

Evaluación de polimorfismos genéticos protrombóticos y alteraciones del sistema fibrinolítico en mujeres con historia de complicaciones obstétricas

Yolanda P Adamczuk¹, María Luisa Iglesias Varela¹, Graciela S Cerrato¹, Ricardo R Forastiero^{1,2}, Marta E Martinuzzo¹

¹Laboratorio de Hemostasia y Trombosis. Servicio de Hematología. Fundación Favaloro. Hospital Universitario. Buenos Aires Argentina

²Hematología. Universidad Favaloro. Buenos Aires. Argentina

Correspondencia:

Dra. Marta E. Martinuzzo

Laboratorio de Hemostasia y Trombosis
Servicio de Hematología, Fundación Favaloro-Hospital Universitario
Belgrano 1746 1er Subsuelo. Hematología
1093 Buenos Aires. Argentina
Fax: (54)(11)4378-1200. Int 1219
TE: (54)(11) 4378-1349

Fecha de recepción: 30/6/09

Fecha de aprobación: 10/7/09

HEMATOLOGIA, Vol. 13 N° 2: 41-48
Mayo-Agosto 2009



ARTÍCULO
ORIGINAL

RESUMEN

La presencia de polimorfismos protrombóticos y algunas alteraciones fibrinolíticas han sido descriptas en las pacientes con pérdidas de embarazos (PE) recurrentes si bien no hay datos concluyentes al respecto y menos aún en pacientes con falla de implantación. El objetivo del trabajo fue en primer lugar analizar la prevalencia de 3 polimorfismos protrombóticos [Factor V Leiden, Polimorfismo del gen de la Protrombina 20210 (PT 20210) y polimorfismo del promotor del PAI 1 (4G5G)] en 147 pacientes con historia de PE comparados con un grupo control de mujeres sanas con historia de embarazos sin complicaciones. En segundo lugar, analizar la correlación entre 3 pruebas del sistema fibrinolítico: PAI 1 inmunológico, Lisis de euglobulinas (LE) pre y post isquemia y polimorfismo del PAI 1 4G5G en un grupo de 92 mujeres con historia de PE (n=49) o fallas de implantación (FI) post procedimientos de fertilización in vitro (n=43).

La prevalencia de los polimorfismos protrombóticos estudiados en las pacientes no fue significativamente diferente de la hallada en el grupo control normal, excepto para el Factor V Leiden en PE tardías (p=0.03) y sólo una tendencia para el PAI 4G4G en abortos tempranos recurrentes (p=0.08).

La respuesta en la LE post isquemia fue mala en el 17.4% y ligeramente alterada en el 19.3%. Considerando a la población total de 92 mujeres con complicaciones obs-

tétricas, no existió relación entre los niveles de PAI 1 o la respuesta fibrinolítica a la isquemia con el genotipo del promotor del PAI. Los niveles de PAI 1 estuvieron significativamente más elevados en las mujeres que presentaban factores de riesgo clásico de enfermedad cardiovascular (32.46 vs. 20.6 ng/ml, p=0.023), y esto fue especialmente debido al grupo de portadoras del genotipo homocigota 4G4G. Los niveles de PAI 1 y las LE pre y post isquemia presentaron correlación positiva con el índice de masa corporal.

En el grupo de pacientes estudiadas sólo se halló una clara asociación entre el factor V Leiden y las PE tardías. El polimorfismo del PAI 1 no se asoció a los niveles de PAI 1 ni a la respuesta fibrinolítica, excepto que las pacientes presentaran factores de riesgo clásico de enfermedad cardiovascular.

Palabras claves: Polimorfismos protrombóticos, PAI 1, polimorfismo del promotor del PAI 1, pérdidas de embarazo, factores de riesgo clásico de enfermedad cardiovascular

INTRODUCCIÓN

Durante el embarazo están descriptos cambios importantes y graduales del sistema hemostático, que provoca una inclinación del equilibrio normal del sistema hemostático hacia un fenotipo protrombótico,

de manera de mantener la integridad y función placentaria y preparar a la madre para el momento del parto. Entre las modificaciones que se producen se observa aumento de factores de coagulación, siendo los más importantes el de factor VII, VIII y factor von Willebrand, especialmente en las últimas etapas del embarazo¹. Sumado a esto, se producen disminuciones en los niveles de inhibidores fisiológicos del sistema de coagulación especialmente de proteína S. Finalmente se observan modificaciones del sistema fibrinolítico hacia un estado de hipofibrinólisis, dado por la disminución del activador tisular del plasminógeno, y el aumento de los niveles del inhibidor del activador del plasminógeno PAI 1 y del inhibidor de origen placentario PAI 2^{1,2}.

Es clara la asociación de embarazo con el desarrollo de complicaciones tromboticas, especialmente en el periodo puerperal, debido al estado hipercoagulable que llega a su máxima expresión en el momento del parto. La presencia de trombofilia genética concomitante es capaz de aumentar varias veces el riesgo de trombosis asociada al embarazo³⁻⁵.

La asociación de los anticuerpos antifosfolípidos (trombofilia adquirida) y trombofilia hereditaria, y dentro de éstas el factor V Leiden (FVL) y el polimorfismo del gen de la protrombina 20210 G→A (PT 20210), con las pérdidas de embarazo ha sido relatada y establecida a través de metanálisis. No obstante la asociación estadística, la relación de causalidad entre trombofilia genética y pérdidas de embarazo especialmente tempranas, es controvertida⁶⁻⁸.

En la década de los 90 se ha relatado una alta frecuencia de alteraciones en la respuesta fibrinolítica a la isquemia en pacientes con abortos a repetición^{9,10}, en la mayor parte de los casos debido a aumentos de los niveles plasmáticos de PAI 1.

Los objetivos del presente trabajo fueron evaluar la asociación de la presencia de polimorfismos protrombóticos con las pérdidas de embarazo, así como evaluar las variables que influyen en la respuesta fibrinolítica alterada a la isquemia por éstasis venosa y en el aumento del PAI en mujeres con historia de pérdidas de embarazo o con historia de falla de implantación ante procedimientos de fertilización in vitro.

PACIENTES

En un primer estudio se evaluaron los polimorfismos genéticos, FVL, PT 20210 y Polimorfismo

de inserción deleción del promotor del PAI -675 4G5G (PAI 4G5G) en un grupo de 147 mujeres con pérdidas de embarazo que concurrieron a nuestro servicio para estudiar la presencia de trombofilia. Se incluyeron: 92 con pérdidas tardías (>10 semanas de gestación de un feto morfológicamente normal), y 55 con historia de abortos tempranos (< 10 semanas, excluyendo huevos anembrionados) a repetición (edad media 35 años, con un rango de embarazos perdidos entre 2 y 13). Como grupo control se estudiaron 88 mujeres sanas comparables en edad (media 34 años) sin complicaciones obstétricas, con al menos 2 embarazos normales.

En una segunda etapa del estudio, para la evaluación de las alteraciones del sistema fibrinolítico (polimorfismo del PAI 4G/4G, PAI inmunológico y Lisis de Euglobulinas pre y post isquemia) se estudiaron 49 mujeres que habían sufrido por lo menos 2 pérdidas de embarazo recurrentes (grupo de pérdidas de embarazo PE), además se incluyeron 43 mujeres que tuvieron al menos 2 procedimientos de fertilización In vitro fallidos con transferencia de al menos 3 embriones (Grupo de falla de implantación, FI). La media de edad de las mujeres estudiadas fue de 36.6 años. Las pacientes fueron interrogadas y evaluadas desde el punto de vista clínico para recolectar datos acerca de los factores de riesgo clásico para enfermedad cardiovascular (CVD): hipertensión, tabaquismo, obesidad, dislipidemia, diabetes.

EXTRACCIÓN Y TOMA DE MUESTRA

Tanto los pacientes como los controles permanecieron en reposo durante por lo menos 20 minutos antes de la toma de la muestra. Para obtener las muestras de plasma se realizaron extracciones venosas por punción única y certera, evitando el éstasis venoso prolongado. Los primeros 5 ml fueron descartados y luego se recolectó la sangre en tubos plásticos que contenían citrato de sodio 0,11M (9:1). Las muestras fueron centrifugadas dos veces durante 10 minutos a 3500g para obtener el plasma pobre en plaquetas (PPP). El PPP de las pacientes fue utilizado inmediatamente para la realización de la lisis de euglobulinas y se congelaron fracciones de 1 ml a -70 °C, para los estudios posteriores (PAI).

Para los análisis de biología molecular se recolectaron 2.5 ml de sangre entera en tubos estériles conteniendo EDTA-K₃. En el caso de que hubiera que

tomar muestras de sangre para otras determinaciones además de las de biología molecular, se tuvo la precaución de cargar en primer lugar los tubos destinados para el análisis de biología molecular. Las muestras se guardaron a 4 °C hasta el momento de la extracción del DNA.

Luego de la primera extracción se colocó el tensiómetro a 90-100 mmHg (media entre la Sistólica y Diastólica) durante 20 min, finalizado este tiempo se tomó una nueva muestra recogida en citrato para realizar la lisis de euglobulinas post isquemia.

DETERMINACIÓN DE PAI INMUNOLÓGICO

Para la determinación de PAI-1 inmunológico se utiliza plasma citratado pobre en plaquetas. El método inmunológico (Asserachrom® PAI, Diagnostica Stago) se basa en la unión del PAI presente en el plasma a un anticuerpo monoclonal de captura pegado a la placa de ELISA; luego de la incubación, los pocillos fueron lavados y se agregó un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa. Finalmente luego de otro lavado, la actividad de peroxidasa se reveló mediante el agregado de TMB. El color desarrollado fue medido en el lector VERSAmax microplate reader a 405 nm. El valor normal de PAI en la población sana es de 4 a 44 ng/ml.

LISIS DE EUGLOBULINAS

Para la precipitación de la fracción euglobulínica se agregaron 250 ml de plasma citratado pobre en plaquetas en un tubo conteniendo 4 ml de agua destilada con 50 ml de ácido acético al 1%. Luego de 30 min a 4 °C se centrifugó 5 min a 3000 rpm. Se descartó el sobrenadante, se secó el exceso de líquido, el precipitado se redisolvió en 250 ml de borato de sodio al 1% y luego se coaguló por el agregado de 250 ml de CaCl₂ 25 mM. Una vez que se formó el coágulo se mantuvo en baño termostático a 37 °C y se tomó el tiempo que tardó en lisis.

La respuesta a la isquemia se consideró buena cuando el tiempo de lisis de la muestra post isquemia fue menor o igual a 30 min (percentilo 97.5), ligeramente alterada cuando fue entre 30 y 60 min (entre percentilo 90 y 97.5), y alterada si fue mayor a 60 min, rangos de referencia establecidos en nuestro laboratorio en la población normal.

DETERMINACIÓN DE FACTOR V LEIDEN, PT 20210, PROMOTOR DEL PAI 4G5G

La mutación G1691A en el gen del Factor V (FVL) fue evaluada a través de una PCR-RFLP, con la enzima de restricción Mnl I (New England Biolab) (11). La transición G→A en el nucleótido 20210 en la región 3' no traducida del gen de la protrombina, se determinó a través de una PCR-RFLP (12), utilizando la enzima *Hind III* (Promega) para la digestión. El polimorfismo 4G/5G en el promotor del gen del PAI [inserción (5G)/delección (4G)] se estudió mediante una PCR-RFLP (14) que utiliza como enzima de restricción la *Bsl I* (New England Biolab).

ESTADÍSTICA

La comparación entre las prevalencias de los polimorfismos protrombóticos en las pacientes y los controles normales se realizó mediante el test de Contingencia X². Las correlaciones se realizaron a través de la correlación no paramétrica de Spearman. Las comparaciones de los niveles de PAI o de lisis de euglobulinas entre distintos grupos de pacientes se realizó mediante el test de Mann Withney. Todos los cálculos estadísticos se realizaron mediante el Software SPSS versión 15.5.

RESULTADOS

Al evaluar los polimorfismos protrombóticos en el primer grupo evaluado (147 mujeres con pérdidas de embarazo y 88 controles normales), no se halló asociación entre la presencia de PT20210 AG con las pérdidas de embarazo, pero sí se halló una prevalencia significativa mayor de FVL en las pacientes con historia de PE tardías (tabla 1). Al considerar la presencia del polimorfismo del PAI se observó una tendencia entre la presencia del genotipo 4G4G (homocigota 4G) y los abortos tempranos recurrentes, tabla 1.

En una segunda etapa se estudiaron 3 pruebas del sistema fibrinolítico: Dosaje de PAI inmunológico, LE pre y post isquemia y el polimorfismo del PAI 4G/5G en un grupo de 92 mujeres con historia de PE (n=49) o FI post procedimientos de fertilización asistida (n=43) comparadas el grupo control de 88 mujeres.

En este nuevo grupo de pacientes, la prevalencia del genotipo homocigota 4G/4G no demostró dife-

TABLA 1.- Prevalencia de los diferentes mutaciones y polimorfismos protromboticos en pacientes con pérdidas de embarazo

	Abortos tempranos recurrentes	Pérdidas fetales tardías	Controles normales
FVL	3/55 5.4%	14/92 15.2%*	2.3%
PT20210	1/45 2.2%	2/100 2.0%	0%
PAI-1 (4G/4G)	16/44 36.4% §	18/93 19.3%	21.3%

*OR 7.7 (1.7-35.5), p=0.03

§OR 2.1 (0.9-4.6), p=0.08

TABLA 2.- Parámetros fibrinolíticos en relación al genotipo del promotor del PAI 4G5G

Polimorf PAI	LE basal (min) Media (DE)	LE Post (min) Media (DE)	PAI (ng/ml) Media (DE)
4G/4G	219 (60)	46 (44)	22.6 (19.1)
4G/5G	218 (65)	38 (38)	24.6 (23.4)
5G/5G	220 (61)	41 (40)	24.1 (22.1)

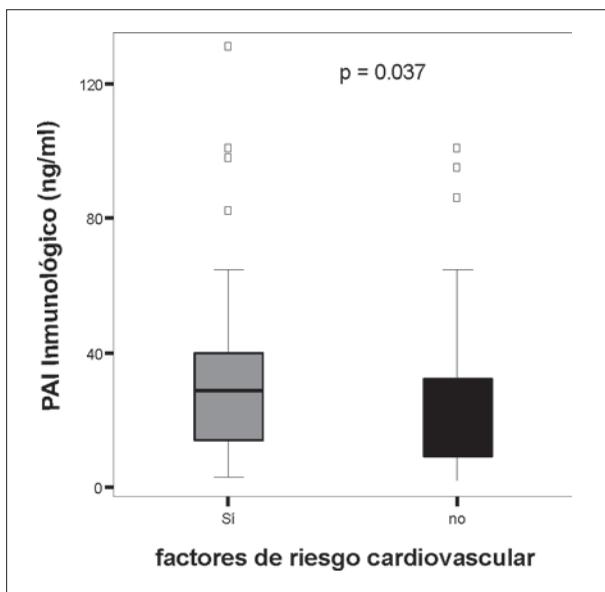


Fig. 1.- Niveles de PAI 1 inmunológico en relación con la presencia de factores de riesgo clásico de CVD en la población total de pacientes con complicaciones obstétricas (n=92). Los resultados son graficados en Box-plot y expresados en mediana, percentilos 25 y 75, y rango.

rencias significativas ni en el grupo con PE (26.3%) ni con FI (32%) comparado con el grupo control (21.6%).

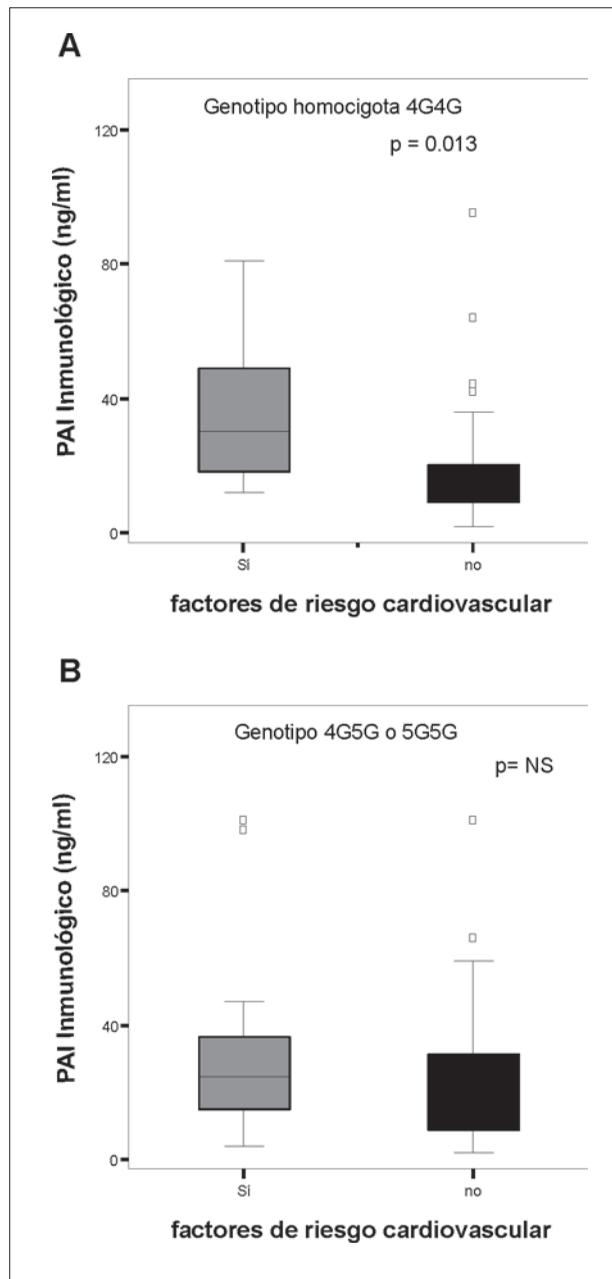


Fig. 2.- a) Niveles de PAI 1 inmunológico en relación con la presencia de factores de riesgo clásico de CVD en la población total de pacientes con complicaciones obstétricas portadores del genotipo homocigota 4G4G del polimorfismo del promotor del PAI 1. Los resultados son graficados en Box-plot y expresados en mediana, percentilos 25 y 75, y rango.

b) Niveles de PAI 1 inmunológico en relación con la presencia de factores de riesgo clásico de CVD en la población total de pacientes con complicaciones obstétricas portadores del genotipo heterocigota 4G5G u homocigota normal 5G5G del polimorfismo del promotor del PAI 1. Los resultados son graficados en Box-plot y expresados en mediana, percentilos 25 y 75, y rango.

La prevalencia de la mala respuesta en la LE post isquemia fue de 17.4 % en la población de pacientes con complicaciones obstétricas. Cuando se evaluó la

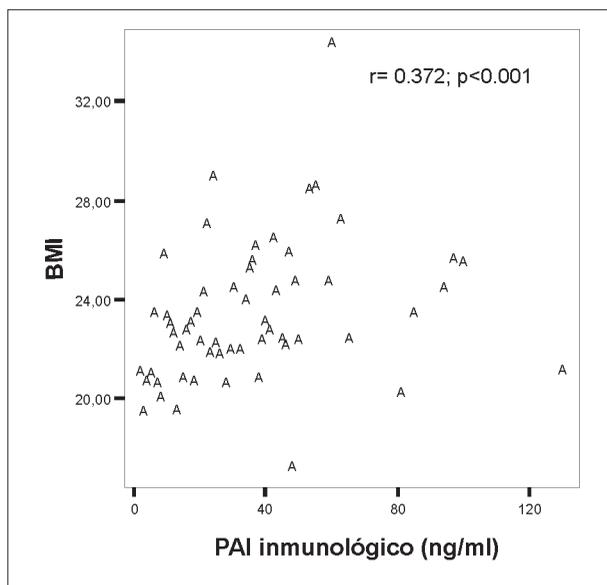


Fig. 3.- Niveles de PAI 1 inmunológico de las pacientes con complicaciones obstétricas en relación con la respuesta fibrinolítica a la isquemia post oclusión venosa. Los resultados son graficados en Box-plot y expresados en mediana, percentilos 25 y 75, y rango.

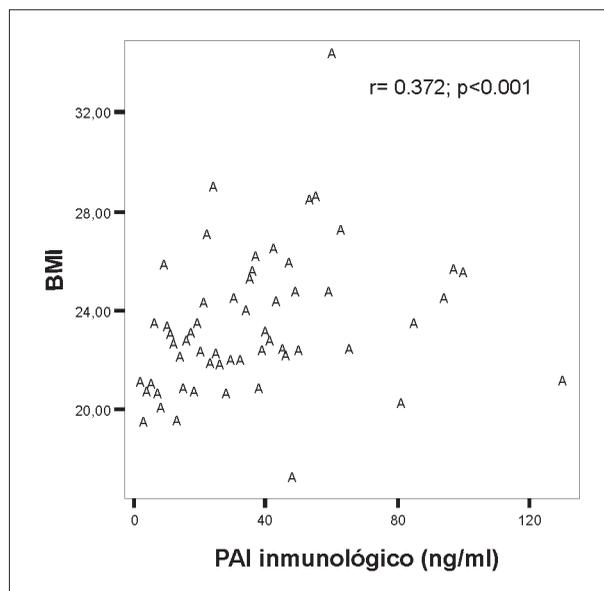


Fig. 4.- Correlación no paramétrica (Spearman Rank) entre el BMI y los niveles de PAI inmunológico de las pacientes con complicaciones obstétricas.

asociación entre los diferentes parámetros: Lisis de euglobulinas (pre y post isquemia) y PAI inmunológico con respecto al polimorfismo del PAI, tampoco se observaron diferencias. Los resultados obtenidos se pueden observar en la Tabla 2.

La presencia de algún factor de riesgo clásico para enfermedad cardiovascular (hábito de fumar, dislipemia, obesidad, diabetes) se observó en 36 de las 92 pacientes estudiadas. Al evaluar los niveles de PAI, se observó que los mismos estaban significativamente más elevados en aquellas pacientes que presentaban factores de riesgo clásico de enfermedad cardiovascular. Los resultados se muestran en la Figura 1. Lo mismo se observó cuando se evaluaron los niveles de PAI en pacientes con genotipo homocigota 4G4G (Figura 2a), pero no en las de genotipo heterocigota u homocigota normal 5G5G (Figura 2b).

También se verificó que los niveles de PAI fueron significativamente superiores en aquellas pacientes que presentaban pobre respuesta a la isquemia comparados con los de respuesta fibrinolítica adecuada como se observa en la figura 3, existiendo una correlación estadística positiva entre los tiempos de lisis de Euglobulinas tanto pre ($r = 0.472$, $p < 0.001$), como post isquemia ($r = 0.402$, $p < 0.001$) y los niveles de PAI inmunológico.

Analizando los datos obtenidos con las pacientes, se pudo constatar que existió una correlación positiva estadísticamente significativa entre el nivel de PAI plasmático y el Índice de masa corporal (BMI), Figura 4.

La frecuencia de pobre respuesta (mala y ligeramente alterada) fue mayor en aquellas pacientes con factores de riesgo para enfermedad cardiovascular y genotipo 4G4G comparadas con las del mismo genotipo sin factores de riesgo (Figura 5).

DISCUSIÓN

La asociación estadística entre las pérdidas embriofetales y la presencia de trombofilia genética ha sido establecida en base a estudios familiares y también a metaanálisis. Esta asociación es clara entre el FVL y la PT 20210 AG con la historia de pérdidas de embarazo tempranas recurrentes y pérdidas tardías no recurrentes^{7, 15}, complicaciones que también se asociaron a la deficiencia de proteína S. No obstante esto no fue hallado al analizar la presencia de deficiencia de proteína C, antitrombina o la homocigocidad para la variante termolábil de la MTHFR⁷. Cabe aclarar que en estas revisiones de la literatura no consideraron el polimorfismo del promotor del

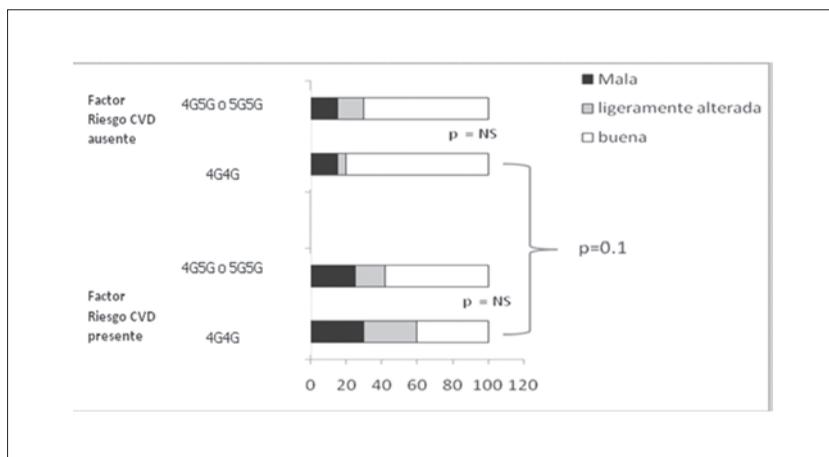


Fig. 5.- Proporción de respuestas fibrinolíticas malas, ligeramente alteradas y normales frente a la isquemia por estasis venosa en función del genotipo del promotor del PAI y la presencia o ausencia de factores de riesgo de CVD.

PAI 1 4G/5G. En nuestro estudio si bien la prevalencia de FVL fue significativamente más elevada en las pacientes con historia de PE tardía, dato que coincide con la literatura. Aunque la prevalencia en abortadoras tempranas a repetición fue mayor que en los controles no se alcanzó significación estadística, posiblemente por el número de pacientes evaluadas. Con respecto a la presencia del polimorfismo del PAI 4G5G existen dos estudios del mismo grupo de investigadores que encuentran una mayor prevalencia del alelo 4 G, en las pacientes con abortos a repetición. Cabe destacar que en uno de ellos las prevalencias fueron comparadas con las de la literatura¹⁶ y en el otro el grupo control de mujeres fértiles con al menos 2 nacimientos vivos era muy pequeño¹⁷, comparado con la gran cantidad de abortadoras a repetición incluidas. En nuestro estudio, en el que utilizamos grupos controles adecuados, analizando el genotipo homocigota -675 4G4G del promotor del gen del PAI 1, si bien la prevalencia fue superior a la del grupo control, esta diferencia no alcanzó significación estadística en las pacientes con historia de pérdidas de embarazo tardías. Tan solo se observó una tendencia a una asociación entre el genotipo 4G4G y las pérdidas tempranas. No obstante, esta tendencia no se corroboró en el segundo grupo de pacientes evaluado.

El PAI 1 es sintetizado en las células endoteliales, plaquetas (gran reservorio de este inhibidor) y adipocitos. Las células endoteliales no parecen ser grandes productores de PAI 1 en ausencia de estímulo

los hormonales, inflamatorios o metabólicos. El gen del PAI 1 tiene diversas zonas respondedoras a un grupo de sustancias¹⁸, como por ejemplo la zona que reconoce la VLDL en la zona del promotor que induce la transcripción del gen y cuya acción es influenciada por el polimorfismo 4G5G^{19,20}. Asimismo se observan efectos del TNF α , insulina, glucosa, LDL, angiotensina II entre otros²¹, se considera al gen del PAI a un gen de expresión fundamentalmente inducible.

El PAI 1 aumenta durante el embarazo, puede ser sintetizado por los sincitiotrofoblastos placentarios y tendría un aumento muy superior en pacientes que desarrollan preeclampsia o retardo del crecimiento fetal. En este grupo de pacientes el aumento de PAI 1 no se relacionó con el índice de masa corporal²².

Existen evidencias de asociación entre los factores de riesgo clásico para enfermedad cardiovascular y los niveles de PAI, esto fue descrito inicialmente en pacientes con infarto agudo de miocardio, en individuos añosos, y luego estudiado en el contexto del estudio PREVEND, en hombres y mujeres de mediana edad. En el mismo se observó una correlación positiva entre los niveles de PAI y los de triglicéridos, colesterol, glucemia, PCR, presión diastólica, siendo la mayor parte de estas correlaciones más marcada en hombres y mujeres post menopáusicas, que en las mujeres en edad fértil²³.

Asimismo es muy clara la interrelación entre los genotipos y otras variables biológicas que influyen en el fenotipo que presenta cada individuo. En el caso

de los niveles de PAI, estos se asocian positivamente a los índices de masa corporal y la presencia de resistencia a la insulina y es conocido que cuando los individuos bajan de peso los niveles del PAI-1 disminuyen²¹.

Es sabido que la actividad fibrinolítica global está dada por los niveles de PAI-1. En nuestro trabajo vimos una muy clara asociación entre la respuesta fibrinolítica a la isquemia alterada y los niveles más elevados de PAI. A pesar de ser una población joven, tanto la expresión de hipofibrinólisis como los niveles de PAI estuvieron claramente asociados a la presencia de factores de riesgo clásico para enfermedad cardiovascular, diabetes, dislipemia, hipertensión y sobrepeso u obesidad, confirmando lo hallado en la literatura. En esta población sin embargo no se habían registrado eventos tromboticos ni venosos ni arteriales, probablemente por la edad.

Los niveles del PAI 1 y la hipofibrinólisis no se hallaron asociados al genotipo 4G4G del promotor del PAI cuando se consideró el grupo total de pacientes, pero sí cuando se analizaron las mujeres que presentaban factores de riesgo clásico, confirmando nuevamente la interacción entre el genotipo y otras variables biológicas y metabólicas para la expresión del fenotipo hipofibrinolítico por aumento de PAI, como ya fue descrito en la literatura.

SUMMARY

Evaluation of prothrombotic polymorphisms and fibrinolytic tests in patients with history of obstetric complications.

The presence of prothrombotic polymorphisms as well as some fibrinolysis alterations was depicted in patients with recurrent pregnancy loss (RPL); but there are no clear conclusions about their associations with fertilization procedure failure (FPF). The aim of this study was to evaluate the presence of prothrombotic polymorphisms (factor V Leiden, PT 20210 y PAI-1 promoter polymorphism 4G5G) in 147 women with history of RPL and fibrinolytic tests: PAI-1 antigen, euglobulin lysis time (ELT) pre and post venous occlusion (VO) and PAI 4G5G in 92 women referred for RPL (n=49), or FPF (n=43). There was a statistic association between the presence of Factor V Leiden and late pregnancy loss, $p=0.03$. The other polymorphisms did not show statistic association with RPL, except a trend for PAI 4G4G ($p=0.08$). PAI 1 levels and the fibrinolytic response were not associated with PAI polymorphism considering all patients. The prevalence of very poor fibrinolytic response (PFR) to VO was 17.9% and that of slightly poor in 19.3% in the patients. PAI-1 levels were higher in women with classical risk factors for cardiovascular disease (CVD), particularly in those with 4G4G homozygous genotype. PAI-

1, as well as pre and post VO ELT correlated with Body Mass Index.

In this group of patients, only factor V Leiden was associated with late PL. The prothrombotic polymorphisms were not associated to early RPL or FPF. Moreover, in these healthy and young women PAI-1 levels and fibrinolytic response to VO were not associated with PAI polymorphism, except in patients with classical risk factors of CVD, which were the main variables associated with hypofibrinolysis.

Key words: prothrombotic polymorphisms, PAI 1, PAI 1 promoter polymorphism, pregnancy loss, cardiovascular disease risk factors

BIBLIOGRAFÍA

1. Franchini M. Hemostasis and pregnancy. **Thromb Hemost** 2006; 95: 401-13
2. Benjamin Brenner. Haemostatic changes in pregnancy. **Thromb Res** 2004; 114, 409-414.
3. Firederich PW, Sanson BJ, Simioni P, y col. Frequency of pregnancy related venous thromboembolism in anticoagulant factor-deficient women: implications for prophylaxis. **Ann Intern Med** 1996; 125: 955-60
4. Martinelli I, De Stefano V, Taioli E, y col. Inherited thrombophilia and first venous thromboembolism during pregnancy and puerperium. **Thromb Haemost** 2002; 87: 791-5
5. Harvey D, Lowe GM. Factor V Leiden: association with venous thromboembolism in pregnancy and screening issues. **Br J Biomed Sci** 2004; 61: 157-64.
6. Opatrny L, David M, Kahn SR, y col. Association between antiphospholipid antibodies and recurrent fetal loss in women without autoimmune disease: a meta-analysis. **J Rheumatol** 2006; 33: 2214-21.
7. Robertson L, Wu O, Langhorne P, Twaddle S, y col. Thrombophilia in pregnancy: a systematic review. **Br J Haematol** 2006; 132: 171-96.
8. Middeldorp S. Thrombophilia and pregnancy complications: cause or association? **J Thromb Haemost** 2007; 5 (suppl 1): 276-82.
9. Patrassi GM, Sartori MT, Ruffatti A, y col. Fibrinolytic pattern in recurrent spontaneous abortions: no relationship between hypofibrinolysis and anti-phospholipid antibodies. **Am J Hematol** 1994; 47: 266-72
10. Sarto A, Rocha M, Martínez M, y col. Hipofibrinólisis y otras alteraciones de la hemostasia en mujeres con antecedentes de fallas reproductivas tempranas. **Medicina** 2000; 60: 441-7.
11. Zöller B, Svensson PJ, He X, Dahlbäck B. Identification of the same factor V gene mutation in 47 out of 50 thrombosis-prone families with inherited resistance to activated protein C. **J Clin Invest** 1994; 94: 2521-4.
12. Rajesh K. Kapur, Lisa A. Mills, Silvia G. Spitzer, Mae B. Hultin. A Prothrombin Gene Mutation Is Significantly Associated With Venous Thrombosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 1997; 17: 2875-2879.
13. Hironobu Fujimura, Tomio Kawasaki, Toshiyuki Sakata, Hideo Ariyoshi, Hisao Kato, Morito Monden and Toshiyuki Miyata. Common C677T Polymorphism in the Methylenetetrahy-

- drofolate Reductase Gene Increases the Risk for Deep Vein Thrombosis in Patients with Predisposition of Thrombophilia. **Throm Res** 98 (2000) 1-8.
14. Margaglione M, Grandone E, Cappucci G, y col. An alternative method for PAI-1 promoter polymorphism (4G/5G) typing. **Thromb Haemost** 1997; 77: 605-6 (letter).
 15. Rey E, Kahn SR, David M y col. Thrombophilic disorders and fetal loss: A meta-analysis. **Lancet** 2003; 361 (9361): 901-8
 16. Goodman CS, Coulam CB, Jeyendran RS, y col. Which thrombophilic gene mutations are risk factors for recurrent pregnancy loss? **Am J Reprod Immunol** 2006; 56(4): 230-6.
 17. Coulam CB, Wallis D, Weinstein J y col. Comparison of thrombophilic gene mutations among patients experiencing recurrent miscarriage and deep vein thrombosis. **Am J Reprod Immunol** 2006; 60: 426-31.
 18. Vaughan DE. PAI-1 and atherothrombosis. **J Thromb Haemost** 2005; 3: 1879-83.
 19. Lijnen HR. Pleiotropic functions of plasminogen activator in-