

Frecuencia de marcadores genéticos para trombofilia en mujeres con fertilización *in vitro* fallida

Rolando Álvarez-Valero,* Gustavo Aguirre-Ramos,**
José Antonio Méndez-González,** Mauricio Velázquez-Magaña,**
Julio González-Cofrades,** Abraham Martínez-Ruiz,**
Paula Messina V,*** Carlos Navarro-Martínez**

RESUMEN

Cuando la fertilización *in vitro* falla, se inicia tardíamente el estudio etiopatológico. Los estados hipercoagulables interrumpen la implantación y desarrollo trofoblástico; por ello se deben analizar las mutaciones genéticas que predisponen a esta patología. **Objetivo:** Describir la frecuencia de marcadores genéticos para trombofilia en pacientes sometidas a fecundación *in vitro* fallida. **Material y métodos:** Se estudiaron 20 mujeres con fertilización *in vitro* no exitosa, con determinación de marcadores genéticos para trombofilia. Se utilizaron variables numéricas y categóricas, las cuales se resumieron como mediana e intervalos intercuantiles, representados en frecuencias y porcentajes. **Resultados:** La media de edad fue de 34 años (rango: 32-37), con dos fecundaciones *in vitro* (rango: 1-4) fallidas. El 95% tuvo marcadores positivos, 85% presentaron dos o más mutaciones. La mutación más frecuente fue hiperhomocisteinemia en 90%, seguida de PAI-1 en 80%. Las mutaciones fueron heterocigotas en 70% y homocigotas en 30%. **Conclusiones:** La correlación reportada entre marcadores genéticos para trombofilia y fertilización *in vitro* fallida es de 20-68%. Nuestros resultados muestran que la frecuencia y tipo de mutación difiere a la publicada para otras poblaciones. La relación causal, e implicaciones secundarias, es suficiente para sugerir la necesidad de realizar más estudios, para establecer medidas diagnósticas y terapéuticas tempranas.

Palabras clave: Reproducción asistida, fecundación *in vitro*, trombofilia.

ABSTRACT

When *in vitro* fertilization (IVF) fails, etiopathologic study is delayed. Genetic mutations, which predispose to thrombophilia, must be determined as these may interrupt implantation and trophoblastic development. **Objective:** To describe the incidence of genetic markers for thrombophilia in patients in whom IVF has failed. **Material and methods:** Genetic markers for thrombophilia were determined in twenty women in whom IVF was unsuccessful. Numerical and categorical variables were determined and summarized as median and interquartile range, represented in frequencies and percentages. **Results:** The mean age was 34 (32-37) years, with 2 (1-4) failed IVF cycles. Positive markers were reported in 95%, with 85% carrying two or more mutations. The most frequent mutation was hyperhomocysteinemia, present in 90%, followed by PAI 1 in 80%. The mutations were heterozygous in 70% and homozygous in 30%. **Conclusions:** The reported correlation between genetic markers for thrombophilia and failed IVF is of 20-68%. Our results show that the frequency and type of mutation differs from what has been previously published for other study groups. The causal relationship and secondary implications are enough to suggest the need for more studies, diagnostic measures and early therapeutic options.

Key words: Assisted reproduction, *in vitro* fertilization and thrombophilia.

INTRODUCCIÓN

Fecundación *in vitro* es una de las técnicas más complejas en medicina de la reproducción, que requiere de una infraestructura específica y costosa; además, un manejo multidisciplinario y es reservada al final de la escala de técnicas reproductivas ofrecidas a la pareja.

En promedio, una tercera parte de las parejas (35%) que son sometidas a fertilización *in vitro*

* The Center for Reproductive Medicine and Infertility. Weill Cornell Medical College. NY, NY.

** Ginecología y Obstetricia. Centro Médico ABC. México.

*** Ginecología y Reproducción Humana. México.

Recibido para publicación: 20/03/07. Aceptado: 04/04/07.

Correspondencia: Dr. Rolando Álvarez-Valero

Av. Copilco 162-22-1002. Col. Copilco Universidad 04360 México, D.F.,
Tel: 5652-2274. Fax: 5652-2273. E-mail: ravobgyn.md@gmail.com

(FIV) logran embarazo. En las parejas restantes sucede una alteración durante la implantación o en las fases posteriores del embarazo, que les impedirán ciclos de FIV finalmente exitosos.¹

Recientemente múltiples casos de FIV fallidos han sido asociados con presencia de trombofilias heredadas y adquiridas. Entre las heredadas, las más estudiadas son: mutación del factor V Leiden, mutación de metilentetrahidrofolato reductasa, mutación del gen de protrombina, deficiencia de antitrombina III, polimorfismo del antígeno plaquetario humano I, mutación de apolipoproteína B, deficiencia de proteína C y S. Entre los factores adquiridos encontramos al síndrome antifosfolípidos, lupus eritematoso sistémico y otras enfermedades autoinmunes.²⁻⁷

Existe evidencia para justificar el estudio y tratamiento de las pacientes con sospecha de estos fenómenos, como a continuación se menciona:⁸⁻¹⁴

—Histológicamente, el análisis de la arquitectura intervellosa y los vasos placentarios muestra aumento en los depósitos de fibrina, trombosis y cambios trofoblásticos-endoteliales asociados con hipoxia (*Figuras 1 y 2*).

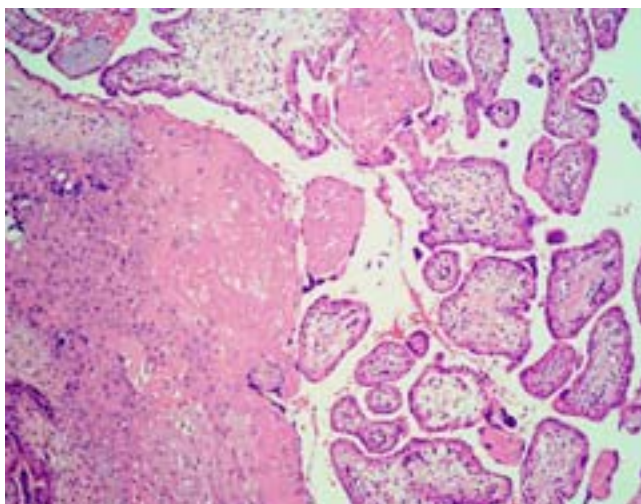


Figura 1. Corte histológico en donde se muestran vellosidades coriales en la mitad derecha y áreas de decidua con necrosis en la mitad izquierda. Paciente del grupo en estudio con historia de pérdida gestacional recurrente, embarazos con evolución adversa y marcadores para trombofilia positivos. Fotografía por cortesía del Dr. Carlos Ortiz Hidalgo. Departamento de Patología Quirúrgica. Centro Médico ABC. México.

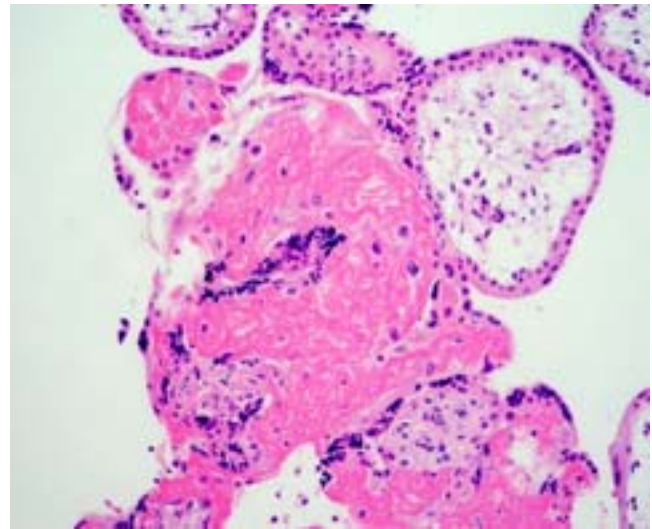


Figura 2. Corte histológico en el que se observan vellosidades coriales con depósito de abundante material fibrinoide. Paciente del grupo en estudio con historia de pérdida gestacional recurrente, embarazos con evolución adversa y marcadores para trombofilia positivos.

Fotografía por cortesía del Dr. Carlos Ortiz Hidalgo.

- Citotoxicidad local celular e inadecuada nutrición y oxigenación del microambiente embrionario, antes de la implantación.
- Estudios prospectivos han demostrado incremento en la prevalencia de trombofilias heredadas en pacientes con pérdida recurrente del embarazo.
- El inicio de tratamiento tromboprolifáctico temprano se relaciona con tasas más altas de recién nacidos vivos.
- Estudios retrospectivos sugieren incremento en el riesgo de presentar restricción del crecimiento intrauterino, oligohidramnios severo y preeclampsia asociados con trombofilias heredadas y adquiridas (*Figuras 3 y 4*); finalizando con la interrupción del embarazo cuando la evaluación fetal así lo indica (*Figuras 5 y 6*), en ocasiones, en etapas muy tempranas del embarazo.
- Estudios longitudinales relacionan anomalías hemostáticas semanas antes de la pérdida temprana del embarazo.
- La relación de mujeres con estados protrombóticos conocidos y mayor incidencia de falla reproductiva.

Una de las pruebas diagnósticas que se deben realizar sin retraso es la presencia de marcadores genéticos para estados hipercoagulables secundarios a trombofilias heredadas y adquiridas. En las pacientes con pérdida recurrente del embarazo se detectan con una frecuencia de hasta 12% por arriba de los casos controles.¹⁵⁻¹⁹

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio descriptivo y observacional, de corte transversal. Se tomó como universo y muestra del estudio a todas las pacientes con infertilidad de la Clínica Ginecología y Reproducción Humana del Centro Médico ABC, sometidas a fertilización *in vitro* (FIV), con falla en el tratamiento y a las cuales se solicitó panel de marcadores genéticos para trombofilias.

Las variables analizadas incluyeron: edad materna, edad paterna, factor masculino y número de FIV; alteración de coagulograma, cariotipo materno, cariotipo paterno, factor inmunológico, factor endocrino, factor uterino, factor tubario, factor peritoneal y factor ovárico.

Mediante análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en sangre materna, se determinó la heterocigocidad u homocigocidad de los siguientes marcadores genéticos para trombofilia:

- Factor V Leiden.- G1691A, H1299R, Y1702C
- Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR).- C677T, A1298C
- Protrombina.- G20210A
- Factor XIII.- V34L
- B-Fibrinógeno.- 455G>A
- Gen PAI-1.- 4G/5G
- Antígeno plaquetario humano (HPAI-1).- a/b – L33P-

Para el análisis de los datos, se utilizaron variables numéricas y categóricas. Las variables numéricas se resumieron con mediana e intervalo intercuartilar [Md (25-75)] y las variables categóricas con frecuencias y porcentajes.

Dentro de los aspectos éticos, en todo momento se conservó la confidencialidad de los pacientes,



Figura 3. Calcificación placentaria prematura GII-III, en paciente con marcadores para trombofilia positivos. Estos hallazgos son raros antes de las 35 semanas de gestación.

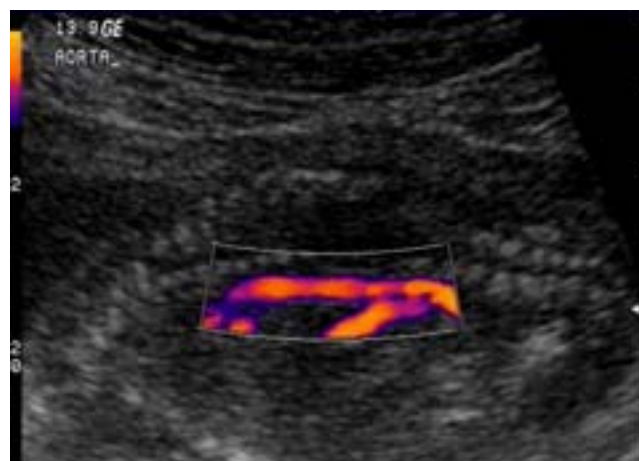


Figura 4. Oligohidramnios severo en paciente con marcadores para trombofilia positivos. Se observa conglomerado de partes fetales, sin evidencia de líquido amniótico cuantificable.

sin acceso a la identidad de los sujetos por parte del investigador.

RESULTADOS

Fueron incluidas 20 pacientes con diagnóstico de infertilidad que fueron sometidas a tratamiento con fertilización *in vitro* (FIV) fallido. La mediana de edad materna fue de 34 años (rango 32 a 37) y la paterna fue de 38 años (rango 36 a 43). La mediana para FIV realizadas fue de dos (ran-



Figura 5. Franca disminución en el espectro del flujo diastólico de arteria umbilical en feto con restricción del crecimiento intrauterino y madre en el grupo con marcadores de trombofilia positivos. Este hallazgo es sugestivo de interrupción inmediata del embarazo.

go de uno a cuatro). La muestra presentó alteraciones en los siguientes análisis: 40% ($n = 8$) en factor masculino, 10% ($n = 2$) en coagulograma, 20% ($n = 4$) en factor endocrino, 25% ($n = 5$) en factor inmunológico, 10% ($n = 2$) en factor uterino, 20% ($n = 4$) en factor tubario, 35% ($n = 7$) en factor peritoneal, 20% ($n = 4$) en factor ovárico y 30% ($n = 6$) de las pacientes presentaron más de un factor alterado.

El análisis de los marcadores genéticos para trombofilia mostraron que 95% ($n = 19$) presentaron mutaciones en algunos de los marcadores. De éstos, 25% ($n = 5$) fueron mutaciones para el factor V Leiden, 90% ($n = 18$) tuvieron mutaciones del MTHFR, ninguna (0%) presentó mutaciones del gen de protrombina, 40% ($n = 8$) positivo para factor XIII, 5% ($n = 1$) con mutación puntual para B-fibrinógeno, 80% ($n = 16$) con mutación para PAI-1, 20% ($n = 4$) positivo para HPA-1 y, de éstos, 85% ($n = 17$) presentó más de una mutación. En el factor V Leiden se detectan tres mutaciones; la mutación G1691A presente en 10% ($n = 2$) de forma heterocigota, la mutación H1299R (R2) en 10% ($n = 2$) de manera heterocigota y en 5% ($n = 1$) de forma homocigota; no hubo ninguna mutación en Y1702C. Los resultados del análisis de los marcadores restantes se presentan en el *cuadro I*.

DISCUSIÓN

En este estudio, el 95% de las pacientes presentaron trombofilias heredadas asociadas con FIV fallidas. Si bien la definición del Colegio Americano de Reproducción no considera FIV fallida sino hasta el tercer intento, en nuestro medio, debido a la limitación económica y de acceso a técnicas reproductivas de esta naturaleza, no es posible esperar hasta el tercer ciclo fallido.^{1,6} Qublan menciona incidencia de 68% en una serie mucho mayor; a diferencia de Carp quien reporta sólo 20.3%, lo cual indica que teniendo correctamente elegidas a las pacientes que son candidatas a este análisis, la prevalencia será mucho mayor. Es necesario descartar todas las causas probables de falla en la FIV y estudiar correctamente todos los antecedentes médicos y ginecoobstétricos que hacen sospechar la posibilidad que tiene la paciente de ser portadora de una trombofilia heredada subclínica y que se manifiesta en el embarazo.^{15,20,21} En nuestro estudio, la edad materna no fue limitante ni influencia directa de falla en la FIV, ya que la media de edad fue 34 años. Es importante considerar que 40% de la muestra presentó alteraciones en el factor masculino y aproximadamente 20% de la población en estudio tuvo alteraciones asociadas. Si bien otros autores como Martinelli no han separado estas va-

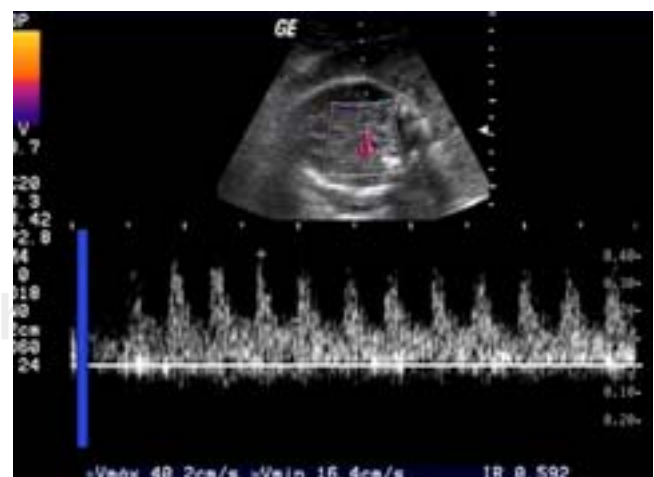


Figura 6. Flujo espectral a nivel de arteria cerebral media con flujo diastólico anormal. Hallazgo sugestivo de redistribución vascular secundario a hipoxia fetal en el mismo caso de la imagen anterior.

Cuadro I. Marcadores genéticos para trombofilia.

Tipo de trombofilia Mutación	Factor V Leiden			MTHFR		F-II	F-XIII	B-Fib	PAI-I	HPA-1
	G1691A	H1299R	Y1702C	C677T	A1298C	G20210A	V34L	455G>A	4G/5G	a/b (L33P)
Homocigoto	0	5%	0	30%	0	0%	0%	0%	15%	0%
Heterocigoto	10%	10%	0	45%	50%	0%	40%	5%	65%	20%

Porcentajes de mutaciones respecto a cigosidad y trombofilia estudiada.

riables de las trombofilias, es conveniente, como lo hizo Qublan con una muestra mayor en una serie de casos y controles, la separación de factores adjuntos que puedan alterar el poder estadístico de los resultados.⁹ Tampoco fue posible describir la calidad embrionaria al momento de la transferencia, ni la cantidad de embriones transferidos por cada ciclo, datos extremadamente importantes para obtener conclusiones más objetivas.

Por el momento no existe consenso acerca del tipo de trombofilia heredada que más se relaciona con pérdida recurrente del embarazo y FIV fallida en nuestro medio.^{17,19} Se ha descrito la relación poligénica como la teoría más aceptada; en nuestro estudio la trombofilia más frecuente fue la relacionada con la mutación del gen de MTHFR, lo cual se observó en 90% de la población, seguida por alteración de PAI-1 en 80%. La presencia de más de una mutación apoya la teoría poligénica con 85% de nuestra población en estudio. De esta forma, las alteraciones heterocigotas tienen mayor posibilidad de tener efecto clínico real, siendo en nuestro grupo de pacientes 70% contra 30% de expresión homocigota. Diferimos de la población Europea en el factor V Leiden, en donde describen a esta mutación como la más frecuente. En otras series mayores se ha señalado que la homocisteína no se puede relacionar con FIV fallidas, como lo describe Ray; es necesario que en nuestra población se realicen mayores estudios debido a la frecuencia con la que se presentó en esta serie.^{22,23}

En la relación descrita por Dey respecto a la expresión trofoblástica de anexina V, influye directamente sobre la implantación con los mecanismos mencionados, ya que los infartos placentarios suceden en etapas posteriores.²⁴⁻²⁶

El estudio, por la frecuencia con la que se presentan trombofilias, justifica iniciar tratamiento médico en forma temprana.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que las pacientes de este estudio tienen dos o más trombofilias asociadas, lo cual apoya la teoría poligénica. Coulam reporta que las pacientes con dos o más trombofilias tienen prevalencia de 73% de FIV fallida, en comparación con el 20% observado en sus casos control.^{11,12}

En resumen, los resultados nos demuestran que las trombofilias heredadas juegan un papel trascendental en los casos de FIV fallida. Las mujeres con FIV fallida o con antecedentes obstétricos adversos deben someterse a pruebas con marcadores genéticos para trombofilias antes de que se les ofrezcan, en primera instancia, técnicas reproductivas complejas.

Nuevos y mayores estudios deben ser diseñados para determinar con precisión la participación de cada mutación cuando falla la FIV, y para establecer las medidas terapéuticas precisas.

RECONOCIMIENTOS

Un especial agradecimiento a todo el personal de la Clínica Ginecología y Reproducción Humana, por sus atenciones durante la realización de esta investigación. De la misma forma, a los médicos adscritos y residentes del Departamento de Patología Quirúrgica del Centro Médico ABC por el compromiso y apoyo brindado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Carranza-Lira S. Fundamentos de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva. MDM; 2003.
2. Geva E, Amit A, Lerner-Geva L, Azem F, Yovel I, Lessing JB. Autoimmune disorders: Another possible cause for *in-vitro* fertilization and embryo transfer failure. Hum Reprod 1995; 10: 2560–2563.

3. Gopel W, Ludwig M, Junge AK, Kohlmann T, Diedrich K and Moller J. Selection pressure for the factor-V-Leiden mutation and embryo implantation. *Lancet* 2001; 358: 1238-1239.
4. Grandone E, Colaizzo D, Lo Bue A, Checola MC, Cittadini E, Margaglione M. Inherited thrombophilia and *in-vitro* fertilization implantation failure. *Fertil Steril* 2001; 76: 201-202.
5. Kaider BD, Price DE, Roussev RG, Coulam CB. Antiphospholipid antibody prevalence in patients with IVF failure. *Am J Reprod Immunol* 1996; 35: 388-393.
6. Edwards G, Brody S. Principles and Practice of Assisted Human Reproduction. Philadelphia, PA: WB Saunders; 1995.
7. Blumenfeld Z, Brenner B. Thrombophilia-associated pregnancy wastage. *Fertil Steril* 1999; 72: 765-774.
8. Lockwood CJ, Rand JH. The immunobiology and obstetrical consequences of antiphospholipid antibodies. *Obstet Gynecol Surv* 1994; 49: 432-441.
9. Martinelli I, Taioli E, Ragni G, Levi-Setti P, Passamonti SM, Battaglioli T, Lodigiani C, Mannucci PM. Embryo implantation after assisted reproductive procedures and maternal thrombophilia. *Haematologica* 2003; 88: 789-793.
10. Azem F, Many A, Yovel I, Amit A, Lessing JB, Kupferminc MJ. Increased rates of thrombophilia in women with repeated IVF failure. *Hum Reprod* 2004; 19: 368-370.
11. Coulam CB, Kaider BD, Kaider AS, Janowicz P, Roussev RG. Antiphospholipid antibodies associated with implantation failure after IVF/ET. *J Assist Reprod Genet* 1997; 14: 603-608.
12. Coulam CB, Jeyendran RS, Fishel LA, Roussev R. Multiple thrombophilic gene mutations are risk factors for implantation failure. *Reprod Biomed Online* 2006; 12: 322-327.
13. Matsubayashi H, Arai T, Izumi S, Sugi T, McIntyre JA, Path FRC, Makino T. Anti-annexin V antibodies in patients with early pregnancy loss or implantation failures. *Fertil Steril* 2001; 76: 694-699.
14. Nelen WLD, Bulten J, Steegers EAP, Blom HJ, Hanselaar AGJ, Eskes TKAB. Maternal homocystine and chorionic vascularization in recurrent early pregnancy loss. *Hum Reprod* 2000; 15: 953-960.
15. Qublan HS, Malkawi HY, Tahat YA, Areidah S, Nusair B, Khreisat BM, Al-Quraan G, Abu-Assaf A, Hadaddein MF, Abu-Jassar H. *In-vitro* fertilization treatment: Factors affecting its results and outcome. *J Obstet Gynaecol* 2005; 25: 689-693.
16. Raziel A, Kornberg Y, Friedler S, Schachter M, Sela BA, Ron-El R. Hypercoagulable thrombophilic defects and hyperhomocystinemia in patients with recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol* 2001; 45: 65-71.
17. Rey E, Kahn SR, David M, Shrier I. Thrombophilic disorders and fetal loss: A meta-analysis. *Lancet* 2003; 361: 901-908.
18. Sanson BJ, Friederich PW, Simioni P, Zanardi S, Hilsman MV, Girolami A, ten Cate JW, Prins MH. The risk of abortion and stillbirth in antithrombin-, protein C-, and protein S-deficient women. *Thromb Haemost* 1996; 75: 387-388.
19. Alonso A, Soto I, Urgelles MF, Corte JR, Rodriguez MJ, Pinto CR. Acquired and inherited thrombophilia in women with unexplained fetal losses. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187: 1337-1342.
20. Glueck CJ, Awadalla SG, Phillips H, Cameron D, Wang P, Fontaine RN. Polycystic ovary syndrome, infertility, familial thrombophilia, familial hypofibrinolysis, recurrent loss of *in vitro* fertilized embryos, and miscarriage. *Fertil Steril* 2000; 74: 39-397.
21. Yen JB. Reproductive Endocrinology. Philadelphia, PA: WB Saunders; 2001.
22. Nelen WL, Blom HJ, Steegers EA, den Heijer M, Eskes TK. Hyperhomocysteinemia and recurrent early pregnancy loss: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2000; 74: 1196-1199.
23. Rey E, Kahn SR, David M, Shrier I. Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *Lancet* 2003; 361: 901-908.
24. Dizon-Townson DS, Meline L, Nelson LM, Varner M, Ward K. Fetal carriers of the factor V Leiden mutation are prone to miscarriage and placental infarction. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177: 402-425.
25. Kupferminc MJ, Eldor A, Steinman N, Many A, Bar-Am A, Jaffa A, Fait G, Lessing JB. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med* 1999; 340: 1584-1589.
26. Sarig G, Younis JS, Hoffman R, Lanir N, Blumenfeld Z, Brenner B. Thrombophilia is common in women with idiopathic pregnancy loss and is associated with late pregnancy wastage. *Fertil Steril* 2002; 77: 342-347.