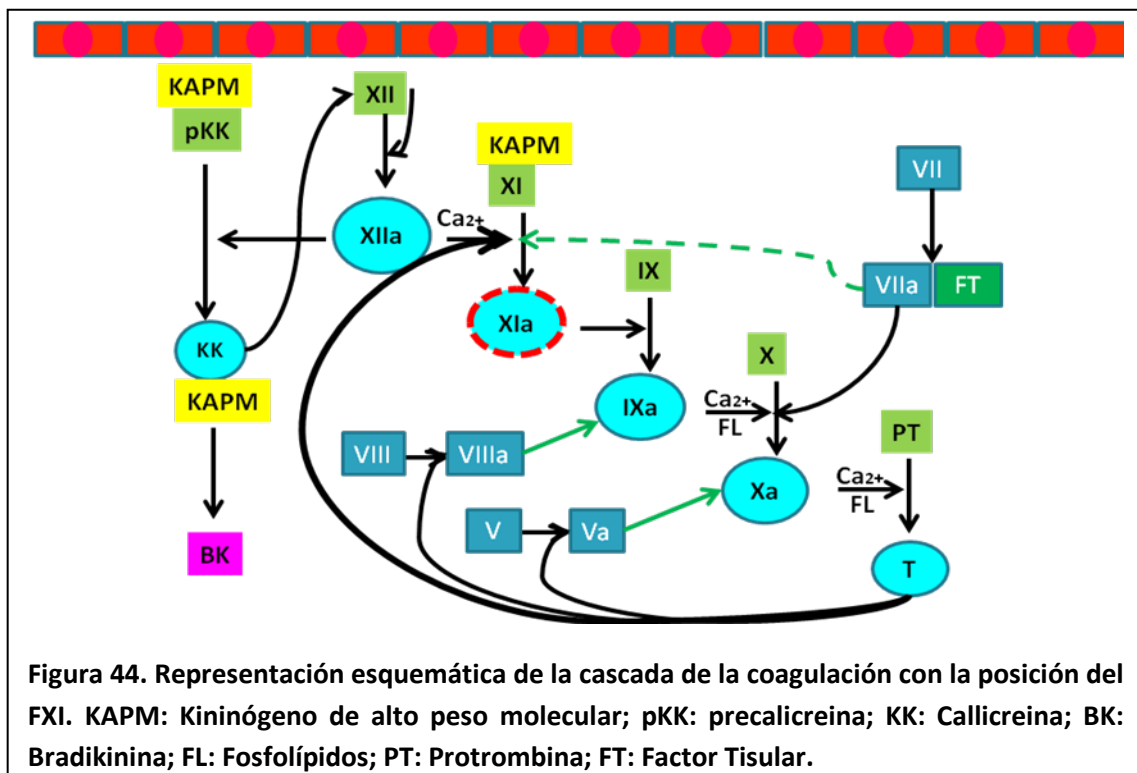


Figura 44. Representación esquemática de la cascada de la coagulación con la posición del FXI. KAPM: Kininógeno de alto peso molecular; pKK: precalicreína; KK: Callicreína; BK: Bradikinina; FL: Fosfolípidos; PT: Protrombina; FT: Factor Tisular.

Pese a los robustos efectos que la activación de la fase de contacto tiene *in vitro* en la coagulación y que han servido de pruebas hemostáticas empleadas de forma rutinaria millones de veces al día en los hospitales de todo el mundo como el TTPa, la relevancia de este sistema *in vivo* fue rápidamente cuestionada al comprobarse que las personas con deficiencia en cualquiera de las proteínas de la fase de contacto: FXII, Prekalikreína, y kininógeno no sufrían hemorragias destacadas [199-202]. Los pacientes con deficiencia de FXI, a pesar de denominarse originariamente hemofilia C, tampoco presentaban una excesiva tasa de sangrados [85,123,124,126]. Además, las superficies artificiales cargadas negativamente que eficientemente activan la ruta de contacto *in vitro*, como el vidrio o el dextrán sulfato, no tienen equivalentes fisiológicos relevantes. De hecho, a finales del siglo XX se planteó incluso eliminar la fase de contacto de la cascada de la coagulación porque se pensaba que no tenía ningún papel en la hemostasia fisiológica, y solo podría tener algún papel en la hemostasia patológica asociada con la sepsis, o en otros sistemas como los de la renina-angiotensina, porque deficiencias del inhibidor C1 del complemento, el principal inhibidor de las proteasas de la fase de contacto, cursan con angioedema pero no suelen tener coagulopatías asociadas [203,204].

No obstante, en la primera década del siglo XXI hemos asistido a un renacimiento de la ruta de contacto, cambiando la perspectiva que los elementos de este sistema pueden tener en el sistema hemostático y en otros sistemas. Así, especialmente sustentados en resultados observados en modelos animales, se plantea que la ruta de contacto podría tener un papel relevante en el control de la hemostasia, y que esta ruta podría desempeñar un papel relevante no en la fisiología del sistema hemostático sino en la patología asociada con este sistema, especialmente en la trombosis. De esta forma se justifica el potente efecto protector que se observaba tanto en modelos experimentales de trombosis venosa como arterial en ratones que carecen de FXII o FXI [205,206].

Otro paso en el renacimiento del interés por la fase de contacto fue la identificación de elementos fisiológicos capaces de activar *in vivo* esta ruta, como los polifosfatos o el ARN [207,208].

Nuestro proyecto aporta información relevante que cuestiona conceptos clásicos y abre nuevas perspectivas en este campo, que sin duda contribuirán aún más a destacar un sistema que hasta hace unos años estaba devaluado en hemostasia. Sin embargo, el FXI va adquiriendo cada día más relevancia en hemostasia y trombosis.

### **Base molecular de la deficiencia congénita de FXI**

Desde su descubrimiento en 1953, y a pesar de considerarse una enfermedad rara, se han estudiado muchos casos con deficiencia de FXI. La base molecular de la deficiencia congénita de FXI está bien definida, y se restringe a alteraciones genéticas en el gen codificante: *F11*. No obstante, no se pueden descartar que alteraciones genéticas en otros genes, como por ejemplo el del kininógeno de alto peso molecular, por el papel estabilizador del FXI plasmático que desempeña esta proteína, pudieran estar implicadas si no en casos con deficiencia de FXI, si al menos en modular los niveles circulantes de FXI [209]

Ante un caso con deficiencia congénita de FXI, la búsqueda del defecto molecular causante se inicia en la secuencia del gen *F11*. Tradicionalmente esta búsqueda se restringía a los 15 exones del gen y sus regiones flanqueantes porque la totalidad de las mutaciones descritas se localizan en esas regiones. Fue también nuestra primera estrategia con los casos identificados en nuestro estudio. Las regiones codificantes se consiguen amplificar a partir del ADN genómico con 13 amplicones que se secuencian fácilmente mediante tecnología de Sanger. No obstante, los nuevos sistemas de secuenciación masiva permiten realizar un estudio molecular del conjunto del gen del *F11* de forma rápida y económica aportando información adicional que puede ser de gran importancia, por lo que con toda seguridad, y gracias a su implantación, serán estos métodos los que se empleen de forma rutinaria en el diagnóstico molecular de la deficiencia de FXI.

Independientemente del sistema de secuenciación empleado, nuestro estudio aporta importantes avances en el campo de la base molecular de la deficiencia de FXI. En primer lugar nuestro estudio es el primero que describe una gran duplicación como

causante de la deficiencia de FXI. Hasta la fecha, la mayoría de las mutaciones causantes de deficiencia de FXI son puntuales o pequeñas inserciones o deleciones [139]. De las 226 mutaciones que causan deficiencia de FXI descritas en Junio de 2016 en las dos bases de datos más importantes relacionadas (HGMD: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=F11> y Factor XI.org <http://www.factorxi.org>) la mayoría son mutaciones puntuales o pequeñas inserciones o deleciones. Sólo tres casos con deficiencia de FXI son debidas a grandes alteraciones genéticas: una deleción de 7 Mb que cubre 77 genes, incluyendo el F11 [210], una deleción de 31,5 kb que cubre todo el gen F11 [211] y una deleción de los exones 11 al 15 del F11 [212]. Nuestro estudio identifica la primera gran inserción implicada en la deficiencia de FXI. Como en el caso con deleción de 31.5 Kb, creemos que las secuencias Alu podrían estar implicadas en la alteración molecular que lleva a la inserción identificada en este estudio. Las secuencias Alu son las secuencias repetidas más abundantes en el genoma. Se estiman que existen más de 1 millón de secuencias Alu en el genoma humano, y representan del 5-10% del total del genoma. Se sabe que estas secuencias están implicadas en el 0,3-0,4% de las enfermedades genéticas humanas, al dirigir inserciones, retrotransposiciones Alu, como en el caso que presentamos en este trabajo, o recombinación homóloga desigual (lo que provocarían deleciones) [213,214]. Este resultado confirma la importancia que tiene el cribado de grandes alteraciones genéticas en los estudios moleculares del FXI.

Nuestro estudio también identifica tres nuevas mutaciones missense asociadas con deficiencia de FXI: p.Ile426Thr; p.Ile592Thre y p.Cys599Tyr. Estas identificaciones permiten ampliar la base molecular de la deficiencia de FXI a la vez que muestran nuevos residuos importantes en el plegamiento, dimerización, secreción o función de este elemento de la coagulación.

También es destacable la identificación de 3 mutaciones que causan una deficiencia CRM+, una de ellas nueva (p.Cys599Tyr) y otra identificada por primera vez en homocigosis (p.Pro538Leu), lo que ha permitido confirmar que la mutación provoca un defecto funcional que impide la activación del FXI por el FXIIa.

### **Mutaciones recurrentes**

Los estudios de pacientes con deficiencia de FXI realizados en diferentes países han generado dos tipos de resultados. En ciertas poblaciones se encuentran mutaciones altamente prevalentes. El ejemplo más conocido es la mutación p.Glu117Stop, presente en el 8% de los casos con deficiencia de FXI identificada en judíos Ashkenazís [54]. En contra, en otras regiones se observa una alta heterogeneidad molecular [190], aunque en ciertas regiones como el país vasco francés, existen mutaciones recurrentes [95][102-106]. También en China cuatro mutaciones (pTrp246Stop, p.Gly418Val, p-Gln281Stop and c.1136-4delGTTG) se identifican en el 48% de los casos con deficiencia de FXI [215]. El resultado de nuestro estudio muestra una situación parecida. La mayoría de los sujetos con deficiencia de FXI identificados en nuestro estudio (37 de los 44 casos índices) son portadores de 4 mutaciones (84%). Curiosamente, la mutación más prevalente en Yecla, no detectada en otros puntos de la Región de Murcia, es precisamente una mutación recurrente identificada en el país Vasco-Francés: p.Cys56Arg [102], identificada en 23 familias inicialmente no relacionadas, en dos de ellas con sujetos homocigotos. De hecho, el estudio del haplotipo en los portadores de esta mutación coincide con el descrito en población Vasco-Francesa [102], sugiriendo que tienen la misma procedencia. Son necesarios estudios adicionales, incluyendo el análisis de regiones hipervariables más alejadas de F11 para poder datar la antigüedad de la mutación p.Cys56Arg tanto en nuestra población como en población Vasco-Francesa y poder definir la migración de esta alteración, lo que puede identificar otras regiones en donde esta mutación también pueda ser prevalente.

Lo sorprendente de nuestro estudio es la identificación de otras 3 mutaciones recurrentes, menos frecuentes, pero identificadas en al menos 2 familias no relacionadas. Además, los estudios de secuenciación masiva del gen muestran un haplotipo específico para cada mutación, lo que sugiere fuertemente un efecto fundador. ¿Por qué existe una acumulación de mutaciones recurrentes en una misma población de 60.000 habitantes? Y ¿cómo una mutación que afecta al FXI provocando una deficiencia de este factor se perpetúa en una población donde, como en el caso de la mutación p.Cys56Arg llega a alcanzar más del 1% de la población? Dos son las

posibles respuestas a estas preguntas. Por una parte, es posible que la zona de Yecla tenga elevada consanguinidad, tal y como reflejan otros marcadores genéticos relativamente prevalentes en dicha zona (Dr. P Carbonell, Genética Clínica, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia. Comunicación personal). El hecho que esa zona haya estado relativamente incomunicada, haya sido una zona relativamente aislada (tanto de Murcia, Albacete o Valencia) puede justificar un alto grado de endogamia. Pero tampoco podemos olvidar que, como veremos posteriormente, la deficiencia de FXI no tiene graves efectos deletéreos, pero si posibles efectos beneficiosos en el sistema hemostático (y quizás en otros sistemas vinculados) que podrían justificar una posible selección positiva. Son necesarios nuevos estudios que evalúen estas hipótesis.

Pero además de las 4 mutaciones recurrentes, nuestro estudio también muestra una considerable heterogeneidad molecular, con otros 7 casos con 8 mutaciones diferentes, posiblemente de origen mucho más reciente. Dos son las conclusiones que podemos discutir atendiendo a estos resultados. En primer lugar que la incidencia de este tipo de alteraciones no tiene porqué ser diferente en el resto de poblaciones, por lo que, como posteriormente volveremos a incidir, es posible que la incidencia de la deficiencia de FXI sea mayor de la pensada. Pero además, la elevada heterogeneidad molecular asociada a la deficiencia de FXI sugiere una gran sensibilidad del FXI ante multitud de alteraciones genéticas. En otras palabras, prácticamente cualquier variación que afecte la transcripción, el procesamiento de intrones (un mecanismo posiblemente con alto peso en la base molecular de la deficiencia de FXI [216], el plegamiento, la dimerización, secreción o la función (interacción con el FXII o el factor IX) provocan la deficiencia del FXI. En este estudio hemos identificado nuevos residuos que deben desempeñar un papel relevante en estos procesos.

### **Prevalencia de la deficiencia de FXI. Cambio de paradigma y limitaciones diagnósticas**

La deficiencia del FXI se ha considerado un desorden raro [139], pero cada día hay más autores que sugieren que este desorden está subestimado [190]. Nuestro estudio aporta nuevas evidencias de una mayor prevalencia de la deficiencia de FXI en la



población general. En primer lugar, aunque cierta mutación fundadora puede estar más representada en una población, la identificación de 44 casos índices (y al menos 214 familiares) con deficiencia de FXI en una población de 60.000 habitantes implica una frecuencia mucho mayor que la esperada para un desorden raro. También la variabilidad molecular identificada, tanto para mutaciones recurrentes como para mutaciones identificadas en un solo caso sugiere que la situación podría ser parecida en cualquier otra población, ya que no existe ninguna razón que justifique que en Yecla (Murcia) exista una mayor prevalencia de mutaciones recurrentes ni de mutaciones individuales causantes de deficiencia de FXI.

Pero quizás las evidencias que sustentan que la deficiencia de FXI sea un desorden mucho más frecuente de lo descrito en la literatura son las complicaciones diagnósticas. Como en otros estudios [82], el diagnóstico de la deficiencia de FXI en nuestro estudio siempre se inicia con la identificación de un TTPa prolongado (ratio > 1,3). En este trabajo hemos comprobado que este método es fiable para el diagnóstico de la deficiencia severa de FXI ya que todos los heterocigotos compuestos y homocigotos presentaron TTPa prolongados (ratio > 2). Pero la mayoría de casos con deficiencia de FXI, los moderados o suaves, los heterocigotos, el diagnóstico basado en TTPa puede ser difícil. De hecho 68 de 204 sujetos heterocigotos recogidos en el estudio, incluyendo los casos índices (33,3%) presentan un TTPa normal (ratio  $\leq$  1,3). Por tanto, es posible que la incidencia de la deficiencia de FXI en Yecla (y potencialmente en cualquier población) pueda ser incluso significativamente mayor.

Además, a la hora de valorar un TTPa prolongado (ratio > 1,3) en un contexto hospitalario y decidir si son necesarios estudios adicionales para caracterizarlo, se tiene en cuenta la existencia de una historia de diátesis hemorrágica. Por esta razón y por el hecho también mostrado en nuestro trabajo de la baja incidencia de complicaciones hemorrágicas (tanto espontáneas como en situaciones de riesgo) que presentan los sujetos con deficiencia de FXI, es muy probable que muchos casos con deficiencia de FXI no se diagnostiquen. Sin embargo, como veremos después, el diagnóstico de la deficiencia de FXI puede tener relevancia clínica en otro contexto completamente diferente al planteado hasta la fecha. La mayoría de hematólogos consideran hoy que el diagnóstico de la deficiencia de FXI solo puede tener algún peso

a la hora de predecir complicaciones hemorrágicas durante procedimientos quirúrgicos o situaciones de riesgo. Sin embargo, es posible que este desorden pueda jugar un papel más importante justo en el extremo opuesto, en la patología trombótica y puede que en la terapia antitrombótica como discutiremos posteriormente, por lo que deberíamos disponer de algoritmos y métodos diagnósticos sensibles y específicos.

En ese contexto, este estudio también ha evaluado dos reactivos de activación de la fase de contacto (del FXII) empleados en los dos métodos funcionales implicados en el diagnóstico de la deficiencia de FXI (TTPa y FXI:C): el ácido elálgico y la sílica micronizada. Los resultados del estudio de 140 sujetos con deficiencia de FXI muestran que la sílica, posiblemente porque es un mejor activador del FXII comparado con el ácido elálgico, tiene mayor tasa de falsos negativos si se emplea el TTPa como método de cribado en la deficiencia de FXI (22% vs 12%; respectivamente  $p < 0,01$ ). La explicación a esta diferencia la encontramos en el peso de un polimorfismo del gen *F12*, común (presente en el 35% de la población española) que afecta a los niveles de FXII en el TTPa dependiente del sistema de activación. Si se emplea sílica, la presencia de este polimorfismo del FXII modifica significativamente el tiempo de formación del coagulo y por tanto el TTPa: los portadores del alelo T, con menores niveles de FXII en plasma [192], presentan TTPa más prolongados que los sujetos C/C, mientras que este polimorfismo no tiene efectos significativos sobre el TTPa si se emplea un activador menos potente como el ácido elálgico. La tasa de falsos negativos se reduce considerablemente (2-6%) si se emplea el sistema de dosificación de FXI (FXI:C) ya que para ninguno de los activadores de la ruta de contacto los niveles de FXII plasmático juega ningún efecto significativo (resultado esperable ya que los niveles de FXII se uniforman al diluir el plasma del paciente en un plasma deficiente en FXI).

Pero también empleando FXI:C como sistema diagnóstico que es la opción que claramente se plantea realizar directamente para el diagnóstico de la deficiencia de FXI, existen casos con mutación deletérea que no se detectarían con este método (FXI:C >70%), especialmente si se emplea ácido elálgico. Quizás por estas razones, y porque son métodos cada vez más accesibles, rápidos y económicos, el diagnóstico molecular, especialmente empleando metodología NGS que puede secuenciar todo el

gen *F11* por menos de 50 €/paciente, será el que se finalmente se imponga para el diagnóstico de la deficiencia congénita de FXI.

### **Implicaciones clínicas de la deficiencia de FXI. Escaso peso hemorrágico**

Como hemos comentado, la deficiencia de FXI se ha considerado clásicamente en el contexto de las coagulopatías congénitas y por tanto se han estudiado especialmente las complicaciones hemorrágicas asociadas. De hecho, se llegó a denominar hemofilia C. Sin embargo, y con resultados validados en este estudio, las complicaciones hemorrágicas en sujetos con deficiencia congénita de FXI son escasas y de poca importancia. La incidencia de sangrado espontáneo es baja y de poco peso (mayoría epistaxis). Tampoco son elevadas ni importantes las complicaciones hemorrágicas en el contexto de operaciones o situaciones de riesgo como los partos. Efectivamente, son muy raros los casos con deficiencia de FXI que requieren hemoderivados por complicaciones hemorrágicas (en nuestra serie de 214 pacientes solo 3 precisaron soporte transfusional, todos ellos heterocigotos, ningún deficiente severo, lo que sugiere que posiblemente la deficiencia de FXI no sea el único elemento implicado).

Este resultado cuestiona el beneficio del uso de profilaxis antihemorrágica con antifibrinolíticos, plasma fresco congelado, o concentrados de FXI, en los sujetos con deficiencia de FXI. De hecho, nuestros resultados no lo avalan. El uso de plasma fresco congelado profiláctico, empleado en nuestro estudio en 58 ocasiones, no supone un claro beneficio antihemorrágico y sin embargo puede tener importantes efectos adversos. De hecho, en dos casos se desarrolló TRALI.

Nosotros no hemos evaluado el beneficio de concentrados de FXI (no disponible en nuestro país), pero a la vista de resultados publicados [217], al igual que el del PFC debería restringirse a casos excepcionales y con argumentos adicionales a la presencia de una deficiencia de FXI como la historia previa de sangrados, o la intervención en tejidos con alta actividad fibrinolítica, que es donde parece que la deficiencia de FXI pudiera provocar mayor riesgo hemorrágico [127].

La detección de dos casos con deficiencia de FXI que desarrollaron TRALIs tras la infusión de PFC junto con el papel que se está asignando al FXI en la respuesta inmune e inflamatoria [172,218-220], nos llevó a plantear la posibilidad de que la deficiencia de FXI pudiera estar implicada en esta importante y muchas veces letal complicación transfusional. La respuesta a esta hipótesis debe realizarse con experimentación adicional, si bien, resultados preliminares obtenidos de secuenciar el gen *F11* en 7 casos con TRALI diagnosticados en la Región de Murcia, no han detectado ninguna mutación asociada con deficiencia de FXI.

Nuestro trabajo aporta datos adicionales, relevantes y originales en el contexto del riesgo hemorrágico de pacientes con deficiencia de FXI. Ya conocemos que la deficiencia de un elemento de la vía de contacto no tiene excesivo peso hemorrágico, pero este efecto podría teóricamente aumentar en combinación con otros estados pro-hemorrágicos. En este estudio hemos comprobado que el grupo ABO, particularmente el grupo O, asociado con menores niveles de FVIII y FvW y mayor riesgo hemorrágico [197], no incrementa el riesgo hemorrágico.

Más interesantes son los resultados observados en pacientes con terapia anticoagulante oral. Podríamos pensar que la deficiencia funcional de todos los factores vitamina K dependiente que incrementa el riesgo hemorrágico en pacientes tratados con anti-vitaminas K [221] podría exacerbarse en los casos con deficiencia de FXI. Sin embargo, los resultados de este trabajo descartan esa hipótesis. En los más de 380 meses en los que 8 pacientes con deficiencia de FXI han sido expuestos a acenocumarol (todos los casos con INR diana de 2-3), incluyendo los dos meses que un sujeto homocigoto ha estado con tratamiento anticoagulante, ninguno ha presentado eventos hemorrágicos. Tampoco ninguno los tres pacientes que tenían anticoagulación y antiagregación (uno de ellos doble, con aspirina y clopidogrel) han presentado eventos hemorrágicos.

Estos resultados ofrecen evidencias destacables y novedosas del escaso riesgo hemorrágico que tienen los sujetos con deficiencia de FXI, no solo en situaciones de riesgo quirúrgico sino también del tratamiento anticoagulante. Es necesario sustentar con nuevos estudios que incluyan más pacientes, el supuesto escaso riesgo

hemorrágico de la deficiencia de FXI en combinación con la terapia antiagregante, y estudiar el papel que pudiera tener con los anticoagulantes orales de acción directa.

### **Nuevas situaciones clínicas de la deficiencia de FXI. Protección antitrombótica**

Recientes estudios en modelos animales apoyan que no solo la deficiencia del FXI sino también la de FXII tienen demostrado beneficio en diferentes modelos de trombosis tanto arterial como venosa [222-224]. Existen trabajos en modelos experimentales que también sugieren que la deficiencia de FXI podría reducir o enlentecer la aterogénesis. Así, los ratones doble KO para la apolipoproteína E y el FXI a las 24 semanas de vida presentaban una lesión aterosclerótica en el seno de la aorta significativamente reducida (32%) respecto a la observada en ratones KO solo para la apolipoproteína E ( $p=0.004$ ). La progresión aterosclerótica en el seno aórtico y en el arco aórtico que se observaba a las 42 semanas en los ratones KO solo para apolipoproteína E, se inhibía significativamente si existía deficiencia de FXI, con una marcada reducción de la infiltración de macrófagos en las lesiones ateroscleróticas en los ratones con deficiencia de FXI [225].

Sin embargo, los resultados observados en humanos no son tan espectaculares, pero sí interesantes. Una reciente revisión de los casos con deficiencia severa de FXI publicados hasta la fecha ha evaluado el papel de este desorden en el desarrollo de complicaciones trombóticas [226]. Ese trabajo, sugiere que la deficiencia de FXI no tiene efectos protectores frente al infarto de miocardio. Nuestros resultados tampoco avalan los resultados observados en modelos animales. La incidencia de IAM o síndrome coronario agudo en nuestra serie de pacientes con deficiencia de FXI es la esperable, 6 casos, incluyendo dos homocigotos. No obstante los pacientes con deficiencia de FXI y enfermedad cardiovascular identificados en nuestro estudio son mayores y con alta incidencia de factores de riesgo cardiovascular, por lo que debería realizarse un estudio bien diseñado que incluya sujetos controles con similares factores de riesgo para poder concluir que la deficiencia de FXI no protege de forma significativa del riesgo de enfermedad cardiovascular.

Una conclusión similar, aunque con más resultados contradictorios, puede plantearse respecto a la enfermedad cerebrovascular. Existen algunos trabajos que sugieren que la deficiencia de FXI pudiera proteger de este desorden, pero otros no lo muestran tan claro [154],[139]. En nuestra serie de pacientes, 8 sujetos con deficiencia de FXI presentaron ictus isquémico, incluyendo un homocigoto y un heterocigoto compuesto. Pero de nuevo, se tratan de sujetos mayores y con alta incidencia de hipertensión.

Sin embargo, el papel protector de la deficiencia de FXI frente a la trombosis venosa, parece bien sustentado en todos los estudios publicados hasta la fecha y también por los resultados de nuestro estudio. En nuestra serie, solo dos pacientes, ambos heterocigotos, presentaron trombosis venosa. Uno en una localización inusual (trombosis de la vena de retina tras una operación de cataratas), y el segundo con un síndrome varicoso importante con úlceras sangrantes que había sido evaluado por este problema en varias ocasiones en el servicio de cirugía vascular del hospital de referencia. Pero de forma mucho más relevante, y es la primera vez que se reporta esta observación en humanos, la deficiencia de FXI parece que protege del desarrollo de eventos tromboticos en pacientes con otras alteraciones genéticas protromboticas. En nuestra serie de pacientes con deficiencia de FXI, 19 casos presentaban un polimorfismo protrombotico (FV Leiden o protrombina G20210A) y pese a que estos factores genéticos incrementan de 3-4 veces el riesgo de trombosis venosa, ninguno ha desarrollado eventos tromboticos, incluso aunque muchos han estado también expuestos a otros factores de riesgo trombotico como embarazo (14 partos); cirugías (19 intervenciones quirúrgicas) o han presentado cancer (en dos casos). Este resultado está en plena consonancia con la protección antitrombotica ante defectos tromboticos que se ha mostrado en un modelo animal [196]. De esta forma, el cruce de animales deficientes en FXI (FXI -/-) con ratones deficientes en Proteína C, parcialmente suavizan el estado hipercoagulable y devastador que causa la deficiencia severa de proteína C [168].

La posible protección antitrombotica de la deficiencia del FXI podría llevar a plantear no emplear terapias anticoagulantes en estos pacientes en situaciones de riesgo trombotico. De hecho hay un caso en el que no se emplea heparinas durante el proceso de hemodiálisis sin complicaciones tromboticas [227]. No obstante, el escaso

riesgo hemorrágico que observamos en pacientes con deficiencia de FXI tratados con anti-vitaminas K apoya que el tratamiento anticoagulante en estos pacientes no tendría efectos adversos destacados.

En su conjunto, los resultados clínicos obtenidos en nuestra serie de pacientes con deficiencia de FXI, especialmente heterocigotos, que recordemos son relativamente frecuentes en la población general, evidencian la escasa incidencia de eventos hemorrágicos, incluso en situaciones de alto riesgo hemorrágico como el tratamiento anticoagulante oral, pero una protección antitrombótica en territorio venoso que podría compensar incluso al riesgo asociado con trombofilias clásicas. Estos resultados sin duda están plenamente de acuerdo con los excelentes resultados del reciente ensayo clínico que consigue mejor protección antitrombótica y menor tasa de hemorragias que las heparinas en cirugía de rodilla mediante el silenciamiento previo del FXI [185]. Aunque sea un poco aventurado, nos atrevemos a sugerir que el estudio de la deficiencia de FXI, por su prevalencia y su papel antitrombótico quizás debería incluirse la valoración del riesgo trombótico dentro de los estudios de trombofilia, porque podría ayudar a explicar el riesgo trombótico de cada individuo.

Queremos terminar esta memoria indicando que tras 20 años de estudio de pacientes con TTPa prolongado en Yecla, se ha conseguido recoger una de las mayores series de pacientes con deficiencia congénita de FXI descritas en el mundo. El completo estudio molecular y bioquímico junto con la exhaustiva información clínica nos permite obtener unos resultados que ofrecen nuevas y apasionantes hipótesis y que también abren nuevos interrogantes sobre el FXI que deben ser validadas y contrastadas en nuevos estudios, analizando otras poblaciones y diseños específicos, así como empleando otras aproximaciones experimentales.





# **CONCLUSIONES**



## **CONCLUSIONES**

- 1) La deficiencia de FXI tiene una alta prevalencia en el noroeste de la Región de Murcia.**
- 2) Las limitaciones de los métodos utilizados para el diagnóstico de la deficiencia de FXI, especialmente el TTPa, junto con la escasa tendencia hemorrágica de estos pacientes apoyan que este desorden esté subestimado.**
- 3) Existe una gran variabilidad molecular que explica la deficiencia de FXI. En nuestro estudio identificamos cuatro mutaciones recurrentes. Además, nuestro estudio identifica 4 mutaciones no descritas causantes de deficiencia de FXI, incluyendo la primera gran inserción descrita a nivel mundial.**
- 4) Nuestro estudio confirma el escaso riesgo hemorrágico asociado con la deficiencia de FXI, y muestra por primera vez la ausencia de eventos hemorrágicos en pacientes con deficiencia de FXI bajo tratamiento anticoagulante.**
- 5) La profilaxis antihemorrágica con plasma fresco congelado no tiene beneficio significativo pero puede ocasionar graves efectos adversos (TRALI) en pacientes con deficiencia de FXI.**
- 6) La deficiencia de FXI no protege de eventos trombóticos en territorio arterial pero es un factor protector antitrombótico en territorio venoso, incluso con factores de riesgo trombofílicos.**



## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 1 Kravtsov DV, Monahan PE, Gailani D. A classification system for cross-reactive material-negative factor XI deficiency. *Blood* 2005; 105: 4671-4673.
- 2 Emsley J, McEwan PA, Gailani D. Structure and function of factor XI. *Blood* 2010; 115: 2569-2577.
- 3 Ponczek MB, Gailani D, Doolittle RF. Evolution of the contact phase of vertebrate blood coagulation. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 1876-1883.
- 4 Mackman N. Tissue-specific hemostasis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 2273-2281.
- 5 Cheng Q, Kantz J, Poffenberger G, Powers AC, Gailani D. Factor XI protein in human pancreas and kidney. *Thromb Haemost* 2008; 100: 158-160.
- 6 Tarumi T, Kravtsov DV, Zhao M, Williams SM, Gailani D. Cloning and characterization of the human factor XI gene promoter: transcription factor hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF-4alpha ) is required for hepatocyte-specific expression of factor XI. *J Biol Chem* 2002; 277: 18510-18516.
- 7 Gailani D, Zivelin A, Sinha D, Walsh PN. Do platelets synthesize factor XI? *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1709-1712.
- 8 Connellan JM, Castaldi PA, Muntz RH. The role of factor XI in the coagulant activity of platelets. *Haemostasis* 1977; 6: 41-52.
- 9 Horowitz HI, Fujimoto MM. ASSOCIATION OF FACTORS XI AND XII WITH BLOOD PLATELETS. *Proc Soc Exp Biol Med* 1965; 119: 487-492.
- 10 Lipscomb MS, Walsh PN. Human platelets and factor XI. Localization in platelet membranes of factor XI-like activity and its functional distinction from plasma factor XI. *J Clin Invest* 1979; 63: 1006-1014.
- 11 Macfarlane DE, Walsh PN, Mills DC, Holmsen H, Day HJ. The role of thrombin in ADP-induced platelet aggregation and release: a critical evaluation. *Br J Haematol* 1975; 30: 457-463.
- 12 Tuszynski GP, Bevacqua SJ, Schmaier AH, Colman RW, Walsh PN. Factor XI antigen and activity in human platelets. *Blood* 1982; 59: 1148-1156.
- 13 Walsh PN. Albumin density gradient separation and washing of platelets and the study of platelet coagulant activities. *Br J Haematol* 1972; 22: 205-217.
- 14 Hsu TC, Shore SK, Seshamma T, Bagasra O, Walsh PN. Molecular cloning of platelet factor XI, an alternative splicing product of the plasma factor XI gene. *J Biol Chem* 1998; 273: 13787-13793.

- 15 Martincic D, Kravtsov V, Gailani D. Factor XI messenger RNA in human platelets. *Blood* 1999; 94: 3397-3404.
- 16 Podmore A, Smith M, Savidge G, Alhaq A. Real-time quantitative PCR analysis of factor XI mRNA variants in human platelets. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1713-1719.
- 17 Berber E. Molecular characterization of FXI deficiency. *Clin Appl Thromb Hemost* 2011; 17: 27-32.
- 18 Teruel R, Martinez-Martinez I, Guerrero JA, Gonzalez-Conejero R, de la Morena-Barrio ME, Salloum-Asfar S, et al. Control of post-translational modifications in antithrombin during murine post-natal development by miR-200a. *J Biomed Sci* 2013; 20: 29.
- 19 Andrew M, Paes B, Milner R, Johnston M, Mitchell L, Tollefsen DM, et al. Development of the human coagulation system in the full-term infant. *Blood* 1987; 70: 165-172.
- 20 Brotman DJ, Girod JP, Posch A, Jani JT, Patel JV, Gupta M, et al. Effects of short-term glucocorticoids on hemostatic factors in healthy volunteers. *Thromb Res* 2006; 118: 247-252.
- 21 Thompson RE, Mandle R, Jr., Kaplan AP. Association of factor XI and high molecular weight kininogen in human plasma. *J Clin Invest* 1977; 60: 1376-1380.
- 22 Gomez K, Bolton-Maggs P. Factor XI deficiency. *Haemophilia* 2008; 14: 1183-1189.
- 23 Kurachi K, Fujikawa K, Davie EW. Mechanism of activation of bovine factor XI by factor XII and factor XIIa. *Biochemistry* 1980; 19: 1330-1338.
- 24 Baglia FA, Jameson BA, Walsh PN. Identification and characterization of a binding site for platelets in the Apple 3 domain of coagulation factor XI. *J Biol Chem* 1995; 270: 6734-6740.
- 25 Baglia FA, Gailani D, Lopez JA, Walsh PN. Identification of a binding site for glycoprotein Ibalph in the Apple 3 domain of factor XI. *J Biol Chem* 2004; 279: 45470-45476.
- 26 Greengard JS, Heeb MJ, Ersdal E, Walsh PN, Griffin JH. Binding of coagulation factor XI to washed human platelets. *Biochemistry* 1986; 25: 3884-3890.
- 27 White-Adams TC, Berny MA, Tucker EI, Gertz JM, Gailani D, Urbanus RT, et al. Identification of coagulation factor XI as a ligand for platelet apolipoprotein E receptor 2 (ApoER2). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 1602-1607.
- 28 Zilberman-Rudenko J, Itakura A, Wiesenekker CP, Vetter R, Maas C, Gailani D, et al. Coagulation Factor XI Promotes Distal Platelet Activation and Single Platelet Consumption in the Bloodstream Under Shear Flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016; 36: 510-517.
- 29 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: 2417-2424.

- 30 Kravtsov DV, 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: 452-458.
- 31 Renne T, Gailani D, Meijers JC, Muller-Esterl W. Characterization of the H-kininogen-binding site on factor XI: a comparison of factor XI and plasma prekallikrein. *J Biol Chem* 2002; 277: 4892-4899.
- 32 Baglia FA, Walsh PN. A binding site for thrombin in the apple 1 domain of factor XI. *J Biol Chem* 1996; 271: 3652-3658.
- 33 Ho DH, Badellino K, Baglia FA, Walsh PN. A binding site for heparin in the apple 3 domain of factor XI. *J Biol Chem* 1998; 273: 16382-16390.
- 34 Zhao M, Abdel-Razek T, Sun MF, Gailani D. Characterization of a heparin binding site on the heavy chain of factor XI. *J Biol Chem* 1998; 273: 31153-31159.
- 35 Baglia FA, Jameson BA, Walsh PN. Identification and characterization of a binding site for factor XIIa in the Apple 4 domain of coagulation factor XI. *J Biol Chem* 1993; 268: 3838-3844.
- 36 Sun MF, Zhao M, Gailani D. Identification of amino acids in the factor XI apple 3 domain required for activation of factor IX. *J Biol Chem* 1999; 274: 36373-36378.
- 37 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; 13: 557-558.
- 38 Wu W, Sinha D, Shikov S, Yip CK, Walz T, Billings PC, et al. Factor XI homodimer structure is essential for normal proteolytic activation by factor XIIa, thrombin, and factor XIa. *J Biol Chem* 2008; 283: 18655-18664.
- 39 Zucker M, Zivelin A, Landau M, Rosenberg N, Seligsohn U. Three residues at the interface of factor XI (FXI) monomers augment covalent dimerization of FXI. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 970-975.
- 40 Bouma BN, Griffin JH. Human blood coagulation factor XI. Purification, properties, and mechanism of activation by activated factor XII. *J Biol Chem* 1977; 252: 6432-6437.
- 41 Gailani D, Broze GJ, Jr. Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. *Science* 1991; 253: 909-912.
- 42 Naito K, Fujikawa K. Activation of human blood coagulation factor XI independent of factor XII. Factor XI is activated by thrombin and factor XIa in the presence of negatively charged surfaces. *J Biol Chem* 1991; 266: 7353-7358.
- 43 von dem Borne PA, Mosnier LO, Tans G, Meijers JC, Bouma BN. Factor XI activation by meizothrombin: stimulation by phospholipid vesicles containing both phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine. *Thromb Haemost* 1997; 78: 834-839.
- 44 von dem Borne PA, Meijers JC, 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: 3035-3042.

- 45 Choi SH, Smith SA, Morrissey JH. Polyphosphate is a cofactor for the activation of factor XI by thrombin. *Blood* 2011; 118: 6963-6970.
- 46 Cawthern KM, van 't, V, Lock JB, DiLorenzo ME, Branda RF, Mann KG. Blood coagulation in hemophilia A and hemophilia C. *Blood* 1998; 91: 4581-4592.
- 47 He R, Xiong S, He X, Liu F, Han J, Li J, et al. The role of factor XI in a dilute thromboplastin assay of extrinsic coagulation pathway. *Thromb Haemost* 2001; 85: 1055-1059.
- 48 Keularts IM, Zivelin A, Seligsohn U, Hemker HC, Beguin S. The role of factor XI in thrombin generation induced by low concentrations of tissue factor. *Thromb Haemost* 2001; 85: 1060-1065.
- 49 Pedicord DL, Seiffert D, Blat Y. Feedback activation of factor XI by thrombin does not occur in plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 12855-12860.
- 50 Matafonov A, Sarilla S, Sun MF, Sheehan JP, Serebrov V, Verhamme IM, et al. Activation of factor XI by products of prothrombin activation. *Blood* 2011; 118: 437-445.
- 51 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; 116: 3981-3989.
- 52 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; 203: 513-518.
- 53 Renne T, Pozgajova M, Gruner S, Schuh K, Pauer HU, Burfeind P, et al. Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. *J Exp Med* 2005; 202: 271-281.
- 54 Renne T, Nieswandt B, Gailani D. The intrinsic pathway of coagulation is essential for thrombus stability in mice. *Blood Cells Mol Dis* 2006; 36: 148-151.
- 55 Schousboe I. Pharmacological regulation of factor XII activation may be a new target to control pathological coagulation. *Biochem Pharmacol* 2008; 75: 1007-1013.
- 56 Seligsohn U. Factor XI in haemostasis and thrombosis: past, present and future. *Thromb Haemost* 2007; 98: 84-89.
- 57 Salomon O, Steinberg DM, 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; 105: 269-273.
- 58 Broze GJ, Jr., Gailani D. The role of factor XI in coagulation. *Thromb Haemost* 1993; 70: 72-74.
- 59 Gailani D, Smith SB. Structural and functional features of factor XI. *J Thromb Haemost* 2009; 7 Suppl 1: 75-78.



- 60 Smith SB, Gailani D. Update on the physiology and pathology of factor IX activation by factor XIa. *Expert Rev Hematol* 2008; 1: 87-98.
- 61 Smith SB, Verhamme IM, Sun MF, Bock PE, Gailani D. Characterization of Novel Forms of Coagulation Factor XIa: independence of factor XIa subunits in factor IX activation. *J Biol Chem* 2008; 283: 6696-6705.
- 62 Oliver JA, Monroe DM, Roberts HR, Hoffman M. Thrombin activates factor XI on activated platelets in the absence of factor XII. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 170-177.
- 63 Wielders SJ, Beguin S, Hemker HC, Lindhout T. Factor XI-dependent reciprocal thrombin generation consolidates blood coagulation when tissue factor is not available. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1138-1142.
- 64 Baglia FA, Walsh PN. Prothrombin is a cofactor for the binding of factor XI to the platelet surface and for platelet-mediated factor XI activation by thrombin. *Biochemistry* 1998; 37: 2271-2281.
- 65 Walsh PN. Prothrombin is a cofactor for the binding of factor XI to the platelet surface and for platelet-mediated factor-XI activation by thrombin. *Biochemistry* 2007; 46: 12886-12887.
- 66 Pennings MT, Derksen RH, van LM, Adelmeijer J, VanHoorelbeke K, Urbanus RT, et al. Platelet adhesion to dimeric beta-glycoprotein I under conditions of flow is mediated by at least two receptors: glycoprotein I $\alpha$  and apolipoprotein E receptor 2<sup>1</sup>. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 369-377.
- 67 Maas C, Meijers JC, Marquart JA, Bakhtiari K, Weeterings C, de Groot PG, et al. Activated factor V is a cofactor for the activation of factor XI by thrombin in plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 9083-9087.
- 68 Shi T, Iverson GM, Qi JC, Cockerill KA, Linnik MD, Konecny P, et al. Beta 2-Glycoprotein I binds factor XI and inhibits its activation by thrombin and factor XIIa: loss of inhibition by clipped beta 2-glycoprotein I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 3939-3944.
- 69 Meijers JC, Davie EW, Chung DW. Expression of human blood coagulation factor XI: characterization of the defect in factor XI type III deficiency. *Blood* 1992; 79: 1435-1440.
- 70 Gailani D, Ho D, Sun MF, Cheng Q, Walsh PN. Model for a factor IX activation complex on blood platelets: dimeric conformation of factor XIa is essential. *Blood* 2001; 97: 3117-3122.
- 71 Aktimur A, Gabriel MA, Gailani D, Toomey JR. The factor IX gamma-carboxyglutamic acid (Gla) domain is involved in interactions between factor IX and factor XIa. *J Biol Chem* 2003; 278: 7981-7987.
- 72 Wolberg AS, Morris DP, Stafford DW. Factor IX activation by factor XIa proceeds without release of a free intermediate. *Biochemistry* 1997; 36: 4074-4079.
- 73 Whelihan MF, Orfeo T, Gissel MT, Mann KG. Coagulation procofactor activation by factor XIa. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 1532-1539.

- 74 Carrieri C, Galasso R, Semeraro F, Ammollo CT, Semeraro N, Colucci M. The role of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and factor XI in platelet-mediated fibrinolysis resistance: a thromboelastographic study in whole blood. *J Thromb Haemost* 2011; 9: 154-162.
- 75 Wuillemin WA, Hack CE, Bleeker WK, Biemond BJ, Levi M, ten CH. Inactivation of factor X<sub>ia</sub> in vivo: studies in chimpanzees and in humans. *Thromb Haemost* 1996; 76: 549-555.
- 76 Zhang J, Tu Y, Lu L, Lasky N, Broze GJ, Jr. Protein Z-dependent protease inhibitor deficiency produces a more severe murine phenotype than protein Z deficiency. *Blood* 2008; 111: 4973-4978.
- 77 Yang L, Sun MF, Gailani D, Rezaie AR. Characterization of a heparin-binding site on the catalytic domain of factor X<sub>ia</sub>: mechanism of heparin acceleration of factor X<sub>ia</sub> inhibition by the serpins antithrombin and C1-inhibitor. *Biochemistry* 2009; 48: 1517-1524.
- 78 Navaneetham D, Jin L, Pandey P, Strickler JE, Babine RE, Abdel-Meguid SS, et al. Structural and mutational analyses of the molecular interactions between the catalytic domain of factor X<sub>ia</sub> and the Kunitz protease inhibitor domain of protease nexin 2. *J Biol Chem* 2005; 280: 36165-36175.
- 79 Scandura JM, Zhang Y, Van Nostrand WE, Walsh PN. Progress curve analysis of the kinetics with which blood coagulation factor X<sub>ia</sub> is inhibited by protease nexin-2. *Biochemistry* 1997; 36: 412-420.
- 80 ROSENTHAL RL, DRESKIN OH, ROSENTHAL N. New hemophilia-like disease caused by deficiency of a third plasma thromboplastin factor. *Proc Soc Exp Biol Med* 1953; 82: 171-174.
- 81 ROSENTHAL RL, DRESKIN OH, ROSENTHAL N. Plasma thromboplastin antecedent (PTA) deficiency; clinical, coagulation, therapeutic and hereditary aspects of a new hemophilia-like disease. *Blood* 1955; 10: 120-131.
- 82 He R, Chen D, He S. Factor XI: hemostasis, thrombosis, and antithrombosis. *Thromb Res* 2012; 129: 541-550.
- 83 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; 102: 287-301.
- 84 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; 85: 429-432.
- 85 Bolton-Maggs PH, Patterson DA, Wensley RT, Tuddenham EG. Definition of the bleeding tendency in factor XI-deficient kindreds--a clinical and laboratory study. *Thromb Haemost* 1995; 73: 194-202.

- 86 Asakai R, Davie EW, Chung DW. Organization of the gene for human factor XI. *Biochemistry* 1987; 26: 7221-7228.
- 87 Hancock JF, Wieland K, Pugh RE, Martinowitz U, Schulman S, Kakkar VV, et al. A molecular genetic study of factor XI deficiency. *Blood* 1991; 77: 1942-1948.
- 88 Imanaka Y, Lal K, Nishimura T, Bolton-Maggs PH, Tuddenham EG, McVey JH. Identification of two novel mutations in non-Jewish factor XI deficiency. *Br J Haematol* 1995; 90: 916-920.
- 89 Martincic D, Zimmerman SA, Ware RE, Sun MF, Whitlock JA, Gailani D. Identification of mutations and polymorphisms in the factor XI genes of an African American family by dideoxyfingerprinting. *Blood* 1998; 92: 3309-3317.
- 90 McVey JH, Imanaka Y, Nishimura T. Identification of a novel mechanism of human genetic disease: a missense mutation causing factor XI deficiency through a change in mRNA stability. *1995;73:1442. Thrombosis and Haemostasis* 1995; 73: 1442.
- 91 Pugh RE, McVey JH, Tuddenham EG, Hancock JF. Six point mutations that cause factor XI deficiency. *Blood* 1995; 85: 1509-1516.
- 92 Tsukahara A, Yamada T, Takagi A, Murate T, Matsushita T, Saito H, et al. Compound heterozygosity for two novel mutations in a severe factor XI deficiency. *Am J Hematol* 2003; 73: 279-284.
- 93 Wistinghausen B, Reischer A, Oddoux C, Ostrer H, Nardi M, Karparkin M. Severe factor XI deficiency in an Arab family associated with a novel mutation in exon 11. *Br J Haematol* 1997; 99: 575-577.
- 94 Wu WM, Wang HL, Wang XF, Chu HY, Fu QH, Ding QL, et al. [Identification of two novel factor XI non-sense mutation Trp228stop and Trp383stop in a Chinese pedigree of congenital factor XI deficiency]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2003; 24: 126-128.
- 95 Ragni MV, Sinha D, Seaman F, Lewis JH, Spero JA, Walsh PN. Comparison of bleeding tendency, factor XI coagulant activity, and factor XI antigen in 25 factor XI-deficient kindreds. *Blood* 1985; 65: 719-724.
- 96 Mannhalter C, Hellstern P, Deutsch E. Identification of a defective factor XI cross-reacting material in a factor XI-deficient patient. *Blood* 1987; 70: 31-37.
- 97 Quelin F, Trossaert M, Sigaud M, Mazancourt PD, Fressinaud E. Molecular basis of severe factor XI deficiency in seven families from the west of France. Seven novel mutations, including an ancient Q88X mutation. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 71-76.
- 98 Seligsohn U. Factor XI deficiency in humans. *J Thromb Haemost* 2009; 7 Suppl 1: 84-87.
- 99 Asakai R, Chung DW, Davie EW, Seligsohn U. Factor XI deficiency in Ashkenazi Jews in Israel. *N Engl J Med* 1991; 325: 153-158.
- 100 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; 90: 2654-2659.

- 101 Goldstein DB, Reich DE, Bradman N, Usher S, Seligsohn U, Peretz H. Age estimates of two common mutations causing factor XI deficiency: recent genetic drift is not necessary for elevated disease incidence among Ashkenazi Jews. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 1071-1075.
- 102 Zivelin A, Bauduer F, Ducout L, Peretz H, Rosenberg N, Yatuv R, et al. Factor XI deficiency in French Basques is caused predominantly by an ancestral Cys38Arg mutation in the factor XI gene. *Blood* 2002; 99: 2448-2454.
- 103 Quelin F, Trossaert M, Sigaud M, Mazancourt PD, Fressinaud E. Molecular basis of severe factor XI deficiency in seven families from the west of France. Seven novel mutations, including an ancient Q88X mutation. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 71-76.
- 104 Okumura K, Kyotani M, Kawai R, Takagi A, Murate T, Yamamoto K, et al. Recurrent mutations of factor XI gene in Japanese. *Int J Hematol* 2006; 83: 462-463.
- 105 Duncan EM, Casey GJ, Fenech MP, Lerda NV, Casey CR, Rodgers SE, et al. Partial and severe factor XI deficiency in South Australia and the usefulness of factor XI mutation analysis for diagnosis. *Pathology* 2008; 40: 401-406.
- 106 Peyvandi F, Menegatti M, Palla R. Rare bleeding disorders: worldwide efforts for classification, diagnosis, and management. *Semin Thromb Hemost* 2013; 39: 579-584.
- 107 Saunders RE, O'Connell NM, Lee CA, Perry DJ, Perkins SJ. Factor XI deficiency database: an interactive web database of mutations, phenotypes, and structural analysis tools. *Hum Mutat* 2005; 26: 192-198.
- 108 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: 127-138.
- 109 Bozzao C, Rimoldi V, Asselta R, Landau M, Ghiotto R, Tenchini ML, et al. A novel factor XI missense mutation (Val371Ile) in the activation loop is responsible for a case of mild type II factor XI deficiency. *FEBS J* 2007; 274: 6128-6138.
- 110 Sun MF, Baglia FA, Ho D, Martincic D, Ware RE, Walsh PN, et al. Defective binding of factor XI-N248 to activated human platelets. *Blood* 2001; 98: 125-129.
- 111 Guella I, Solda G, Spina S, Asselta R, Ghiotto R, Tenchini ML, et al. Molecular characterization of two novel mutations causing factor XI deficiency: A splicing defect and a missense mutation responsible for a CRM+ defect. *Thromb Haemost* 2008; 99: 523-530.
- 112 Mitchell M, Cutler J, Thompson S, Moore G, Jenkins Ap RE, Smith M, et al. Heterozygous factor XI deficiency associated with three novel mutations. *Br J Haematol* 1999; 107: 763-765.
- 113 Zivelin A, Ogawa T, Bulvik S, Landau M, Toomey JR, Lane J, et al. Severe factor XI deficiency caused by a Gly555 to Glu mutation (factor XI-Glu555): a cross-reactive material positive variant defective in factor IX activation. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1782-1789.

- 114 Germanos-Haddad M, de MP, Boehlen F, Peyvandi F, Neerman-Arbez M. Homozygosity for a Thr575Met missense mutation in the catalytic domain associated with factor XI deficiency. *Haematologica* 2005; 90: 418-419.
- 115 Mitchell MJ, Dai L, Clarke JB, Bolton-Maggs PH, Savidge GF, Alhaq A. Characterisation of five factor XI mutations. *Thromb Haemost* 2007; 97: 884-889.
- 116 Gailani D, Schmidt A, Sun MF, Bolton-Maggs PH, Bajaj SP. A cross-reactive material positive variant of coagulation factor XI (FXIP520L) with a catalytic defect. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 781-787.
- 117 RAPAPORT SI, PROCTOR RR, PATCH MJ, YETTRA M. The mode of inheritance of PTA deficiency: evidence for the existence of major PTA deficiency and minor PTA deficiency. *Blood* 1961; 18: 149-165.
- 118 Leiba H, Ramot B, Many A. Heredity and coagulation studies in ten families with Factor XI (plasma thromboplastin antecedent) deficiency. *Br J Haematol* 1965; 11: 654-665.
- 119 Egerberg O. A family with antihemophilic C factor (AHC = plasma thromboplastin antecedent) deficiency without bleeding tendency. *Scand J Clin Lab Invest* 1962; 14: 478-486.
- 120 Edson JR, White JG, Krivit W. The enigma of severe factor XI deficiency without hemorrhagic symptoms. Distinction from Hageman factor and "Fletcher factor" deficiency; family study; and problems of diagnosis. *Thromb Diath Haemorrh* 1967; 18: 342-348.
- 121 Rimon A, Schiffman S, Feinstein DI, RAPAPORT SI. Factor XI activity and factor XI antigen in homozygous and heterozygous factor XI deficiency. *Blood* 1976; 48: 165-174.
- 122 Aghai E, Yaniv I, David M. Factor XI deficiency in an Arab Moslem family in Israel. *Scand J Haematol* 1984; 32: 327-331.
- 123 Bolton-Maggs PH, Young Wan-Yin B, McCraw AH, Slack J, Kernoff PB. Inheritance and bleeding in factor XI deficiency. *Br J Haematol* 1988; 69: 521-528.
- 124 Litz CE, Swaim WR, Dalmaso AP. Factor XI deficiency: genetic and clinical studies of a single kindred. *Am J Hematol* 1988; 28: 8-12.
- 125 Brenner B, Steinberg DM, Laor A, Tavori S, Tatarsky I, Lanir N. Von Willebrand factor antigen and factor XI activity levels predict bleeding tendency in Israeli patients with von Willebrand's disease. *Clin Appl Thromb Hemost* 1995; 1: 260-264.
- 126 Collins PW, Goldman E, Lilley P, Pasi KJ, Lee CA. Clinical experience of factor XI deficiency: the role of fresh frozen plasma and factor XI concentrate. *Haemophilia* 1995; 1: 231.
- 127 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; 12: 490-493.

- 128 Tavori S, Brenner B, Tatarsky I. The effect of combined factor XI deficiency with von Willebrand factor abnormalities on haemorrhagic diathesis. *Thromb Haemost* 1990; 63: 36-38.
- 129 Brenner B, Laor A, Lupo H, Zivelin A, Lanir N, Seligsohn U. Bleeding predictors in factor-XI-deficient patients. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1997; 8: 511-515.
- 130 Walsh PN. The effects of collagen and kaolin on the intrinsic coagulant activity of platelets. Evidence for an alternative pathway in intrinsic coagulation not requiring factor XII. *Br J Haematol* 1972; 22: 393-405.
- 131 Peter MK, Meili EO, von FA. [Factor XI deficiency: do patients with hemorrhagic diathesis also have hemostasis defects?]. *Schweiz Med Wochenschr* 1996; 126: 999-1005.
- 132 Winter M, Needham J, Barkhan P. Factor XI deficiency and a platelet defect. *Haemostasis* 1983; 13: 83-88.
- 133 Peyvandi F, Di MD, Bolton-Maggs PH, Lee CA, Tripodi A, Srivastava A. Classification of rare bleeding disorders (RBDs) based on the association between coagulant factor activity and clinical bleeding severity. *J Thromb Haemost* 2012; 10: 1938-1943.
- 134 Myers B, Pavord S, Kean L, Hill M, Dolan G. Pregnancy outcome in Factor XI deficiency: incidence of miscarriage, antenatal and postnatal haemorrhage in 33 women with Factor XI deficiency. *BJOG* 2007; 114: 643-646.
- 135 Salomon O, Steinberg DM, Tamarin I, Zivelin A, Seligsohn U. Plasma replacement therapy during labor is not mandatory for women with severe factor XI deficiency. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2005; 16: 37-41.
- 136 Pike GN, Cumming AM, Hay CR, Bolton-Maggs PH, Burthem J. Sample conditions determine the ability of thrombin generation parameters to identify bleeding phenotype in FXI deficiency. *Blood* 2015; 126: 397-405.
- 137 Rugeri L, Quelin F, Chatard B, De MP, Negrier C, Dargaud Y. Thrombin generation in patients with factor XI deficiency and clinical bleeding risk. *Haemophilia* 2010; 16: 771-777.
- 138 Zucker M, Seligsohn U, Salomon O, Wolberg AS. Abnormal plasma clot structure and stability distinguish bleeding risk in patients with severe factor XI deficiency. *J Thromb Haemost* 2014; 12: 1121-1130.
- 139 Duga S, Salomon O. Congenital factor XI deficiency: an update. *Semin Thromb Hemost* 2013; 39: 621-631.
- 140 Salomon O, Zivelin A, Livnat T, Dardik R, Loewenthal R, Avishai O, et al. Prevalence, causes, and characterization of factor XI inhibitors in patients with inherited factor XI deficiency. *Blood* 2003; 101: 4783-4788.
- 141 Inbal A, Epstein O, Blickstein D, Kornbrot N, Brenner B, Martinowitz U. Evaluation of solvent/detergent treated plasma in the management of patients with hereditary and acquired coagulation disorders. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1993; 4: 599-604.

- 142 Smith JK. Factor XI deficiency and its management. *Haemophilia* 1996; 2: 128-136.
- 143 Burnouf-Radosevich M, Burnouf T, Huart JJ. [Industrial pasteurization of plasma and criteria of quality]. *Rev Fr Transfus Hemobiol* 1993; 36: 93-102.
- 144 Boehlen F, Casini A, Pugin F, de MP. Pulmonary embolism and fatal stroke in a patient with severe factor XI deficiency after bariatric surgery. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2013; 24: 347-350.
- 145 Mannucci PM, Bauer KA, Santagostino E, Faioni E, Barzegar S, Coppola R, et al. Activation of the coagulation cascade after infusion of a factor XI concentrate in congenitally deficient patients. *Blood* 1994; 84: 1314-1319.
- 146 Bolton-Maggs PH, Perry DJ, Chalmers EA, Parapia LA, Wilde JT, Williams MD, et al. The rare coagulation disorders--review with guidelines for management from the United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation. *Haemophilia* 2004; 10: 593-628.
- 147 Livnat T, Tamarin I, Mor Y, Winckler H, Horowitz Z, Korianski Y, et al. Recombinant activated factor VII and tranexamic acid are haemostatically effective during major surgery in factor XI-deficient patients with inhibitor antibodies. *Thromb Haemost* 2009; 102: 487-492.
- 148 Riddell A, Abdul-Kadir R, Pollard D, Tuddenham E, Gomez K. Monitoring low dose recombinant factor VIIa therapy in patients with severe factor XI deficiency undergoing surgery. *Thromb Haemost* 2011; 106: 521-527.
- 149 O'Connell NM, Riddell AF, Pascoe G, Perry DJ, Lee CA. Recombinant factor VIIa to prevent surgical bleeding in factor XI deficiency. *Haemophilia* 2008; 14: 775-781.
- 150 Schulman S, Nemeth G. An illustrative case and a review on the dosing of recombinant factor VIIa in congenital factor XI deficiency. *Haemophilia* 2006; 12: 223-227.
- 151 Meijers JC, Tekelenburg WL, Bouma BN, Bertina RM, Rosendaal FR. High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis. *N Engl J Med* 2000; 342: 696-701.
- 152 Eichinger S, Schonauer V, Weltermann A, Minar E, Bialonczyk C, Hirschl M, et al. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for recurrent venous thromboembolism. *Blood* 2004; 103: 3773-3776.
- 153 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: 411-415.
- 154 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; 111: 4113-4117.
- 155 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: 261-267.

- 156 Tanis B, Algra A, van der Graaf Y, Helmerhorst F, Rosendaal F. Procoagulant factors and the risk of myocardial infarction in young women. *Eur J Haematol* 2006; 77: 67-73.
- 157 Doggen CJ, Rosendaal FR, Meijers JC. Levels of intrinsic coagulation factors and the risk of myocardial infarction among men: Opposite and synergistic effects of factors XI and XII. *Blood* 2006; 108: 4045-4051.
- 158 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; 1: 658-661.
- 159 Aird WC. Vascular bed-specific thrombosis. *J Thromb Haemost* 2007; 5 Suppl 1: 283-291.
- 160 Rosenberg RD, Aird WC. Vascular-bed--specific hemostasis and hypercoagulable states. *N Engl J Med* 1999; 340: 1555-1564.
- 161 Pauer HU, Renne T, Hemmerlein B, Legler T, Fritzlar S, Adham I, et al. Targeted deletion of murine coagulation factor XII gene-a model for contact phase activation in vivo. *Thromb Haemost* 2004; 92: 503-508.
- 162 Gailani D, Lasky NM, Broze GJ, Jr. A murine model of factor XI deficiency. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1997; 8: 134-144.
- 163 Renne T, Oschatz C, Seifert S, Muller F, Antovic J, Karlman M, et al. Factor XI deficiency in animal models. *J Thromb Haemost* 2009; 7 Suppl 1: 79-83.
- 164 Rosen ED, Gailani D, Castellino FJ. FXI is essential for thrombus formation following FeCl<sub>3</sub>-induced injury of the carotid artery in the mouse. *Thromb Haemost* 2002; 87: 774-776.
- 165 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; 4: 1982-1988.
- 166 Wang X, Cheng Q, Xu L, Feuerstein GZ, Hsu MY, Smith PL, et al. Effects of factor IX or factor XI deficiency on ferric chloride-induced carotid artery occlusion in mice. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 695-702.
- 167 Baird TR, Gailani D, Furie B, Furie BC. Factor XI deficient mice have reduced platelet accumulation and fibrin deposition after laser injury. *Blood* 2004; 104: 66a-a.
- 168 Chan JC, 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; 158: 469-479.
- 169 Minnema MC, Friederich PW, Levi M, von dem Borne PA, Mosnier LO, Meijers JC, et al. Enhancement of rabbit jugular vein thrombolysis by neutralization of factor XI. In vivo evidence for a role of factor XI as an anti-fibrinolytic factor. *J Clin Invest* 1998; 101: 10-14.



- 170 von dem Borne PA, Cox LM, Bouma BN. Factor XI enhances fibrin generation and inhibits fibrinolysis in a coagulation model initiated by surface-coated tissue factor. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2006; 17: 251-257.
- 171 Kraft P, Schwarz T, Meijers JC, Stoll G, Kleinschnitz C. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) deficient mice are susceptible to intracerebral thrombosis and ischemic stroke. *PLoS One* 2010; 5: e11658.
- 172 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; 198: 271-274.
- 173 Gruber A, Hanson SR. Factor XI-dependence of surface- and tissue factor-initiated thrombus propagation in primates. *Blood* 2003; 102: 953-955.
- 174 Takahashi M, Yamashita A, Moriguchi-Goto S, Sugita C, Matsumoto T, Matsuda S, et al. Inhibition of factor XI reduces thrombus formation in rabbit jugular vein under endothelial denudation and/or blood stasis. *Thromb Res* 2010; 125: 464-470.
- 175 Yamashita A, Nishihira K, Kitazawa T, Yoshihashi K, Soeda T, Esaki K, et al. Factor XI contributes to thrombus propagation on injured neointima of the rabbit iliac artery. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1496-1501.
- 176 Lin J, Deng H, Jin L, Pandey P, Quinn J, Cantin S, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of peptidomimetic inhibitors of factor XIa as novel anticoagulants. *J Med Chem* 2006; 49: 7781-7791.
- 177 Deng H, Bannister TD, Jin L, Babine RE, Quinn J, Nagafuji P, et al. Synthesis, SAR exploration, and X-ray crystal structures of factor XIa inhibitors containing an alpha-ketothiazole arginine. *Bioorg Med Chem Lett* 2006; 16: 3049-3054.
- 178 Schumacher WA, Seiler SE, Steinbacher TE, Stewart AB, Bostwick JS, Hartl KS, et al. Antithrombotic and hemostatic effects of a small molecule factor XIa inhibitor in rats. *Eur J Pharmacol* 2007; 570: 167-174.
- 179 Li D, He Q, Kang T, Yin H, Jin X, Li H, et al. Identification of an anticoagulant peptide that inhibits both fXIa and fVIIa/tissue factor from the blood-feeding nematode *Ancylostoma caninum*. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 392: 155-159.
- 180 Decrem Y, Rath G, Blasioli V, Cauchie P, Robert S, Beaufays J, et al. Ir-CPI, a coagulation contact phase inhibitor from the tick *Ixodes ricinus*, inhibits thrombus formation without impairing hemostasis. *J Exp Med* 2009; 206: 2381-2395.
- 181 Campos IT, Tanaka-Azevedo AM, Tanaka AS. Identification and characterization of a novel factor XIIa inhibitor in the hematophagous insect, *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *FEBS Lett* 2004; 577: 512-516.
- 182 Hagedorn I, Schmidbauer S, Pleines I, Kleinschnitz C, Kronthaler U, Stoll G, et al. Factor XIIa inhibitor recombinant human albumin Infestin-4 abolishes occlusive arterial thrombus formation without affecting bleeding. *Circulation* 2010; 121: 1510-1517.
- 183 Lowenberg EC, Meijers JC, Monia BP, Levi M. Coagulation factor XI as a novel target for antithrombotic treatment. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 2349-2357.

- 184 Zhang H, Lowenberg 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; 116: 4684-4692.
- 185 Buller 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; 372: 232-240.
- 186 Corral J, Huntington JA, Gonzalez-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; 2: 931-939.
- 187 Ventura C, Santos AI, Tavares A, Gago T, Lavinha J, McVey JH, et al. Molecular genetic analysis of factor XI deficiency: identification of five novel gene alterations and the origin of type II mutation in Portuguese families. *Thromb Haemost* 2000; 84: 833-840.
- 188 Hill M, McLeod F, Franks H, Gordon B, Dolan G. Genetic analysis in FXI deficiency: six novel mutations and the use of a polymerase chain reaction-based test to define a whole gene deletion. *Br J Haematol* 2005; 129: 825-829.
- 189 Quelin F, Francois D, d'Oiron R, Guillet B, de RE, De MP. Factor XI deficiency: identification of six novel missense mutations (P23L, P69T, C92G, E243D, W497C and E547K). *Haematologica* 2005; 90: 1149-1150.
- 190 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: 829.
- 191 Calafell F, Almasy L, Sabater-Lleal M, Buil A, Mordillo C, Ramirez-Soriano A, et al. Sequence variation and genetic evolution at the human F12 locus: mapping quantitative trait nucleotides that influence FXII plasma levels. *Hum Mol Genet* 2010; 19: 517-525.
- 192 Kanaji T, Okamura T, Osaki K, Kuroiwa M, Shimoda K, Hamasaki N, et al. A common genetic polymorphism (46 C to T substitution) in the 5'-untranslated region of the coagulation factor XII gene is associated with low translation efficiency and decrease in plasma factor XII level. *Blood* 1998; 91: 2010-2014.
- 193 Roldan V, Corral J, Marin F, Pineda J, Vicente V, Gonzalez-Conejero R. Synergistic association between hypercholesterolemia and the C46T factor XII polymorphism for developing premature myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2005; 94: 1294-1299.
- 194 Corral J, Anton AI, Quiroga T, Gonzalez-Conejero R, Pereira J, Roldan V, et al. Influence of the F12 -4 C>T polymorphism on hemostatic tests. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2010; 21: 632-639.
- 195 Wheeler AP, Gailani D. Why Factor XI Deficiency is a Clinical Concern. *Expert Rev Hematol* 2016.
- 196 Gailani D. Gene targeting in hemostasis. factor XI. *Front Biosci* 2001; 6: D201-D207.

- 197 Dentali F, Sironi AP, Ageno W, Bonfanti C, Crestani S, Frattini F, et al. Relationship between ABO blood group and hemorrhage: a systematic literature review and meta-analysis. *Semin Thromb Hemost* 2013; 39: 72-82.
- 198 Petrides M. Guía práctica de medicina trnsfusional. Efectos advesos de la transfusión. 2005: 148-149.
- 199 Colman RW. Contact activation pathway: Inflammatory, fibrinolytic, anticoagulant, antiadhesive and antiangiogenic activities. In: Lippincott Williams, Wilkins, editors. *Haemostasis and Thrombosis*. Philadelphia: 2001. p. 104-21.
- 200 Joseph K, Kaplan AP. Formation of bradykinin: a major contributor to the innate inflammatory response. *Adv Immunol* 2005; 86: 159-208.
- 201 Shariat-Madar Z, Schmaier AH. The plasma kallikrein/kinin and renin angiotensin systems in blood pressure regulation in sepsis. *J Endotoxin Res* 2004; 10: 3-13.
- 202 Renne T, Gailani D. Role of Factor XII in hemostasis and thrombosis: clinical implications. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2007; 5: 733-741.
- 203 Bjorkqvist J, Nickel KF, Stavrou E, Renne T. In vivo activation and functions of the protease factor XII. *Thromb Haemost* 2014; 112: 868-875.
- 204 Longhurst HJ, Tarzi MD, Ashworth F, Bethune C, Cale C, Dempster J, et al. C1 inhibitor deficiency: 2014 United Kingdom consensus document. *Clin Exp Immunol* 2015; 180: 475-483.
- 205 Long AT, Kenne E, Jung R, Fuchs TA, Renne T. Contact system revisited: an interface between inflammation, coagulation, and innate immunity. *J Thromb Haemost* 2016; 14: 427-437.
- 206 Muller F, Gailani D, Renne T. Factor XI and XII as antithrombotic targets. *Curr Opin Hematol* 2011; 18: 349-355.
- 207 Kannemeier C, Shibamiya A, Nakazawa F, Trusheim H, Ruppert C, Markart P, et al. Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 6388-6393.
- 208 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; 103: 903-908.
- 209 Sabater-Lleal M, Martinez-Perez A, Buil A, Folkersen L, Souto JC, Bruzelius M, et al. A genome-wide association study identifies KNG1 as a genetic determinant of plasma factor XI Level and activated partial thromboplastin time. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32: 2008-2016.
- 210 Gueguen P, Chauvin A, Quemener-Redon S, Pan-Petes B, Ferec C, Abgrall JF, et al. Revisiting the molecular epidemiology of factor XI deficiency: nine new mutations and an original large 4qTer deletion in western Brittany (France). *Thromb Haemost* 2012; 107: 44-50.

- 211 Mitchell M, Dai L, Savidge G, Alhaq A. An Alu-mediated 31.5-kb deletion as the cause of factor XI deficiency in 2 unrelated patients. *Blood* 2004; 104: 2394-2396.
- 212 Zucker M, Zivelin A, Landau M, Salomon O, Kenet G, Bauduer F, et al. Characterization of seven novel mutations causing factor XI deficiency. *Haematologica* 2007; 92: 1375-1380.
- 213 Batzer MA, Deininger PL. Alu repeats and human genomic diversity. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 370-379.
- 214 Deininger PL, Batzer MA. Alu repeats and human disease. *Mol Genet Metab* 1999; 67: 183-193.
- 215 Shao Y, Cao Y, Lu Y, Dai J, Ding Q, Wang X, et al. Clinical manifestations and mutation spectrum of 57 subjects with congenital factor XI deficiency in China. *Blood Cells Mol Dis* 2016; 58: 29-34.
- 216 Zucker M, Rosenberg N, Peretz H, Green D, Bauduer F, Zivelin A, et al. Point mutations regarded as missense mutations cause splicing defects in the factor XI gene. *J Thromb Haemost* 2011; 9: 1977-1984.
- 217 Ling G, Kagdi H, Subel B, Chowdary P, Gomez K. Safety and efficacy of factor XI (FXI) concentrate use in patients with FXI deficiency: a single-centre experience of 19 years. *Haemophilia* 2016; 22: 411-418.
- 218 Bane CE, Jr., Ivanov I, Matafonov A, Boyd KL, Cheng Q, Sherwood ER, et al. Factor XI Deficiency Alters the Cytokine Response and Activation of Contact Proteases during Polymicrobial Sepsis in Mice. *PLoS One* 2016; 11: e0152968.
- 219 Itakura A, Verbout NG, Phillips KG, Insall RH, Gailani D, Tucker EI, et al. Activated factor XI inhibits chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes. *J Leukoc Biol* 2011; 90: 923-927.
- 220 Tucker EI, Verbout NG, Leung PY, Hurst S, McCarty OJ, Gailani D, et al. Inhibition of factor XI activation attenuates inflammation and coagulopathy while improving the survival of mouse polymicrobial sepsis. *Blood* 2012; 119: 4762-4768.
- 221 Yates SG, Sarode R. New strategies for effective treatment of vitamin K antagonist-associated bleeding. *J Thromb Haemost* 2015; 13 Suppl 1: S180-S186.
- 222 Chen Z, Seiffert D, Hawes B. Inhibition of Factor XI activity as a promising antithrombotic strategy. *Drug Discov Today* 2014; 19: 1435-1439.
- 223 Gailani D, Bane CE, Gruber A. Factor XI and contact activation as targets for antithrombotic therapy. *J Thromb Haemost* 2015; 13: 1383-1395.
- 224 Schumacher WA, Luetzgen JM, Quan ML, Seiffert DA. Inhibition of factor XIa as a new approach to anticoagulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 388-392.
- 225 Shnerb GR, Harats D, Schiby G, Gailani D, Levkovitz H, Avivi C, et al. Factor XI Deficiency Protects Against Atherogenesis in Apolipoprotein E/Factor XI Double Knockout Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016; 36: 475-481.

- 226 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. *Hematology* 2016; 1-4.
- 227 Takamizawa Y, Araki M, Yoshida N, Yoshioka T, Miura K. A case of a severe factor XI deficiency in patient undergoing hemodialysis without the use of heparin. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2014; 25: 898-899.