

# Detecția mutațiilor trombofilice în boala abortivă recurentă

*Detection of the thrombophilic mutations in recurrent pregnancy loss*

A. Oncescu<sup>1</sup>,  
I.D. Suci<sup>1,2</sup>,  
C. Dragomir<sup>3</sup>,  
A. Voichițoiu<sup>1,2</sup>,  
A.M. Moraru<sup>2</sup>,  
B. Marinescu<sup>2,4</sup>

1. IOMC „Alfred Rusescu”,  
Spitalul Clinic „Polizu”  
București  
2. UMF „Carol Davila”  
București  
3. „Genetic Lab” București  
4. Spitalul Clinic  
de Obstetrică-Ginecologie  
„Prof. Dr. Panait Sărbu”  
București

Correspondență:  
Dr. Andrei Oncescu  
e-mail: andreioncescu@  
yahoo.com

## Abstract

Almost 5% of women of fertile age can be affected by recurrent pregnancy and almost half of the cases are of unknown etiology. The Prothrombin G20210A gene polymorphism, Factor V Leiden mutation G1691A, MTHFR A1298C and C677T mutations, Fibrinogen G455A mutation, PAI-4G/5G are the most frequent thrombophilic mutations investigated. Determining their association is of really good interest because of the possible treatments which can increase the odds to have a live birth.

The association with recurrent pregnancy loss is still controversial for many authors. We tested a group of 231 patients with recurrent pregnancy and 100 patients in a control group. The incidence of thrombophilic mutations was increased in the study group over the controls. The investigations for thrombophilia could be routinely introduced in the patients with recurrent pregnancy loss.

**Keywords:** thrombophilia, recurrent pregnancy loss, pregnancy

## Rezumat

Până la 5% din femeile în perioada fertilă pot fi afectate de avorturile recurente, iar în aproape jumătate din cazuri etiologia acesteia este necunoscută. Polimorfismul genei protrombinei G20210A, Factorul V Leiden mutația G1691A, MTHFR mutația A1298C, MTHFR mutația C677T, fibrinogen mutația G455A, PAI-1 polimorfismul 4G/5G sunt cele mai frecvente mutații trombofilice investigate în cazul asocierii acestora cu boala abortivă recurentă. Determinarea asocierii acestora este de un real interes datorită potențialelor tratamente care pot îmbunătăți șansele de a duce la bun sfârșit o sarcină. Cu toate acestea, asocierea între avorturile recurente și trombofilie este încă controversată pentru mulți autori. S-a testat un grup de 231 de paciente cu avorturi recurente și 100 în grupul de control. Incidența mutațiilor a fost semnificativ crescută în grupul investigat față de grupul de control. Investigațiile pentru trombofilie ar putea fi introduse de rutină în cazul pacientelor cu avorturi recurente.

**Cuvinte-cheie:** trombofilie, boală abortivă, sarcină

## Introducere

Statusul protrombotic a fost întotdeauna asociat cu fiziopatologia multor posibile complicații obstetricale ce au ca origine afectarea placentară (preeclampsia, insuficiența de creștere intrauterină, dezlipirea de placenta normal inserată și moartea fetală *in utero*). În conformitate cu Societatea Europeană de Reproducere Umană și Embriologie (ESHRE), boala abortivă recurentă este reprezentată de pierderea recurentă consecutivă a cel puțin trei sarcini la mai puțin de 20 de săptămâni de gestație. Aceasta poate reprezenta până la 2% din totalul pierderilor de sarcină<sup>(1,2)</sup>.

Cu toate acestea, există păreri care susțin că existența a două sau mai multe avorturi nu neapărat consecutive pot fi asociate cu boala abortivă<sup>(3)</sup>. Pierderea unei sarcini indiferent de vârsta gestațională la care se produce este un eveniment nefericic care afectează viața cuplului și determină apariția unui stres extraordinar în momentul unei viitoare sarcini.

Cu ajutorul investigațiilor paraclinice de prim nivel (ecografie, histerosalpingografie, histeroscopie, laparoscopie) se încearcă identificarea pacientelor cu modificări anatomice și de funcționalitate ale aparatului genital. Folosindu-se aceste metode, putem determina până la 15% din cauzele pierderilor de sarcină, încercându-se astfel identificarea unui tratament precis și

tintit pentru rezolvarea cauzei<sup>(4)</sup>. Un alt aspect important îl reprezintă anomaliile cromozomiale care pot fi incriminate în apariția avorturilor de prim trimestru<sup>(5)</sup>. Folosindu-ne de noile achiziții dobândite în cadrul biologiei moleculare, procentul de pierderi de sarcină inexplicabile s-a redus la 2-5%, putându-se diagnostica mutații trombofilice în 15-18% din cazuri<sup>(6)</sup>.

În ultimii ani, detecția mutațiilor trombofilice a câștigat unul dintre locurile fruntașe printre factorii de risc răspunzători de pierderile recurente de sarcină. În literatura de specialitate există lucrări care sugerează o strânsă interrelație între trombofiliile ereditare și pierderile recurente de sarcină. Cu toate acestea, în contrapartidă există cercetători care nu susțin o causalitate între ele<sup>(7)</sup>.

Trombofiliile sunt consecințele mutațiilor polimorfice la nivelul genelor care codifică factorii de coagulare și care astfel predispon la apariția unui status procoagulant la nivelul circulației utero-placentare. Tromboza la nivelul vaselor deciduale poate duce la complicații majore precum insuficiența de creștere intrauterină, preeclampsie, *abruptio placentae*, moarte fetală și implicit boala abortivă recurentă<sup>(8)</sup>.

Există două tipuri de trombofilii: dobândite și ereditare. Primul tip face referință la sindromul antifosfolipidic, care este cel mai răspândit tip de trombofilie

dobândită, cu importanță majoră dovedită în apariția pierderilor de sarcină.

Trombofiliile ereditare sunt definite, conform Societății de Tromboză și Hemostază, ca o tendință genetică pentru evenimente trombotice care sunt evidențiate clinic încă de la vârsta reproductivă, cu recidive frecvente, fără cauză aparentă. Transmiterea caracteristicilor trombofiliilor nu respectă regulile mendeliene și există posibilitatea ca o pacientă să aibă o mutație homozigotă pentru un factor de coagulare, fapt ce îi asigură un risc mult sporit pentru apariția complicațiilor. De asemenea, decelarea mai multor mutații în cazul aceleiași paciente crește semnificativ riscul pentru inițierea unui episod trombotic pe parcursul sarcinii<sup>(9)</sup>.

Într-o metaanaliză, Rey a arătat o creștere a riscului de pierdere a sarcinii de două ori pentru perioada gestațională mai mică de 13 săptămâni și de 7,8 ori pentru perioada săptămânilor 13-19 pentru pacientele purtătoare de mutație a factorului V Leiden. Riscul era crescut de 2,6 ori pentru pacientele cu mutația factorului II și de 3,5 ori pentru pacientele cu deficit de proteina C<sup>(10)</sup>.

Cele mai cunoscute trombofilii ereditare sunt reprezentate de: factor V Leiden mutația G1691A, MTHFR mutația A1298C; MTHFR mutația C677T; fibrinogen mutația G455A; factor II (protrombina) mutația G20210A; PAI-1 polimorfismul 4G/5G. Acestea au fost investigate în grupul de studiu pentru a se observa prevalența acestora în cadrul unei populații cu avorturi recurente.

## Material și metodă

În țara noastră nu au fost prezentate studii cu privire la prevalența trombofiliei în populație și implicit în incidența asocierii acesteia cu boala abortivă recurentă. Studiul a fost efectuat prin intermediul laboratorului de genetică Genetic Lab, unde au fost testate 231 de paciente cu avorturi recurente și 100 în lotul de control în perioada august 2012 - ianuarie 2014.

Am considerat de bun augur să căutăm prevalența mutațiilor trombofilice la pacientele cu cel puțin două sarcini pierdute care nu au dus nici o sarcină la termen, cu mențiunea că unele dintre ele au avut și manifestări tromboembolice separate. Acestea au fost luate în considerare în analiza pacientelor și inventariate separat. Rezultatele au fost comparate cu un lot martor de 100 de paciente care au dus cel puțin o sarcină la termen și au avut maximum un avort în antecedente.

Mostrele de sânge s-au prelevat de la paciente care nu au primit medicație anticoagulantă și care să nu fi avut un eveniment obstetrical în ultimele două luni. Acest lucru a fost luat în considerare pentru a preveni modificările la nivelul valorilor proteinei C activate și a proteinelor implicate în coagulare.

## Pacienți

Pacienții au semnat un consimțământ informat prin care s-a asigurat păstrarea confidențialității, identității și a rezultatului obținut.

## Extracția ADN-ului

De la fiecare pacient s-au recoltat câte 2 ml sânge periferic prin venipunctură în vacutainere cu anticoagulant EDTA. ADN-ul a fost izolat din 200 μl sânge periferic utilizând QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN).

## Detecția mutațiilor genelor pentru factorul V (G1691A) și factorul II (G20210A) al coagulării prin Real-Time PCR

Probele ADN au fost analizate utilizând factor V Leiden Kit și respectiv factor II (Prothrombin) Kit conform instrucțiunilor producătorului (Roche). Detecția mutațiilor G1691A și G20210 s-a realizat prin Real Time PCR pe aparatul Light Cycler 480 II (Roche). Testul se bazează pe tehnologia FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) pentru amplificarea ADN, urmată de analiza curbei de topire pentru determinarea genotipurilor homozigot normal, homozigot mutant sau heterozigot. În timpul etapei de topire, temperatura crescută determină scăderea fluorescenței, deoarece cea mai scurtă dintre cele două sonde fluorescente disociază prima și fluoroforii nu mai sunt în imediata apropiere. În cazul prezenței mutațiilor G1691A sau G20210, nepotrivirea perfectă a sondei cu ADN țintă destabilizează catenele ADN și scăderea fluorescenței se va produce la o temperatură mai joasă. În cazul genotipului normal, potrivirea pe bază de complementaritate este perfectă și, prin urmare, heteroduplexul ADN are temperatura de topire mai mare. Genotipul heterozigot va prezenta două semnale fluorescente la ambele temperaturi de topire.

## Detecția mutațiilor genei MTHFR prin PCR-RFLP

Pentru detecția mutațiilor C677T și A1298C s-au folosit primerii citați în literatura de specialitate<sup>(11)</sup>. Pentru fiecare mutație s-a realizat o reacție PCR. Ambele reacții au avut loc în aceleași condiții. 500 ng ADN genomic a fost amplificat într-un volum de reacție de 25 μl cu 1,5 U Taq ADN polimerază (Promega, Madison, USA), 10 pmoli fiecare primer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP, în tampon 1X (10 mM Tris-HCl pH 9, 50 mM NaCl). În ambele reacții s-au folosit controale pozitive reprezentate de ADN mutant homozigot și ADN heterozigot pentru mutația C677T și respectiv A1298C. Ciclurile de amplificare PCR au constat în denaturarea ADN 1 minut la 95°C, hibridizarea primerilor 30 s la 63°C și elongarea primerilor 30 s la 72°C pentru 35 de cicluri, urmate de un pas final de extensie la 72°C, timp de 7 minute. Pentru amplificarea PCR s-a folosit GeneAmp PCR System 9700 thermal cycler<sup>(11)</sup>.

Mărimea produșilor de amplificare este de 228 pb pentru C677T și respectiv 128 pb pentru A1298C. Restricția ampliconilor rezultați în urma reacției PCR s-a realizat cu enzima *Hinf I* (Promega) pentru detecția polimorfismului C677T și cu enzima *Mbo II* (Promega) pentru detecția polimorfismului A1298C. După efectuarea reacției de restricție cu *Hinf I*, respectiv *Mbo II*, produșii de reacție au fost vizualizați în gel de agaroză 4%. Polimorfismul C677T

crează un situs de restricție pentru enzima Hinf I, astfel încât persoanele homozigote pentru această mutație (genotip TT) vor prezenta un fragment de restricție la 172pb. Persoanele homozigote normale (genotip CC) vor prezenta un singur fragment nerestricțat la 228 pb, iar persoanele heterozigote (genotip CT) vor prezenta ambele fragmente: 228pb și 172pb. Polimorfismul A1298C distruge un situs de restricție și creează un nou situs, astfel încât persoanele cu mutație homozigotă (genotip CC) vor prezenta un fragment de restricție de 100pb, iar persoanele homozigote normale (genotip AA) vor prezenta un fragment de restricție la 72pb. Persoanele heterozigote (genotip AC) vor prezenta ambele fragmente de restricție: 100pb și 72pb.

## Rezultate

Vârsta medie a lotului studiat cu boala abortivă recurentă a fost mai mică decât cea a lotului martor, 30 versus 34 de ani. Caracteristicile etnice au fost aceleași, neexistând discrepanțe între ele. Considerăm că vârsta la care a debutat menarha, stilul de viață (consumul de alcool, tutun) nu sunt relevante pentru o diferență semnificativă între cazurile clinice și cele din grupul de control (tabelul 1).

Au fost luate în considerare rezultatele a 191 de paciente care au avut cel puțin o mutație trombofilică din cele 231 de probe analizate (tabelul 2). Astfel, un procent covârșitor de 82% din probe a fost pozitiv pentru cel puțin o mutație. În lotul studiat, cea mai frecventă mutație genetică decelată a fost 4G/5G (inhibitorul activatorului de plasminogen) atât în forma heterozigotă, în proporție de 63,1%, cât și în forma homozigotă, 27,9%. Al doilea loc în incidență a fost ocupat de mutația C677T (polimorfismul enzimei metilen tetrahidrofolatreductazei) cu 133 de paciente pozitive (75,2% heterozigote și 24,8% homozigote). Un lucru interesant a fost prezența a două cazuri de mutație homozigotă pentru factorul II G20210A, mutație foarte rară, cu prognostic sever în avorturile recurente. 40 de paciente din grupul investigat nu au avut nici un fel de modificare trombofilică, în cazul lor fiind necesare analize suplimentare pentru a putea avea un indiciu privind cauza avorturilor recurente. Rezultatele grupului de control de 100 de paciente sunt prezentate în tabelul 3.

Suma tuturor alterațiilor genetice a fost 518, ceea ce înseamnă că există paciente cu multiple alterații simultane trombofilice, numărul maxim de alterații

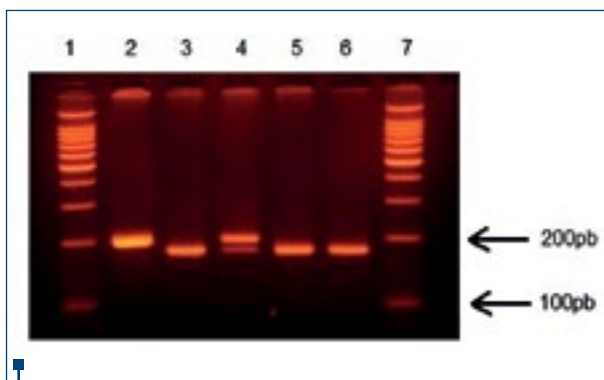


Figura 1. Detecția polimorfismului C677T (1,7- Marker 100pb, 2- ADN homozigot normal - genotip CC, 3 - ADN homozigot mutant - genotip TT, 4 - ADN heterozigot - genotip CT; 5,6 - probe ADN homozigot mutant - genotip TT)

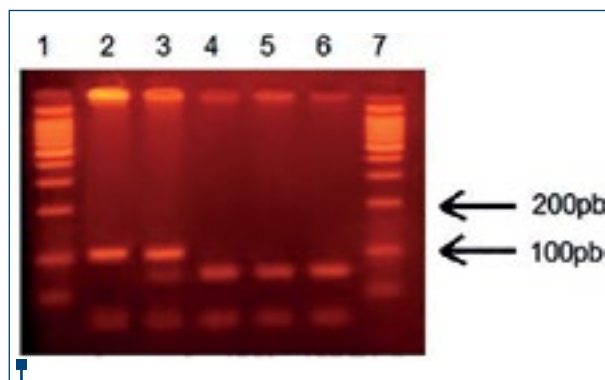


Figura 2. Detecția polimorfismului A1298C (1,7- Marker 100 pb, 2- ADN homozigot mutant - genotip CC, 3 - ADN heterozigot - genotip AC, 4, 5, 6 - ADN homozigot normal - genotip AA)

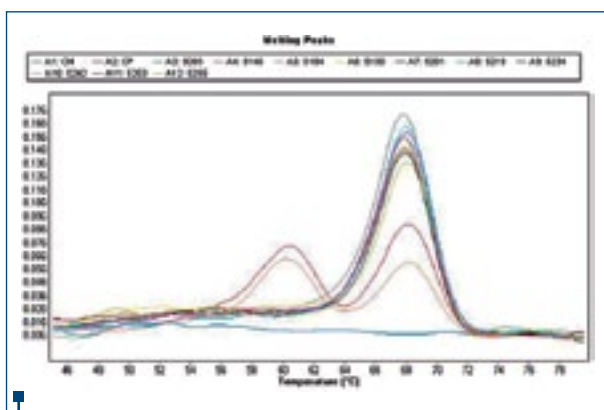


Figura 3. Detecția mutației G1691A (Factorul V Leiden): A1 - proba martor (proba fără ADN), A2 - control heterozigot pentru mutația G1691A, A3-A9, A11, A12 - ADN homozigot normal, A10 - ADN heterozigot

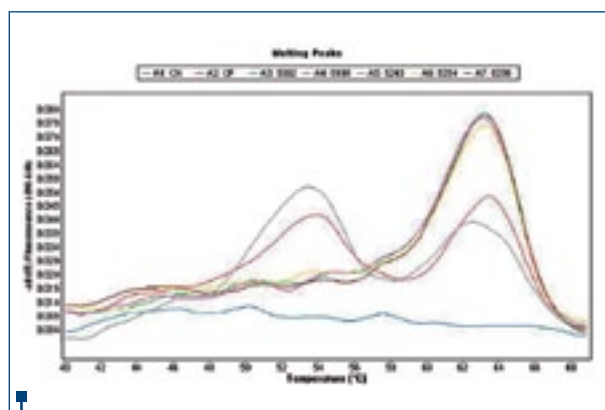


Figura 4. Detecția mutației G20210A(F II): A1 - proba martor (proba fără ADN), A2 - control heterozigot pentru mutația G20210A, A3,A4 - ADN homozigot normal, A5 - ADN heterozigot, A6, A7 - ADN homozigot normal

**Tabelul 1** Caracteristicile lotului de studiu/lot control

	Lot de studiu (231)	Lot de control (100)
<b>Vârsta medie +/- DS</b>	30 +/- 1,1	34 +/- 0,9
<b>Interval de vârstă</b>	25-37	29-42
<b>Număr de sarcini pierdute</b>	2,8 +/- 1,2	0,7 +/- 0,3
<b>Istoric medical de tromboză venoasă</b>	15%	3%

**Tabelul 2** Incidența mutațiilor trombofilice în cadrul grupului investigat

N=191	Factor V Leiden G1691A	MTHFR A1298C	MTHFR C677T	Fibrinogen G455A	Fact. II G20210 A	PAI 4G/5G
<b>Heterozigoți</b>	25	71	103	62	19	130
<b>Homoziigoți</b>	9	15	30	9	2	43
<b>Total</b>	34	86	133	71	21	173

**Tabelul 3** Incidența mutațiilor trombofilice în cadrul lotului martor

N=100 (control)	Factor V Leiden G1691A	MTHFR A1298C	MTHFR C677T	Fibrinogen G455A	Fact. II G20210 A	PAI 4G/5G
<b>Heterozigoți</b>	4	5	8	6	0	12
<b>Homoziigoți</b>	0	0	1	1	0	1
<b>Total</b>	4	5	9	7	0	13

în cazul unei paciente fiind de 4. Numărul multiplu de polimorfisme genetice diagnosticate în cazul unei paciente s-a dovedit a fi un risc mai mare pentru apariția complicațiilor în timpul sarcinii atât în primul trimestru de sarcină, cât și ulterior în cazul complicațiilor tardive, respectiv dezlipirea de placenta normal inserată, insuficiența de creștere intrauterină, preeclampsia și moartea fetală *in utero*<sup>(12,13)</sup>.

## Discuții

Am investigat frecvența a șase mutații ale factorilor de coagulare și incidența acestora în rândul pacientelor cu avorturi recurente. Limitele acestui studiu reprezintă numărul relativ redus de paciente în cele două grupuri.

Rezultatele decelate arată o prevalență crescută a polimorfismului factorilor de coagulare în grupul pacientelor cu boală abortivă recurentă. Acest lucru vine

să sublinieze încă o dată asocierea acestei patologii cu tromboza vaselor deciduale și implicit dificultatea implantării și asigurării nutriției embrionului. Cu toate acestea, și alte mecanisme pot fi invocate pentru prognosticul nefavorabil al pacientelor cu trombofilie, precum lezarea vaselor deciduale sau reducerea invaziei trofoblastului.

Mutația factorului V Leiden și MTHFR C677T au avut o frecvență semnificativ crescută în primul grup. Factorul V Leiden se regăsește într-un număr crescut în populația caucaziană din estul Europei<sup>(14)</sup>. Cu toate acestea, incidența lui este foarte scăzută în Asia, Africa și Australia<sup>(15)</sup>.

Putem observa faptul că în grupul de control nu au fost regăsite paciente cu mutații homozigote pentru factorul V Leiden versus 9 cazuri în grupul-țintă, de aici și ipoteza că prezența acestei mutații este strâns legată de un risc crescut pentru rezistența la proteina C activată. Cu toate acestea, prezența mutației factorului V poate avea și un efect pozitiv, conferind pacientelor un risc mai scăzut de apariție a sângerărilor postpartum, acestea având o oarecare protecție în cazul unui episod hemoragic ulterior nașterii<sup>(16)</sup>.

Asocierea cu cel mai puternic răsunet în boala abortivă recurentă a fost în 26 de cazuri care au fost pozitive pentru cel puțin 4 mutații trombofilice: factor V Leiden G1691A, MTHFR C677T, fibrinogen G455A și polimorfismul PAI 4G/5G, toate pacientele având minimum 3 sarcini pierdute.

Au fost depistate în grupul investigat două cazuri de mutație homozigotă a factorului II G20210A și nici unul în grupul de control. Alintas et al., într-un studiu efectuat pe 114 pacienți, au arătat că nu au găsit o semnificație statistică pentru avorturile de prim trimestru pentru mutația G20210A<sup>(7)</sup>. Cu toate acestea, trebuie menționat că în cazul nostru ambele paciente cu mutație homozigotă pentru factorul II aveau 3 avorturi recurente, una dintre ele fiind pozitivă de asemenea și pentru PAI 4G/5G forma homozigotă.

Un alt aspect relevat de studiu a fost vârsta gestațională medie la care s-a produs pierderea sarcinii, respectiv 9,2 săptămâni, putând trage concluzia că incidența bolii abortive a fost preponderentă în primul trimestru de sarcină. Comparativ, într-un studiu prezentat de Viser et al., vârsta medie a sarcinilor pierdute a fost de 12,3 săptămâni de gestație, la limita de trecere a perioadei primului trimestru de sarcină<sup>(17)</sup>. Apariția unei pierderi de sarcină în cazul pacientelor trombofilice este un eveniment nefericit și relativ sporadic. Cu toate acestea, însă, frecvența complicațiilor în cazul acestora (IUGR, moarte fetală *in utero*, dezlipirea de placenta normal inserată) este semnificativ crescută<sup>(18)</sup>. Este probabil necesar încă cel puțin un factor trigger care să acționeze sistemic sau local la nivel placentar pentru a determina apariția unui prognostic nefavorabil<sup>(18)</sup>.

Limitele studiului nostru s-au datorat numărului relativ redus de eşantioane analizate, acest aspect existând din cauza costurilor relativ ridicate ale procesării analizelor.

Totodată, suntem convingeți că există o bază mult mai largă de paciente cu boală abortivă recurentă care nu au cunoștințe despre noțiunile asociate trombofiliei și de aici nevoia de familiarizare atât a acestora, cât și a medicilor cu posibilitatea existenței mutațiilor și cu efectele pe care acestea le pot avea asupra vieții reproductive. În concluzie, noi am sugera testarea de rutină a pacientelor cu minimum două avorturi recurente pentru markerii de trombofilie pentru a putea decela precoce existența lor. Depistarea acestora poate oferi oportunitatea identificării femeilor cărora li s-ar putea aplica protocoale de tratament pentru a îmbunătăți rata de obținere și posibilitatea de a duce la bun sfârșit o sarcină. ■

**Mențiune:** Această lucrare este parțial sprijinită de către Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane POSDRU finanțat din Fondul Social European și de către Guvernul României prin contractul POSDRU 141531.

## Bibliografie

- Bennett SA, Bagot CN, Arya R. Pregnancy loss and thrombophilia: the elusive link. *Br J Haematol*. 2012;157(5):529-42.
- Farquharson RG, Jauniaux E, Exalto N. ESHRE Special Interest Group for Early Pregnancy (SIGEP). Updated and revised nomenclature for description of early pregnancy events. *Hum Reprod* 2005; 20(11):3008-11.
- Van den Boogaard E, Kaandorp SP, Franssen MT, et al. Consecutive or non-consecutive recurrent miscarriage: is there any difference in carrier status? *Hum Reprod* 2010;25(6): 1411-4.
- Salim R, Regan L, Woelfel B, Backos M, Jurkovic D. A comparative study of the morphology of congenital uterine anomalies in women with and without a history of recurrent first trimester miscarriage. *Hum Reprod* 2003;18(1):162- 6.
- Sierra S, Stephenson M. Genetics of recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med* 2006; 24(1):17-24.
- Rai R, Regan L. Recurrent miscarriage. *Lancet* 2006; 368(9535):601-11.
- Altintas A, Pasa S, Akdeniz N, Cil T, Yurt M, Ayyildiz O, Batun S, Isi H' Factor V Leiden and G20210. A prothrombin mutations in patients with recurrent pregnancy loss: data from the southeast of Turkey. *Ann Hematol*. 2007 Oct; 86(10):727-31.
- Davenport WB, Kutteh WH. Inherited thrombophilias and adverse pregnancy outcomes: a review of screening patterns and recommendations. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2014 Mar; 41(1):133-44.
- Coulam CB, Jeyendran RS, Fishel LA, Roussev R. Multiple thrombophilic gene mutations rather than specific gene mutations are risk factors for recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol* 2006; 55(5):360-8.
- Rey E, Kahn SR, David M, Shrier I. Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *Lancet* 2003; 361(9361):901-8.
- Blanco Munoz J, Lacasana M, Garcia Cavoos R, Borja-Aburto VH, Galaviz Hernandez C, Aguilar Garduno C. Metylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and the risk of anencephaly in Mexico. *Molec H Reprod* 2007; 13(6):419-24.
- Torabi R, Zarei S, Zeraati H, Zarnani AH, Akhondi MA, Hadavi R, et al. Combination of Thrombophilic Gene Polymorphisms as a Cause of Increased the Risk of Recurrent Pregnancy Loss. *J Reprod Infertil* 2012; 13(2):89-94.
- Coulam C B, Jeyendran R S, Fishel L A, Roussev R. Multiple Thrombophilic Gene Mutations Rather than Specific Gene Mutations are Risk Factors for Recurrent Miscarriage. *Am J Reprod Immunol* 2006;55: 360-8.
- Lucotte G, Mercier G. Population genetics of factor V Leiden in Europe. *Blood Cells Mol Dis* 2001; 27:362-7.
- Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. *Lancet* 1995; 346:1133-4.
- Lindqvist PG, Svensson PJ, Dahlbäck B, Marsál K. Factor V Q506 mutation (activated protein C resistance) associated with reduced intrapartum blood loss - a possible evolutionary selection mechanism. *Thromb Haemost* 1998;79:69-73.
- Visser J, Ulander VM, Helmerhorst FM, Lampinen K, Morin-Papunem L, Bloemenkamp KW, Kaaja RJ. Thromboprophylaxis for recurrent miscarriage in women with or without thrombophilia. HABENOX: a randomised multicentre trial. *Thromb Haemost*. 2011 Feb;105(2):295-301.
- Kist WJ, Janssen NG, Kalk JJ, Hague WM, Dekker GA, de Vries JL. Thrombophilias and adverse pregnancy outcome. A confounded problem!. *Thromb Haemost* 2008; 99(1):77-85.