

## ARTÍCULO ORIGINAL

# Evaluación de cinco polimorfismos de genes trombofílicos en parejas con aborto habitual

Antonio Quintero-Ramos,<sup>a,b</sup> Laura Leticia Valdez-Velázquez,<sup>a,b</sup> Guillermo Hernández,<sup>a,b</sup>  
 Luz Margarita Baltazar,<sup>d</sup> Jorge R. Padilla-Gutiérrez,<sup>a,b</sup> Yeminia Valle,<sup>a,b</sup> Katya Rodarte,<sup>a,b</sup> Rocío Ortiz,<sup>a,b</sup>  
 Martha Ortiz-Aranda,<sup>a,b</sup> Norma Olivares,<sup>c</sup> Fernando Rivas<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Centro de Investigación Biomédica de Occidente IMSS, <sup>b</sup>Programa de Doctorado en Genética Humana, CUCS, Universidad de Guadalajara, <sup>c</sup>Hospital General de Occidente, Secretaría de Salud, Guadalajara, Jalisco, México

<sup>d</sup>Facultad de Medicina, Universidad de Colima, Colima, México

Recibido en su versión modificada: 24 de noviembre de 2005

Aceptado: 6 de enero de 2006

## RESUMEN

Se han propuesto factores genéticos trombofílicos asociados con anormalidades obstétricas que implican la terminación temprana del embarazo. El propósito del estudio fue investigar la posible asociación de polimorfismos génicos trombofílicos con el aborto habitual (AH). Se analizaron muestras de dos grupos de personas que participaron voluntariamente en el estudio. El primero ( $n > 100$ ) consistió en mujeres atendidas en el Centro Médico de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social y a sus parejas, por el antecedente reproductivo de por lo menos tres abortos idiopáticos ( $n > 100$ ). El grupo de referencia ( $n > 200$ ) lo formaron adultos sanos de ambos sexos residentes de Jalisco. El ADN se extrajo de una muestra de sangre periférica y se tipificaron, mediante PCR-RFLP o -SSP, los polimorfismos *FII G20210A*, *FV G1691A*, *MTHFR C677T*, *ECA I/D* y *TNF G-308A*. Las proporciones genotípicas en el grupo de referencia fueron similares a las predichas por la ley de Hardy-Weinberg y las comparaciones intergrupales alélicas, genotípicas y fenotípicas no mostraron diferencias significativas para ninguno de los polimorfismos estudiados. Estos resultados sugieren que los polimorfismos de los genes trombofílicos no representan un factor de riesgo para AH en nuestro medio.

## Palabras clave:

Aborto habitual, trombofilia, polimorfismos

## SUMMARY

An association between thrombophilic genes and obstetric conditions with early pregnancy termination has been previously proposed. In the present study we attempted to evaluate the possible association between thrombophilic genetic polymorphisms and habitual abortion (HA). Samples from two groups of volunteers were analyzed. The experimental group ( $n > 100$ ) was conformed by women attending the Centro Medico de Occidente, IMSS and their male couples, with a reproductive history of at least three miscarriages. The reference group ( $n > 200$ ) was composed by male and female healthy adults living in the state of Jalisco, Mexico. DNA was extracted from peripheral blood, and polymorphisms *FII G20210A*, *FV G1691A*, *MTHFR C677T*, *ECA I/D* y *TNF G-308A* were typed by PCR-RFLP or -SSP. Genotype proportions in the reference group were in agreement with the Hardy-Weinberg expectations. Allele, genotype, and phenotype proportion inter-group comparisons did not show statistically significant differences. The present results could not demonstrate that thrombophilic polymorphisms constitute risk factors for HA in Jalisco.

## Key words:

Habitual abortion, thrombophilia, gene polymorphisms

## Introducción

Se conoce que una de las complicaciones del embarazo es el aborto espontáneo, que ocurre con una frecuencia de 10%.<sup>1</sup> Aquellos que se repiten en dos o más gestaciones sucesivas se denominan abortos de repetición (a partir de dos) o abortos habituales (tres o más), con una frecuencia de 0.5 a 3% de los embarazos.<sup>2,3</sup> Aunque en muchos casos no se

llega a conocer la etiología del aborto de repetición, aproximadamente en 40% de los casos se encuentra una causa o un factor asociado al aborto habitual (AH).

Entre las causas más comunes del AH están los factores inmunológicos (~ 40%), anatómicos (~25%), hormonales (~28%), genéticos (~6%) e infecciosos (<1%).<sup>4</sup> En relación con los factores genéticos involucrados, recientemente se han estudiado algunos relacionados con la coagulación o

\*Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Fernando Rivas, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social. Sierra Mojada No. 800, Col. Independencia, Guadalajara, Jalisco C. P. 44340. Tel. 01 33 3618 9410, ext. 31922, fax: 01 33 3618 1756. Correo electrónico: genesmx@hotmail.com

trombofilia, tanto en complicaciones obstétricas, como en pérdidas gestacionales de diferentes períodos.<sup>6-7</sup> Por esta razón, se consideró conveniente el estudio de cinco genes trombofílicos (no ligados) en casos de pérdidas del embarazo tempranas y recurrentes.

El término "trombofilia" se refiere a los defectos hereditarios o adquiridos en los sistemas de la coagulación, que predisponen a eventos tromboembólicos. Al ocurrir a nivel placentario, pueden conducir a un desenlace del embarazo no deseable como el aborto.<sup>8-9</sup> De hecho, numerosos estudios han documentado la asociación entre variantes de genes trombofílicos con entidades patológicas que involucran la interrupción espontánea del embarazo, aunque los datos informados son controversiales.<sup>8,10</sup>

El factor II de la coagulación (FII) tiene el polimorfismo G20210A, considerado también como factor de riesgo para trombosis. Por ello, cabe la posibilidad de que éste polimorfismo se encuentre asociado con anomalías placentarias trombóticas y AH.<sup>13-15</sup> Por otra parte, la mutación G1691A en el gen del factor V de la coagulación (FV), conocida como mutación Leiden, produce un estado hipercoagulable que puede llevar a complicaciones obstétricas o AH.<sup>11-12</sup>

La metilenetetrahidrofolato reductasa (MTHFR) es una enzima que actúa como cofactor en la vía de metilación de la homocisteína a metionina. Algunos de sus polimorfismos génicos, en especial el C677T modifican la actividad enzimática y se asocian con hiperhomocisteinemia. Existen reportes que asocian la hiperhomocisteinemia con complicaciones vasculares de tipo obstétrico.<sup>14,16-17</sup>

La enzima convertidora de angiotensina (ECA) promueve la transformación de angiotensina I a angiotensina II, que constituye un péptido vasoconstrictor potente. El polimorfismo inserción/deleción (I/D) de ECA se ha relacionado con problemas de la circulación en el embarazo<sup>15,18-19</sup> por lo que también es posible su asociación con AH.<sup>20-21</sup>

El factor de necrosis tumoral (TNF) es una citoquina proinflamatoria que regula la secreción de sustancias vasoactivas que facilitan la coagulación. Las concentraciones de

TNF están relacionadas en parte, con factores genéticos, como el polimorfismo TNF G-308A que se asocia con una actividad transcripcional diferencial.<sup>15,22</sup> A este respecto, existen estudios sobre este polimorfismo con AH.<sup>23-24</sup>

Con base en estas observaciones, existe la posibilidad de que polimorfismos de genes trombofílicos representen factores de riesgo y se encuentren asociados con aproximadamente 30% de las complicaciones obstétricas.<sup>5-7,25</sup> El propósito del presente trabajo fue investigar variantes en cinco genes trombofílicos como factores de riesgo para AH.

## Material y métodos

**Grupos de estudio:** el grupo de casos (n>100) estuvo formado por mujeres y sus parejas que presentaron al menos tres abortos. Las pacientes fueron atendidas en el servicio de Genética del Hospital de Ginecología y Obstetricia del Centro Médico Nacional de Occidente, IMSS, con diagnóstico de aborto habitual de origen idiopático. El grupo de referencia (n>200) consistió en personas de ambos sexos residentes en el Estado de Jalisco, no relacionadas entre sí y referidas como sanas. En todos los casos, su participación en el estudio fue voluntaria.

**Procedimientos de laboratorio:** a cada participante se le tomó una muestra de sangre periférica para la extracción del ADN de acuerdo con los procedimientos habituales del laboratorio.<sup>26</sup> Los polimorfismos estudiados fueron tipificados de acuerdo con técnicas previamente publicadas: FII G20210A,<sup>27</sup> FV G1691A,<sup>11</sup> MTHFR C677T,<sup>28</sup> ECA I/D<sup>29</sup> y TNF G-308A.<sup>22,30</sup> El ADN fue amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e iniciadores secuencia - específicos (SSPs) o enzimas de restricción (RFLPs), así como corrimientos electroforéticos en geles de poliacrilamida y tinción con nitrato de plata.

**Análisis:** la comparación de las distribuciones se hizo mediante pruebas no paramétricas ( $\chi^2$  y exacta de Fisher) y el nivel de significancia estadística fue 0.05.

**Cuadro I. Frecuencias alélicas y genotípicas por gen en los grupos R y AH (%)**

Gen	Grupo, n	11	Genotipo		1	Alelo 2
			12	22		
FII	R, 216	209 (97)	7 (3)	0	425 (98)	7 (2)
	AH, 119	119 (100)	0	0	238 (100)	0
FV	R, 218	208 (95)	10 (5)	0	426 (98)	10 (2)
	AH, 119	114 (96)	5 (4)	0	233 (98)	5 (2)
MTHFR	R, 213	59 (28)	112 (53)	42 (20)	230 (54)	196 (46)
	AH, 120	44 (37)	56 (47)	20 (17)	144 (60)	96 (40)
ECA	R, 220	59 (27)	113 (51)	48 (22)	231 (52)	209 (48)
	AH, 119	27 (23)	66 (55)	26 (22)	120 (50)	118 (50)
TNF	R, 214	182 (85)	30 (14)	2 (1)	394 (92)	34 (8)
	AH, 122	113 (93)	8 (7)	1 (1)	234 (96)	10 (4)

Alelos: 1 = G, 2 = A para FII, FV y TNF; 1=C, 2=T para MTHFR; 1=I, 2=D para ECA. Valor porcentual en cada casilla redondeado.

## Resultados

Las distribuciones genotípicas en el grupo de referencia estuvieron concordantes ( $p > 0.1$ ) con las predichas por la ley de Hardy-Weinberg (HW). En el grupo AH no hubo diferencias significativas entre mujeres y varones en los cinco marcadores, por lo que se sumaron los datos de ambos sexos y se analizaron en conjunto. Los genotipos para cada uno de los polimorfismos y las frecuencias alélicas y genotípicas se muestran en el cuadro I.

Las comparaciones intergrupales de las distribuciones genotípicas y alélicas no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) para cada uno de los cinco marcadores analizados.

## Discusión

El origen similar (zona metropolitana de Guadalajara) en los dos grupos de estudio, así como la correspondencia de las proporciones genotípicas con las de la ley de HW en la población de referencia, hacen de ésta una población confiable como control para cada uno de los polimorfismos estudiados. En relación con las complicaciones del embarazo que implican un acortamiento del tiempo de gestación y los genes trombofílicos, puede comentarse lo siguiente:

Los alelos A de los polimorfismos FII G20210A y FV G1691A se han visto incrementados en pacientes con pérdidas gestacionales del tercer trimestre del embarazo, por lo que son considerados factores de riesgo para la pérdida fetal recurrente,<sup>12,31</sup> aunque existen publicaciones que no confirman esta asociación.<sup>32</sup>

Diferentes estudios parecen involucrar el metabolismo del ácido fólico (AF) con el AH, pues se ha observado hiperhomocisteinemia en estos pacientes.<sup>33-34</sup> Este hallazgo puede ser secundario tanto a la ingesta insuficiente de ácido fólico (AF)<sup>35</sup> como a variantes genéticas de las enzimas que participan su metabolismo. En este aspecto, es notoria la participación del polimorfismo MTHFR C677T. Con base en la observación de un incremento del alelo T de este polimorfismo en el aborto espontáneo recurrente, se ha propuesto a éste como un factor en la etiología de los abortos recurrentes de origen desconocido.<sup>36-37</sup> Por otro lado, hay informes en que la asociación entre el polimorfismo C677T y la pérdida del embarazo<sup>38</sup> o con abortos recurrentes, no puede establecerse.<sup>31</sup>

El gen ECA y sus variantes I/D son consideradas dentro del espectro de los genes trombofílicos,<sup>15</sup> por lo que han sido estudiadas tanto en pérdidas tempranas,<sup>5,20</sup> como en complicaciones tardías<sup>15</sup> del embarazo.

Finalmente, se ha observado un incremento del alelo A (TNF-308A) en pacientes con abortos recurrentes.<sup>39</sup> Existen, sin embargo, resultados discordantes, ya que se han publicado diferencias no significativas en este polimorfismo en mujeres con pérdida recurrente del embarazo<sup>40</sup> o con parto pretérmino.<sup>15</sup>

En el presente trabajo no se observaron diferencias estadísticamente significativas en todas las comparaciones intergrupales para FII G20210A, FV G1691A, MTHFR C677T, ECA y TNF. En consecuencia, los resultados de los polimorfismos analizados no demuestran un factor trombofílico gené-

tico predisponente para el AH en la población estudiada. La falta de asociación observada en este trabajo deberá confirmarse con nuevos estudios y un tamaño de muestra mayor. Se consideran también convenientes otras investigaciones con el objeto de evaluar los factores trombofílicos ambientales en el AH.

## Agradecimientos

Este estudio fue financiado por el Sistema de Investigación José María Morelos (SIMORELOS), a quien se le agradece por su apoyo económico brindado para la realización del mismo. A su vez también se agradece la beca otorgada por CONACYT durante el programa de estudios de Doctorado en Genética Humana para Antonio Quintero Ramos.

## Referencias

1. Gori JR, Loruso A, Castana R, Lema BE, Lorusso CA, Alvarez S. Ginecología de Gori, 2<sup>a</sup> Edición. Editorial el Ateneo, Buenos Aires, Argentina, 2001. p. 243.
2. Gherman RB, Goodwin TM. Obstetric implications of activated protein C resistance and factor V Leiden mutation. *Obstet Gynecol* 2000;55:117-122.
3. Sheiner E, Levy A, Katz M, Mazor M. Pregnancy outcome following recurrent spontaneous abortions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005; 118:61-65.
4. Bulletti C, Flamigni C, Giacomucci E. Reproductive failure due to spontaneous abortion and recurrent miscarriage. *Hum Reprod Update* 1996; 2:118-136.
5. Fatini C, Gensini F, Battaglini B, Prisco D, Cellai AP, Fedi S, et al. Angiotensin-converting enzyme DD genotype, angiotensin type 1 receptor CC genotype, and hyperhomocysteinemias increase first-trimester fetal-loss susceptibility. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2000;11:657-662.
6. Kupferminc MJ, Peri H, Zwang E, Yaron Y, Wolman I, Eldor A. High prevalence of the prothrombin gene mutation in women with intrauterine growth retardation, abruptio placentae and second trimester loss. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000;79:963-967.
7. Rai R, Regan L. Thrombophilia and adverse pregnancy outcome. *Semin Reprod Med* 2000;18:369-377.
8. Ariel I, Anteby E, Hamani Y, Redline RW. Placental pathology in fetal thrombophilia. *Hum Pathol* 2004;35:729-733.
9. Ahmed RP, Gupta PK, Kannan M, Choudhry VP, Saxena R. Factor V Leiden—the commonest molecular defect in arterial and venous thrombophilia in India. *Thromb Res*. 2003;110:19-21.
10. Kujovich JL. Thrombophilia and pregnancy complications. *Am J Obstet Gynecol* 2004;181:412-24.
11. Souza SS, Ferriani RA, Pontes AG, Zago MA, Franco RF. Factor V Leiden and factor II G20210A mutations in patients with recurrent abortion. *Hum Reprod* 1999;14:2448-450.
12. Brenner B. Thrombophilia and pregnancy loss. *Thromb Res* 2002;108:197-202.
13. Valdez LL, Quintero A, García E, Olivares N, Celis A, Rivas F Jr, Rivas F. Thrombophilic polymorphisms in preterm delivery. *Blood Cells Mol Dis* 2004;33:51-56.
14. Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T, Rosendaal FR, Drvenik RJ, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994;369:64-67.
15. Foka ZJ, Lambropoulos AF, Saravelos H, Karas GB, Karavida A, et al. Factor V leiden and prothrombin G20210A mutations, but not methylenetetrahydrofolate reductase C677T, are associated with recurrent miscarriages. *Hum Reprod* 2000;15:458-462.
16. Lauszus FF, Gron PL, Klebe JG. Association of polymorphism of methylene-tetrahydro-folate-reductase with urinary albumin excretion rate in type 1 diabetes mellitus but not with preeclampsia, retinopathy, and preterm delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001;80:803-806.
17. Alfrevic Z, Roberts D, Martlew V. How strong is the association between maternal thrombophilia and adverse pregnancy outcome? A systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002;10:6-14.
18. Poisner AM. The human placental renin- angiotensin system, *Front Neuroendocrinol* 1998;19:232-252.
19. Morgan L, Foster F, Hayman R, Crawshaw S, Baker PN, Broughton Pipkin F, et al. Angiotensin-converting enzyme insertion-deletion polymorphism in normotensive and pre-eclamptic pregnancies. *J Hypertens* 1999;17:765-768.

20. **Buchholz T, Lohse P, Rogenhofer N, Kosian E, Pihusch R, Thaler CJ.** Polymorphisms in the ACE and PAI-1 genes are associated with recurrent spontaneous miscarriages. *Hum Reprod* 2003;18:2473–2477.
21. **Hefler LA, Tempfer CB, Bashford MT, Unfried G, Zeillinger R, et al.** Polymorphisms of the angiotensinogen gene, the endothelial nitric oxide synthase gene, and the interleukin-1beta gene promoter in women with idiopathic recurrent miscarriage. *Mol Hum Reprod* 2002;8:95–100.
22. **Wilson AG, Di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW.** Single base polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by Ncol restriction of PCR product. *Hum Mol Genet* 1992;1:353.
23. **Daher S, Shulzhenko N, Morgan A, Mattar R, Rampim GF, Camano L, et al.** Associations between cytokine gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss. *J Reprod Immunol* 2003;58:69–77.
24. **Pietrowski D, Bettendorf H, Keck C, Burkle B, Unfried G, Riener EK, et al.** Lack of association of TNF alpha gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss in Caucasian women. *J Reprod Immunol* 2004;61:51–58.
25. **Tranquilli AL, Giannubilo SR, Dell'Uomo B, Grandone E.** Adverse pregnancy outcomes are associated with multiple maternal thrombophilic factors. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;117:144–147.
26. **Miller SA, Dykes DD, Polesky HF.** A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1998;16:1215.
27. **Rosendaal FR, Doggen CJM, Zivelin A, Arrunda VR, Aiach M, Siscovick DS, et al.** Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost* 1998;79:706–708.
28. **Goyette P, Frosst P, Rosenblat D, Rozen R.** Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Am J Hum Genet* 1995; 56:1052–1059.
29. **Gutierrez C, Vendrell J, Pastor R, Llor C, Aguilar C, Broch M, Richart C.** Angiotensin I-converting enzyme and angiotensinogen gene polymorphisms in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Lack of relationship with diabetic nephropathy and retinopathy in a Caucasian Mediterranean population. *Metabolism* 1997;46:976–980.
30. **Dizon-Townson DS, Major H, Varner M, Ward K.** A promoter mutation that increases transcription of the tumor necrosis factor- $\alpha$  gene is not associated with preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:810–813.
31. **Pihusch R, Buchholz T, Lohse P, Rubsamen H, Rogenhofer N, Hasbargen U, et al.** Thrombophilic gene mutations and recurrent spontaneous abortion: prothrombin mutation increases the risk in the first trimester. *Am J Reprod Immunol* 2001;46:124–131.
32. **Hohlagschwandtner M, Unfried G, Heinze G, Huber JC, Nagele F, Tempfer C.** Combined thrombophilic polymorphisms in women with idiopathic recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 2003;79:1141–1148.
33. **Candito M, Magnaldo S, Bayle J, Dor JF, Gillet Y, Bongain A, et al.** Clinical B12 deficiency in one case of recurrent spontaneous pregnancy loss. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:1026–1027.
34. **Krabbenbäum I, Dekker GA.** Pregnancy outcome in patients with a history of recurrent spontaneous miscarriages and documented thrombophilias. *Gynecol Obstet Invest* 2004;57:127–31.
35. **Del Bianco A, Maruotti G, Fulgieri AM, Celeste T, Lombardi L, Amato NA, et al.** Recurrent spontaneous miscarriages and hyperhomocysteinemia. *Minerva Ginecol* 2004;56:379–383.
36. **Wang XP, Lin QD, Ma ZW, Zhao AM.** [C677T and A1298C mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in unexplained recurrent spontaneous abortion]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2004; 39:238–241.
37. **Li XM, Zhang YZ, Xu YX, Jiang S.** [Study on the relationship of MTHFR polymorphisms with unexplained recurrent spontaneous abortion]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2004;21:39–42.
38. **Makino A, Nakanishi T, Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Suzumori N, Suzumori K.** No association of C677T methylenetetrahydrofolate reductase and an endothelial nitric oxide synthase polymorphism with recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol* 2004;52:60–66.
39. **Hill JA, Choi BC.** Maternal immunological aspects of pregnancy success and failure. *J Reprod Fertil Suppl* 2000;55:91–97.
40. **Prigoshin N, Tambutti M, Larriba J, Gogorza S, Testa R.** Cytokine gene polymorphisms in recurrent pregnancy loss of unknown cause. *Am J Reprod Immunol* 2004;52:36–41.