

**EVALUACION DE TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR PARA EL DIAGNOSTICO DE  
POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN MUJERES CON COMPLICACIONES OBSTÉTRICAS**

<sup>1</sup>Monteverdi María Laura, <sup>1</sup>Lucca Andrea, <sup>1</sup>Caeiro Luciana <sup>1-2</sup>Ghione Silvia.

<sup>1</sup>Fundación Para el Progreso de la Medicina. Córdoba. Argentina.

<sup>2</sup>Instituto Modelo de Cardiología. Córdoba. Argentina

María Laura Monteverdi .E-mail: [monteverdiml@gmail.com](mailto:monteverdiml@gmail.com).351-6262169

## RESUMEN

El diagnóstico basado en el estudio del ADN ha avanzado sorprendentemente en las últimas décadas, permitiendo por ejemplo la identificación y caracterización de mutaciones y polimorfismos de un número importante de genes involucrados en diferentes patologías. Tal es el caso de las alteraciones hemostáticas de origen genético que pueden provocar trombosis asociada al fracaso obstétrico. En este trabajo se presenta la evaluación de técnicas moleculares para el diagnóstico de marcadores genéticos como la mutación C677T del gen de metilen-tetra-hidro-folato-reductasa (MTHFR) y el polimorfismo 4G/5G del gen inhibidor del activador del plaminógeno-1 (PAI-1). Ambas alteraciones reconocidas como factores genéticos a considerar en el fracaso obstétrico. Del estudio comparativo entre la población control y las mujeres con complicaciones obstétricas, surgió que el polimorfismo 4G/4G del gen PAI-1 tiene una prevalencia mayor entre las mujeres afectadas que es estadísticamente significativa (Odds Ratio: 2.83). En el caso del gen MTHFR, las pacientes homocigotas para la mutación C677T, mostraron una prevalencia mayor que las del grupo control, pero sin significancia estadística.

**Palabras clave:** biología molecular, PCR, MTHFR, PAI-1, trombosis-genética, fracaso obstétrico.

## INTRODUCCIÓN

La biología molecular ha adquirido desde hace algunas décadas una importancia primordial a la hora de diagnosticar diferentes patologías, de allí su valor en la práctica clínica. Dentro de esta disciplina, la PCR (reacción de la polimerasa en cadena) provocó una revolución en el diagnóstico, debido a que mediante la amplificación exponencial es posible detectar ADN o ARN a partir de una cantidad mínima de muestra. Numerosas variantes de la PCR original permiten amplificar ADN y ARN con diferentes objetivos. Entre ellas podemos mencionar: **multiplex PCR**, que amplifica múltiples secuencias blanco simultáneamente con más de un par de cebadores; **PCR en nido**, que se utiliza fundamentalmente para mejorar la sensibilidad y especificidad; **PCR-RFLP**, en la que el ADN amplificado es sometido a digestión con enzimas de restricción y posterior electroforesis en gel de agarosa; **PCR-AE**, que utiliza cebadores alelo-específicos con un cambio de una base correspondiente a la mutación para que únicamente se unan y consecuentemente sean amplificados aquellos alelos que presenten una determinada mutación; y **RT-PCR**, consistente en la transcripción reversa de moléculas de ARN seguida de PCR, permitiendo de este modo la amplificación del ARN.

Cabe mencionar que el diagnóstico mediante el estudio del ADN ha experimentado un avance importante, por ejemplo en la identificación y caracterización de un número elevado de genes involucrados en diferentes patologías.

Durante el embarazo ocurren cambios importantes y graduales del sistema hemostático dirigidos a prevenir hemorragias en el momento del parto. Dichos cambios incluyen alteraciones en la producción y actividad de varias proteínas involucradas en este sistema, que provocan la disminución en la fibrinólisis y el incremento en la coagulación, inclinando el equilibrio normal del sistema hemostático hacia el fenotipo protrombótico. Concretamente se observa un aumento de factores de coagulación como el factor VII, VIII, de von Willebrand y fibrinógeno.

Por otro lado ocurre una disminución de inhibidores fisiológicos del sistema de coagulación, fundamentalmente proteína S, así como también modificaciones en el sistema fibrinolítico con la resultante de un estado de hipofibrinólisis.

Este estado de hipercoagulabilidad “fisiológico” puede verse incrementado cuando están presentes alteraciones hemostáticas adquiridas o genéticas. Tal es el caso de la presencia de anticuerpos anti fosfolípidos, disminución genética de los inhibidores y/o presencia de polimorfismos pro trombóticos. Este escenario coloca a la mujer embarazada en una situación de aumento de riesgo trombótico y puede ser la causa de diversas complicaciones obstétricas desde el momento de la implantación.

De lo anteriormente expuesto surge el interés creciente del estudio de marcadores genéticos asociados a trombofilias durante el embarazo, por ser considerados causa de fracaso obstétrico. Numerosos estudios han demostrado la correlación entre la mutación G1691A del factor V, conocida como factor V de Leiden y la mutación G20210A de la protrombina y pérdidas recurrentes de embarazo; su vinculación no es tan clara en fallas de implantación. Más recientes son los trabajos que se suman a estas dos alteraciones, como lo son el estudio del polimorfismo del promotor del gen inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) (4G/5G) y la mutación C677T del gen de la metilen-tetra-hidro-folato-reductasa (MTHFR), asociándolos a complicaciones obstétricas (1).

El PAI-1 es uno de los principales reguladores del sistema fibrinolítico al inhibir al activador tisular del plasminógeno (t-PA), su sobreexpresión puede comprometer el mecanismo de eliminación de fibrina promoviendo eventos trombóticos. Al menos en parte, los niveles de PAI-1 son modulados genéticamente, ya que su concentración está relacionada con la presencia del polimorfismo 4G/5G en la región promotora del gen. Dicha región del gen PAI-1 en la posición -675 puede tener una única inserción/delección de una base guanina, dando

como resultado la presencia de alelos que contienen 4 ó 5 guaninas. El alelo 5G está asociado a la supresión de la transcripción, mientras que el alelo 4G provoca un aumento en la transcripción. Por lo tanto el polimorfismo tiene una acción reguladora de la concentración plasmática de PAI-1. Individuos homocigotas para el alelo 4G, tienen niveles de PAI-1 circulante de tres a cinco veces mayores, comparados con los alelos 4G/5G o 5G/5G (2,3).

La enzima MTHFR interviene en la re-metilación de homocisteína a metionina. Existe entonces una relación teórica inversamente proporcional entre la acción de la MTHFR y los niveles de homocisteína. La homocisteína es un aminoácido resultante de la desmetilación de la metionina que se adquiere en la dieta a través de la ingesta de proteínas (4). La mutación C677T en el gen MTHFR genera una variante de la enzima termolábil, cuya actividad se ve disminuida en el caso del genotipo homocigota (TT) en un 50%, y en el genotipo heterocigota (CT) en un 20-40%, respecto a la enzima normal.

Como consecuencia de la mutación puede ocurrir un aumento en las concentraciones plasmáticas de homocisteína (5). Está demostrado que la hiperhomocisteinemia leve y moderada puede provocar defectos en el tubo neural del feto y abortos recurrentes (6).

Debido a que ambos defectos en MTHFR y PAI-1 son congénitos, el análisis molecular es considerado la base del diagnóstico de laboratorio. La incidencia de estas alteraciones genéticas encontrada a nivel mundial conjuntamente con el riesgo trombótico que conllevan, pone de manifiesto la importancia del estudio de las mismas.

Por lo anteriormente expuesto en nuestro laboratorio se validaron metodologías de biología molecular para la detección de dichas variantes y la evaluación posterior de la relación entre ellas y la presencia de fracaso obstétrico.

## OBJETIVOS

1) Evaluar el desempeño de RFLP-PCR y PCR-AE para la determinación de la mutación C677T del gen MTHFR y del polimorfismo 4G/5G del gen PAI-1 respectivamente.

2) Determinar la prevalencia de la mutación C677T de MTHFR y del polimorfismo 4G/5G del PAI-1 y su asociación con la presencia de complicaciones obstétricas comparándolas con un grupo de mujeres sanas pertenecientes a la misma población.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Muestras:** sangre periférica, obtenida con EDTA-K3.

**Población en estudio:** se estudiaron 122 mujeres entre 25 y 55 años con complicaciones obstétricas que concurren a los laboratorios del Instituto Modelo de Cardiología (IMC) y de la Fundación para el progreso de la Medicina (FPM), entre diciembre de 2009 y abril de 2012. Las características clínicas del grupo (según su historia clínica) fueron las siguientes: dificultad para embarazarse; fracaso de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides o ICSI (del inglés "intracytoplasmic sperm injection"); 1 aborto; 2 o más abortos; muerte fetal intrauterina (MFIU); retardo en el crecimiento intrauterino (RCIU) y eclampsia.

**Población control:** se incluyeron 50 mujeres entre 25 y 55 años sanas, sin complicaciones obstétricas, con al menos un embarazo normal, sin antecedentes de trombosis, sobrepeso, ni enfermedad cardiovascular, según su historia clínica.

**Extracción del ADN:** el ADN fue extraído por medio del uso de una resina de intercambio iónico, Chelex 100. La resina Chelex es una resina quelante de iones metálicos polivalentes, que actúan como catalizadores en la ruptura de ADN a altas temperaturas, previniendo de este

modo la degradación del ADN. Brevemente 50µl de sangre entera fueron incubados con una solución de CINH<sub>4</sub> al 0.8% con la finalidad de lisar los glóbulos rojos. Después de centrifugar, el sedimento fue lavado con agua estéril y resuspendido en una solución de Chelex 100 al 5%. Posteriormente fue incubado durante una hora a 60°C y luego 8 minutos a 100°C. Finalmente fue centrifugado y se separó el sobrenadante en el cual se encuentra el ADN (7).

**Detección de la mutación C677T del gen de MTHFR:** las muestras de ADN purificado fueron sometidas a PCR utilizando los cebadores descritos por Genevieve y col. (8), que permiten coamplificar parte del gen de MTHFR que contiene la mutación y un fragmento del gen del fibrinógeno, que se utiliza como control interno de la PCR y de la digestión con enzimas de restricción. Para la amplificación de ambos genes se establecieron las condiciones óptimas de reacción: MgCl<sub>2</sub> 1,5mM, dNTPs 0,2mM, cebadores específicos para MTHFR y fibrinógeno 0,5µM y Taq ADN Polimerasa 0,02U/µl. El ciclado de PCR que se usó fue: 3 minutos a 95°C, 35 ciclos de: 40 segundos a 91°C, 40 segundos a 55°C y 1 minuto a 72°C, y finalmente un ciclo de extensión de 5 minutos a 72°C (8). Los productos de PCR fueron digeridos durante 3hs a 37°C con la enzima de restricción Hinf I (Promega 10UI/µl) que reconoce la siguiente secuencia: G▼ANT-CTNA▲G (8). Los productos de digestión fueron analizados mediante geles de agarosa al 3% con buffer TAE y visualizados con bromuro de etidio.

**Validación:** para validar la técnica se determinó la presencia o no de la mutación C677T del gen de MTHFR en 14 muestras. Los resultados fueron comparados con un laboratorio de referencia (Laboratorio IACA, Bahía Blanca) con el que hubo un 100 % de concordancia.

**Polimorfismo 4G/5G del gen PAI-1:** las muestras fueron sometidas a PCR utilizando cebadores específicos para el alelo 4G y 5G en dos tubos de reacción separados por cada muestra, con un cebador 3' común y uno 5' control, éste último se incluye para verificar la amplificación del ADN, según descrito por Andreas Festa y cols. (9).

El polimorfismo 4G/5G del gen PAI-1 consiste en una única inserción/delección de una base Guanina en la posición -675 de la región del promotor del gen, lo que genera dos posibles alelos, 4G ó 5G. Para su determinación se diseñó la PCR-AE utilizando cebadores alelo específicos. El cebador F1 hibrida sobre el alelo 5G y el F2 sobre el 4G, cada uno se dispone en tubos separados y a cada uno de dichos tubos se agrega un cebador común F3, que con F1 amplificará un fragmento de 140 pb en el caso del alelo que contiene 5 bases Guaninas (alelo 5G) y con F2 amplificará un fragmento de 139 pb, en el caso del alelo con 4 bases Guaninas (alelo 4G). Como control interno de la amplificación se agrega a cada tubo de reacción un tercer cebador F4, que genera con F3 un fragmento de 256 pb (1) que debe estar presente siempre si la reacción fue exitosa. Las condiciones óptimas de la PCR-AE establecidas fueron las siguientes:  $MgCl_2$  1,5mM, dNTPs 0,2mM; cebadores: F1, F2 y F3 0,5 $\mu$ M, F4 0,1 $\mu$ M y Taq ADN Polimerasa Promega 0,02U/ $\mu$ l. La PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94 °C, 3 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C, 1 minuto, 65°C, 45 segundos y 72°C, 75 segundos, seguidos de una extensión a 72°C durante 5 minutos, en el termociclador Perkin-Elmer 2400.

Los productos de PCR fueron analizados mediante geles de agarosa al 2% con buffer TAE y visualizados con bromuro de etidio.

**Validación:** para validar la técnica se determinó el polimorfismo del gen de PAI-1 en seis muestras, cuyos resultados fueron comparados con un laboratorio de referencia (Laboratorio IACA, Bahía Blanca) resultando en un 100 % de concordancia.

**Análisis estadístico:** se utilizó el programa Instat. Al ser variables categóricas se realizaron tablas de contingencia aplicando el test Chi cuadrado. En todos los casos se consideraron valores de  $p < 0.05$  como estadísticamente significativos. El riesgo se calculó con el estadístico Odds Ratio (OR) y se expresó con un intervalo de confianza (IC) del 95%.



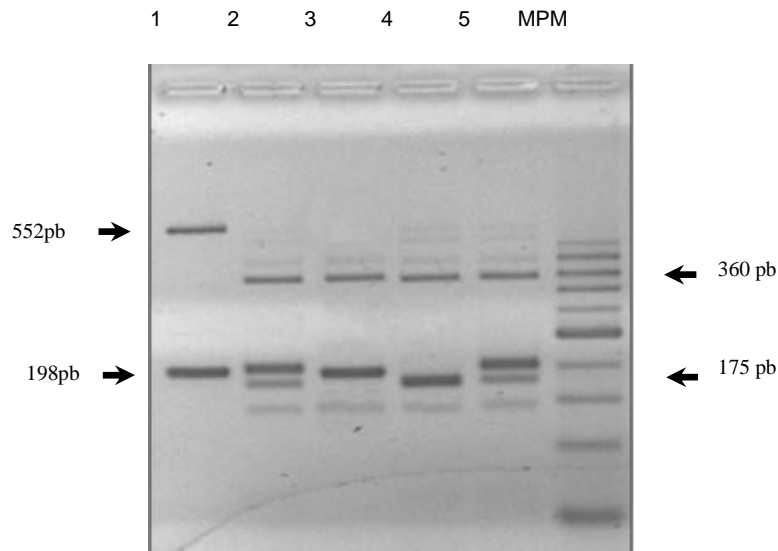
## RESULTADOS

### **Evaluación del desempeño de PCR-RFLP y PCR-AE para la determinación de la mutación C677T del gen MTHFR y del polimorfismo 4G/5G del gen PAI-1**

**Mutación C677T del gen de MTHFR:** en este caso se coamplificó un fragmento del gen de MTHFR y parte del gen del fibrinógeno que se utiliza a modo de control interno de la PCR y de la digestión. Los productos obtenidos de la amplificación analizados en gel de agarosa, muestran dos fragmentos de ADN de 552 y 198 pares de base (pb) (Figura I, carril 1) correspondientes a los fragmentos amplificados del gen de Fibrinógeno y de MTHFR respectivamente.

Los productos amplificados fueron sometidos a la digestión con la enzima Hinf I, que genera tres fragmentos de 56, 136 y 360 pb, pertenecientes al gen de fibrinógeno, y que se observa en todos los casos. En cuanto al gen de MTHFR, si la mutación no está presente la enzima no digiere y por lo tanto se observa un fragmento de 198 pb, ( Figura I, carril 3). Si por el contrario uno de los alelos está mutado, posterior a la digestión se observa un fragmento de 175 pb, correspondiente al alelo mutado y además la banda de 198 pb correspondiente al alelo sano (carriles 2 y 5), este es el patrón que presentan los individuos heterocigotas. Finalmente en el caso que ambos alelos estén mutados (individuo homocigota) se observa solo la banda de 175 pb (carril 4).

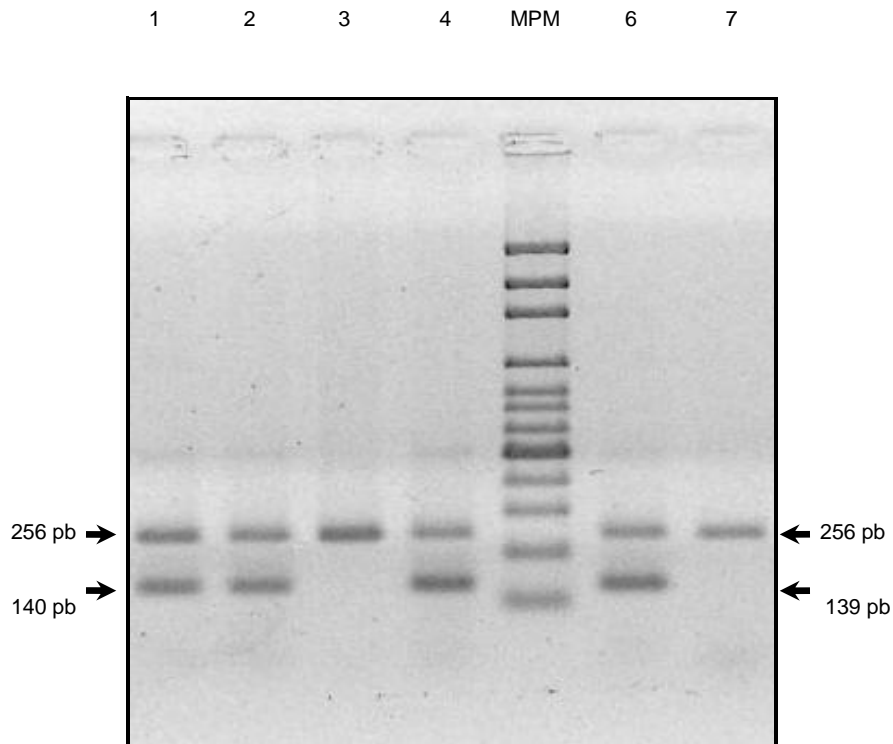
**Figura I:** productos de la co-amplificación por PCR del gen de MTHFR y de fibrinógeno y su posterior digestión, analizados en gel de agarosa al 3%.



Carril 1: producto amplificado sin digerir, carriles 2 y 5 patrón de individuos heterocigotos para la mutación, carril 3: patrón de individuo que no presenta la mutación, carril 4: patrón de individuo homocigota para la mutación, carril 6: marcador de peso molecular (MPM).

**Polimorfismo 4G/5G del gen PAI-1:** Los productos obtenidos de la amplificación analizados en gel de agarosa, muestran en todos los casos el fragmento de ADN de 256 pb (control de amplificación) y una banda de 139pb o de 140pb según amplifique el alelo 4G ó 5 G. Los patrones posibles que pueden observarse son los siguientes: **Genotipo 4G/5G** (carriles 1 y 2), **Genotipo 5G/5G** (carriles 3 y 4) y **Genotipo 4G/4G** (carriles 6 y 7)

**Figura II:** productos de amplificación de la PCR-AE del gen PAI-1, analizados gel de agarosa al 2%.



Carril 1 y 2: patrón de individuo 4G/5G, carril 3 y 4: patrón de individuo 5G/5G, carril 5: marcador de peso molecular (MPM), carril 6 y 7: patrón de individuo 4G/4G.

### **Estudio comparativo de la prevalencia de la mutación C677T de MTHFR y del polimorfismo del gen PAI-1 entre la población control y las pacientes con complicaciones obstétricas**

A fin de establecer la posible relación entre fracaso obstétrico y la mutación C677T de MTHFR y el polimorfismo del gen PAI-1, se estudió la presencia de ambas alteraciones genéticas en un grupo de mujeres que presentaron diferentes manifestaciones clínicas relacionadas a dificultades en el embarazo cuya distribución se observa en la Tabla 1.

**Tabla 1:** Distribución de las diferentes patologías en la población estudiada (n:122)

<b>Dificultad para embarazarse</b>	34/122 (28%)
<b>Fracaso de ICSI</b>	14/122 (11,5%)
<b>1 aborto</b>	34/122 (28%)
<b>2 ó más abortos</b>	32/122 (26%)
<b>MFIU</b>	5/122 (4.1 %)
<b>Eclampsia</b>	2/122 (1.6%)
<b>RCIU</b>	1/122 (0.8%)

Los valores obtenidos de la prevalencia de las alteraciones estudiadas en el grupo control se detallan en la Tabla 2. Al evaluar la mutación C677T del gen de MTHFR un 54% de las mujeres resultaron heterocigotas, mientras que la prevalencia de heterocigotas en las mujeres con complicaciones obstétricas fue mayor (Tabla 3). De igual modo ocurre con la prevalencia de mujeres homocigotas para la mutación, donde la prevalencia es mayor en el grupo de mujeres con complicaciones (Tablas 2 y 3).

En cuanto al polimorfismo de PAI-1 el genotipo 4G/4G, asociado a trombosis, tiene una prevalencia mayor en la población con trastornos en el embarazo.

**Tabla 2:** prevalencia de la mutación C677T del gen de MTHFR y del polimorfismo del gen PAI-1 en el grupo control.

<b>Mutación C677T MTHFR</b>	<b>n:50</b>
Sin mutación	<b>16/50 (32 %)</b>
Heterocigoto	<b>27/50 (54%)</b>
Homocigoto	<b>7/50 (14 %)</b>
<b>Polimorfismo de PAI-1</b>	
4G/5G	<b>32/50 (64 %)</b>
<b>4G/4G</b>	<b>6/50 (12 %)</b>
5G/5G	<b>12/50 (24 %)</b>

**Tabla 3:** prevalencia de la mutación C677T del gen de MTHFR y del polimorfismo del gen PAI-1 en la población con complicaciones obstétricas.

<b>Mutación C677T MTHFR</b>	<b>n:89</b>
Sin mutación	15/89(17%)
Heterocigoto	55/89 (62%)
Homocigoto	19/89 (21%)
<b>Polimorfismo de PAI-1</b>	<b>n:122</b>
4G/5G	55/122 (45 %)
4G/4G	34/122 (28 %)
5G/5G	33/122 (27 %)

Al considerar la mutación homocigota de MTHFR no se halló diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y las pacientes con complicaciones obstétricas (Tabla 4). En la mutación heterocigota tampoco se observó diferencia estadísticamente significativa, lo cual es lógico dado la prevalencia de esta mutación en la población sana.

Analizando los datos obtenidos del polimorfismo 4G/4G del gen PAI-1 se pudo constatar que existió una correlación positiva estadísticamente significativa en las pacientes con complicaciones, (OR 2.83, Tabla 4) revelando una clara tendencia de aumento del riesgo trombofílico en este grupo.

**Tabla 4:** Comparación población sana vs pacientes con complicaciones obstétricas

	<b>Pacientes</b>	<b>Población control</b>			
<b>MTHFRC677T</b>	<b>N: 89</b>	<b>N:50</b>	<b>p</b>	<b>OR</b>	<b>IC</b>
<b>Heterocigoto</b>	55/89 (62%)	27/50 (54%)	0.3763	1.378	0.6831-2.78
<b>Homocigoto</b>	19/89 (21%)	7/50 (14%)	0.3669	1.667	0.6472-4.296
<b>PAI-1</b>	<b>N: 122</b>	<b>N:50</b>	<b>p</b>	<b>OR</b>	<b>IC</b>
<b>4G/4G</b>	34/122 (28%)	6/50 (12%)	0.0288	2.833	1.106-7,257

## DISCUSIÓN

En general, para la mutación C677T de la MTHFR, casi todos los estudios han encontrado una incidencia similar en todos los grupos raciales (entre 10 y 15% de homocigotos), excepto en los africanos y los descendientes de éstos en América (en torno al 7% de homocigotos) (4). Para el polimorfismo 4G/5G del gen PAI-1 estudios previos muestran que la prevalencia es de 10 % de homocigotos 4G/4G.(1).

Nuestros hallazgos, aún cuando el número de individuos sanos fue limitado, sugieren que la prevalencia de la mutación C677T de la MTHFR y del polimorfismo 4G/5G del gen PAI-1 es de 14% y 12% de homocigotos respectivamente, en la población estudiada.

La literatura muestra que el polimorfismo 4G/5G del gen PAI-1 y la mutación C677T de la MTHFR están asociados a trombosis venosas y complicaciones obstétricas del embarazo como aborto recurrente y preeclampsia severa (1,15)

En el estudio de Guan y colaboradores (10) se demostró asociación entre el genotipo 4G/4G y aborto recurrente que se veía potenciada si se asociaba al gen del genotipo homocigota de MTHFR. Por otro lado, Dossembach-Glaninger y col (11) estudiaron varios factores genéticos entre los que se encontraba el polimorfismo del PAI-1 4G/5G y la concurrencia aislada de genotipo 4G/4G no tuvo asociación significativa con aborto recurrente.

En la actualidad se suman una gran cantidad de estudios que demuestran la vinculación entre el fracaso obstétrico y la base del conocimiento que hoy se tiene sobre sujetos homocigotos 4G/4G que tienden a mostrar unas concentraciones del PAI-1 un 25% superiores a los sujetos 5G/5G (con los heterocigotos 4G/5G situados en valores intermedios) (12).

Por otro lado, la hiperhomocisteinemia como consecuencia de un genotipo homocigoto de MTHFR se considera factor de riesgo trombofílico. (13,14). Por tal motivo, conocer la existencia de algún defecto trombofílico congénito o adquirido junto a otros parámetros bioquímicos de la coagulación es crucial para planificar el embarazo, ya que permite conocer el riesgo de complicaciones obstétricas, para poder prevenirlas instaurando el tratamiento adecuado.

Mediante este estudio fue posible validar la técnica de RFLP-PCR para la detección de la mutación C677T del gen de MTHFR. Tomando en cuenta la experiencia publicada en trabajos



previos fue posible ajustar las condiciones al Laboratorio de Biología Molecular de la Fundación Para el Progreso de la Medicina, contando así con una técnica que si bien es laboriosa, resulta robusta, reproducible y económica. En cuanto a la determinación del polimorfismo 4G/5G del gen PAI-1, se validó la técnica de PCR-AE. Esta técnica resulta robusta, reproducible y relativamente simple de llevar a cabo ya que solo consiste en la realización de PCR y evaluación posterior de los productos mediante electroforesis en geles de agarosa.

En este trabajo demostramos que en la población estudiada hay una alta prevalencia del polimorfismo 4G/4G del gen PAI-1 como factor de riesgo, confirmando la interacción entre el genotipo y otras variables biológicas y metabólicas que se asocian con el incremento del riesgo trombofílico y alteraciones obstétricas.

Los resultados presentados confirman la importancia del estudio de estos polimorfismos, con principal énfasis en el caso del polimorfismo del gen PAI-1, en protocolos trombofílicos para los casos de fracaso obstétrico.

Los autores declaran que no hay conflicto de intereses de ningún tipo.

**AGRADECIMIENTO:** un agradecimiento especial al laboratorio de Biología molecular de la FPM.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Sáez RA, Pons AG, Germain A. Trombofilias Congénitas. Impacto reproductivo y perspectivas de tratamiento. Rev. Med.Clin. Condes. 2007; 18: 383-93.
2. Isordia-Salas I, Leñanos-Miranda A, Sainz I, Reyes-Maldonado E, Borrayo- Sanchez G. Asociación entre el polimorfismo 4G/5/ en el gen del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) y el infarto agudo de miocardio con elevación del ST en pacientes jóvenes. Revista Española de Cardiología. 2009; 62:365-72.
3. Sarto A, Rocha M, Martínez M, Pascualini S. Hipofibrinólisis y otros defectos de la Hemostasia en mujeres con antecedentes de fallas reproductivas tempranas. Medicina 2000; 60:441-7.
4. Sanchez-Marín B, Grasa J.M. Polimorfismo C677T del gen de la metilentetrahidrofolatoreductasa (MTHFR) en la patología isquémica vascular. Rev Neurol 2006; 43:630-6.
5. Alijotas-Reig JY, Ferrer-Raventós JC. Trombofilia congénita y aborto recurrente: estrategias diagnósticas y recomendaciones terapéuticas. Med Clin Bar.2005; 125:626-31.
6. Lockwood CJ .Inherited thrombophilias in pregnant patients: Detection and treatment paradigm. Obstetrics & Gynecology 2002; 99: 333-41.
7. Kambara CS, Boissaye R, Stewart J.Maine State Police Crime laboratory. Forensic Biology Section Chelex 100 según Chelex 100 extraction of DNA ,versión 5.1 29/1/2003.
8. Genevieve VA ,Mathonnet F , Bouclt C , Bertille M , Vinatier I, Peltier J ,Mazancourt P. An improved method for the detection of the thermolabile variant of methylenetetrahydrofolatereductase. Clinical Chemistry 1998; 44:1045-7.

9. Festa A, D' Agostino R, Jr Rich S, JennyNS, Russell P, Haffner TS. Promoter (4G/5G) Plasminogen Activator Inhibitor-1 Genotype and Plasminogen Activator Inhibitor-1 Levels in Blacks, Hispanics, and Non-Hispanics Whites: Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Circulation* 2003; 107:2422-7.
10. Guan LX, Du XY, Wang JX, Gao L, Wang RL, Li HB , Wang SX. Asociation of genetics polymorphisms in plasminogen activator inhibitor -1 gene and 5, 10 methylenetetrahydrofolate reductase gene with recurrent early spontaneous abortion. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*.2005;22:330-3.
11. Dossenbach-Glaninger A, van Trotsenburg M , Dossenbach M, Oberkanins C , Moritz A, Krugluger W ,Huber J , Hopmeier P .Plasminogen activator inhibitor 1 4G/5G polymorphism and coagulation factor XIII Val 34 Leu polymorphism: impaired fibrinolysis and early pregnancy loss. *Clin Chem*.2003;49:1081-6.
12. Gonzalez- Ordoñez AJ. Bases genéticas de la enfermedad tromboembólica venosa. *Química Clínica* 2003; 5:367-81.
13. Bertina RM. Genetic approach to thrombophilia *Thromb Haemost* 2001; 86: 92-103.
14. Varela ML, Cerrato. Major and potential prothrombotic genotypes in a cohort of patients with venous thromboembolism .*Thromb Res* 2001;104:317-24.
15. Otero AM, Pou Ferrari Pons R, Lens D, Elisa E ,Dellepiane M, Storch E, Attarian D, Ferrari A, Pierri S, Motta N. Trombofilia y pérdida recurrente de embarazo. *Rev Med Uruguay* 2004; 20:106-13.