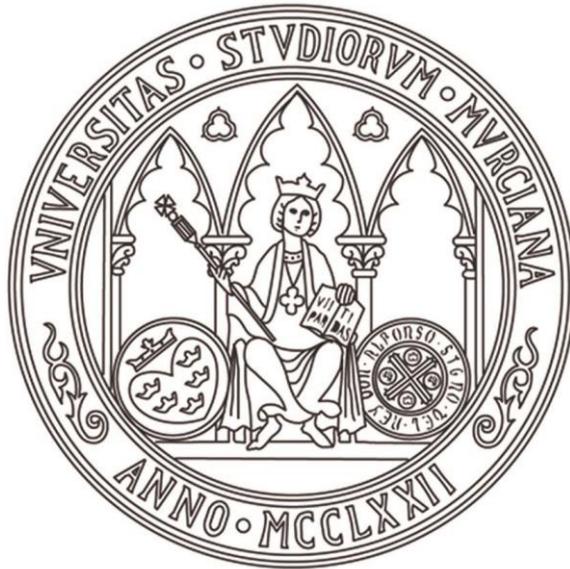




UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
TESIS DOCTORAL

Estudio del efecto del tratamiento con pravastatina sobre la función
endotelial vascular en mujeres con alto riesgo de preeclampsia
tardía.

D. Jean Michell Santoyo García
2023



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
TESIS DOCTORAL

Estudio del efecto del tratamiento con pravastatina sobre la función endotelial vascular en mujeres con alto riesgo de preeclampsia tardía.

Autor: D. Jean Michell Santoyo García

Director/es: D.^a Isabel Hernández García, y
D. José Antonio Noguera Velasco



**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD
DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022

D./Dña. Jean Michell Santoyo García

doctorando del Programa de Doctorado en

Integración y Modulación de Señales en Biomedicina

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Estudio del efecto del tratamiento con pravastatina sobre la función endotelial vascular en mujeres con alto riesgo de preeclampsia tardía.

y dirigida por,

D./Dña. Isabel Hernández García

D./Dña. José Antonio Noguera Velasco

D./Dña.

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Si la tesis hubiera sido autorizada como tesis por compendio de publicaciones o incluyese 1 o 2 publicaciones (como prevé el artículo 29.8 del reglamento), declarar que cuenta con:

- *La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- *En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 23 de Febrero de 2023

Fdo.: **SANTOYO GARCIA JEAN MICHELL - 49971015L**
Firmado digitalmente por SANTOYO GARCIA JEAN MICHELL - 49971015L
Fecha: 2023.02.23 15:52:03 +01'00'

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados	
Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos:	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

A mis hijos

A mi familia y amigos

A Sofía

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Isabel Hernández García, por confiar en mi desde que le pedí la dirección de esta tesis doctoral. Empezó siendo mi tutora, luego fue mi compañera, poco después nos hicimos amigos y hoy la siento parte de mi familia. Gracias por transmitirme tu experiencia y tus valores, por tu apoyo incondicional e ilusión por este proyecto.

Al Dr. José Antonio Noguera Velasco, por hacerme sentir parte de su equipo en la Arrixaca, por estar siempre disponible, por compartir lo que sabe, por la ayuda y los consejos recibidos. Ha sido un regalo trabajar y estar en contacto contigo, eres un gran analista y una excelente persona.

A la Unidad de Medicina Materno Fetal del HCUVA, en especial a la Dra. Catalina de Paco Matallana y al Dr. Juan Luis Delgado Marín, por su colaboración en la realización de este proyecto. A Macarena Quesada Rojas y a Delia López Fernández, por su excelente trabajo en el reclutamiento, recogida de datos y muestras biológicas de las gestantes.

Al servicio de Análisis Clínicos del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, por el apoyo recibido en la medición de los biomarcadores, en particular a Francisco Avilés Plaza, Pedro Luis Tornel Osorio y a Ignacio González. He aprendido mucho de todos y me he sentido muy arropado en el laboratorio del Hospital.

A la Dra. Trinidad Hernández Caselles, por su asesoramiento en un campo tan complejo y desconocido como la citometría de microvesículas.

A José Muñoz Ramos y a sus compañeras del SAI de la Universidad de Murcia, por haber puesto a nuestro servicio las instalaciones y el equipamiento del centro, por el soporte técnico recibido.

Al personal del Biobanco de la Región de Murcia, por su profesionalidad y eficiencia en la recepción, procesamiento y custodia de las muestras de este estudio.

A todos los compañeros del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia. A la Dra. María Teresa Llinás, por sus comentarios y sugerencias para orientar la investigación. A Mari Carmen Pérez, por su valiosa ayuda en el laboratorio.

A Virginia Pérez, por su asesoramiento en el procesamiento de los datos y en la estadística de la tesis.

A Julio Alberto Díaz, por ayudarme con la medición de los biomarcadores de inflamación.

A mis compatriotas Luis Arístides Torres y Tania García, por su ayuda en la estandarización del ELISA que utilizamos en este trabajo.

A Vicente Bosch Giménez, por estar atento a la evolución de la investigación, y echar una mano en la revisión de los resultados.

A mis compañeros del Hospital de Torrevieja por ayudarme a conciliar mi labor como analista con la tarea de investigar, por sus palabras de aliento, por su amistad, por su interés en que todo saliera bien.

A toda mi familia. En especial, a mi hermano, a mi cuñada y a mis padres, por su apoyo constante y cariño incondicional.

A mi mujer, Sofía, por estar cada día a mi lado, por hacerlo todo fácil, por su paciencia, por convertirse en mi ayudante personal día, noche y fines de semana, por hacerme tan feliz. A nuestros hijos, los tuyos y míos, la tripulación de ese barco que llevamos juntos por los mares de la vida, que nos dan fuerzas para seguir adelante, cumpliendo metas y asumiendo nuevos retos.

A todos, muchas gracias.

ABREVIATURAS

Tabla de abreviaturas

ADMA	Dimetil arginina asimétrica
ApoAI	Apolipoproteína AI
ApoB	Apolipoproteína B
AU	Ácido úrico
AUC	Área bajo la curva
CAs	Cuerpos apoptóticos
CATS	Capacidad antioxidante total del suero
DMG	Diabetes mellitus gestacional
ECV	Enfermedad cardiovascular
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
eNOS	Enzima óxido nítrico sintasa endotelial
ERN	Especies reactivas del nitrógeno
ERO	Especies reactivas del oxígeno
FSC	Luz dispersada frontal
GDF-15	Factor de diferenciación del crecimiento 15
HCIS	Homocisteína
HCUVA	Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HELLP	Hemólisis, elevación de enzimas hepáticas y disminución de plaquetas
HIF-1 α	Factor inducible por hipoxia 1 α
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
IC	Intervalo de confianza
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
IL	Interleuquina
IMC	Índice de masa corporal
INE	Instituto Nacional de Estadística
ISEV	Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LpA	Lipoproteína A
MoM	Múltiplos de la mediana
MVs	Microvesículas celulares

ABREVIATURAS

MVs-ena	Microvesículas de células endoteliales activadas
MVs-end	Microvesículas de células endoteliales
MVs-leu	Microvesículas de leucocitos
MVs-mon	Microvesículas de monocitos
MVs-pla	Microvesículas de plaquetas
MVs-sct	Microvesículas de sincitiotrofoblasto
MVs-tot	Total de microvesículas anexina V+
NK	Asesinas naturales
NO	Óxido nítrico
PAI	Inhibidor del activador del plasminógeno
PAM	Presión arterial media
PCR	proteína C reactiva
PE	Preeclampsia
PIGF	Factor de crecimiento placentario
ROC	Curva de rendimiento diagnóstico
sEng	Endoglina soluble
SFL	Luz fluorescente lateral
sFlt-1	Forma soluble de la tirosina quinasa tipo 1 similar al FMS
SSC	Luz dispersada lateral
TGF- β 3	Factor de crecimiento transformante β 3
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
TRACE	Emisión amplificada de criptato resuelta en el tiempo
UtA-PI	Índice de pulsatilidad de las arterias uterinas
VCAM-1	Molécula de adhesión de células vasculares 1
VE	Vesículas extracelulares
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo

INDICE

1	Introducción	1
1.1	Preeclampsia	1
1.1.1	Definición	1
1.1.2	Epidemiología y factores de riesgo	1
1.1.3	Clasificación.....	2
1.1.4	Fisiopatología	3
1.1.5	Presentación clínica.....	8
1.1.6	Manejo	10
1.1.6.1	Prevención.....	10
1.1.6.2	Tratamiento.....	12
1.2	Endotelio	13
1.2.1	Disfunción endotelial.....	14
1.2.2	Estudio de la función endotelial.....	15
1.3	Biomarcadores	18
1.3.1	Biomarcadores de estrés oxidativo.....	18
1.3.1.1	Capacidad antioxidante total del suero	18
1.3.1.2	Homocisteína.....	19
1.3.1.3	Ácido úrico.....	20
1.3.2	Marcadores angiogénicos	21
1.3.2.1	Factor de crecimiento placentario	21
1.3.2.2	Forma soluble de la tirosina quinasa tipo 1	22
1.3.2.3	Relación sFlt-1/PlGF	23
1.3.3	Biomarcadores de inflamación.....	24
1.3.3.1	Interleuquina 6.....	24
1.3.3.2	Factor de diferenciación del crecimiento 15.....	26
1.3.3.3	Proteína C reactiva	27
1.3.4	Biomarcadores de función endotelial	28
1.3.4.1	Vesículas extracelulares	28
1.3.4.2	Dimetil arginina asimétrica	35
1.3.5	Biomarcadores de dislipemia	36
1.4	Preeclampsia y enfermedad cardiovascular	37
1.5	Estatinas	39
1.5.1	Pravastatina en la prevención de la preeclampsia.....	42
2	Hipótesis y objetivos	44
2.1	Hipótesis.....	44
2.2	Objetivos	44

INDICE

2.2.1	Objetivo general:.....	44
2.2.2	Objetivos específicos:.....	44
3	Material y método.....	45
3.1	Ámbito, sujetos y diseño del estudio	45
3.1.1	Selección de la población	46
3.1.2	Criterios de elegibilidad.....	46
3.1.3	Grupos de estudio	48
3.1.4	Intervención	48
3.1.5	Etapas del ensayo clínico.....	49
3.1.6	Tamaño de la muestra.....	50
3.2	Método.....	51
3.2.1	Recogida y procesamiento de las muestras.....	51
3.2.2	Parámetros del estudio	51
3.2.3	Cálculo del riesgo de preeclampsia tardía (enfoque del riesgo competitivo).....	54
3.2.4	Determinación de la presión arterial media	54
3.2.5	Estudio doppler de la arteria uterina	55
3.2.6	Medición de biomarcadores	55
3.2.6.1	Citometría de flujo	55
3.2.6.2	Electroquimioluminiscencia	61
3.2.6.3	Nefelometría	62
3.2.6.4	ELISA	63
3.2.6.5	Métodos automatizados	63
3.2.6.6	Colorimetría manual.....	63
3.2.6.7	Fluoroinmunoanálisis	64
3.2.7	Registro de los datos del estudio	64
3.2.8	Análisis estadístico de los datos	64
3.2.9	Confidencialidad.....	65
3.2.10	Financiación.....	66
4	Resultados	67
4.1	Análisis de los grupos de estudio	67
4.1.1	Características demográficas y clínicas	67
4.1.2	Biomarcadores	70
4.1.2.1	Biomarcadores de estrés oxidativo	70
4.1.2.2	Biomarcadores de inflamación.....	71
4.1.2.3	Biomarcadores angiogénicos	72
4.1.2.4	Biomarcadores de función endotelial	73

INDICE

4.1.2.5	Biomarcadores de dislipemia	76
4.1.3	Análisis de las pacientes que desarrollaron preeclampsia.....	77
4.1.4	Análisis del rendimiento de los biomarcadores	81
4.1.5	Análisis de correlación de las distintas variables estudiadas	84
4.1.6	Influencia de las variables demográficas y clínicas sobre los biomarcadores	85
4.1.7	Influencia de los biomarcadores sobre la presión arterial media.....	87
4.1.8	Modelo explicativo del riesgo de preeclampsia a término a partir de los biomarcadores	88
4.2	Análisis de los resultados de los subgrupos del ensayo clínico.....	92
4.2.1	Características basales	92
4.2.2	Efecto del tratamiento con pravastatina sobre los biomarcadores.....	92
4.2.2.1	Biomarcadores de estrés oxidativo	92
4.2.2.2	Biomarcadores de inflamación.....	93
4.2.2.3	Biomarcadores angiogénicos/antiangiogénicos	94
4.2.2.4	Biomarcadores de función endotelial	95
4.2.2.5	Marcadores de dislipemia	98
4.2.2.6	Influencia de la duración del tratamiento sobre los biomarcadores	100
4.2.2.7	Influencia de la pravastatina sobre la presión arterial media.....	103
5	Discusión	104
5.1	Análisis de los grupos de estudio	104
5.1.1	Características demográficas y clínicas	104
5.1.1.1	Edad materna	104
5.1.1.2	Peso, estatura e índice de masa corporal	105
5.1.1.3	Raza	106
5.1.1.4	Hábito de fumar, consumo de alcohol o drogas	107
5.1.1.5	Nuliparidad.....	107
5.1.1.6	Historia familiar de preeclampsia	108
5.1.1.7	Comorbilidades	109
5.1.1.8	Técnicas de reproducción asistida	109
5.1.1.9	Presión arterial media.....	109
5.1.1.10	Consumo de aspirina en dosis bajas	110
5.1.1.11	Índice de pulsatilidad de la arteria uterina	111
5.1.1.12	Diabetes gestacional	111
5.1.1.13	Preeclampsia	112
5.1.1.14	Hipertensión inducida por el embarazo.....	113
5.1.1.15	Resultados del embarazo	113

INDICE

5.1.2	Análisis de los biomarcadores en los grupos de estudio.....	114
5.1.2.1	Biomarcadores de estrés oxidativo	114
5.1.2.2	Biomarcadores de inflamación.....	117
5.1.2.3	Biomarcadores angiogénicos	120
5.1.2.4	Biomarcadores de función endotelial	121
5.1.3	Análisis del rendimiento de los biomarcadores	128
5.1.4	Análisis del modelo explicativo del riesgo de preeclampsia a término con biomarcadores relacionados con la función endotelial	131
5.2	Riesgo de preeclampsia y de desarrollo de enfermedad cardiovascular.....	132
5.3	Análisis pareado de los biomarcadores en los subgrupos del ensayo clínico.....	133
5.3.1	Biomarcadores de estrés oxidativo	134
5.3.2	Biomarcadores de inflamación.....	136
5.3.3	Biomarcadores angiogénicos	137
5.3.4	Biomarcadores de función endotelial	137
5.3.5	Biomarcadores de dislipemia	139
5.4	Resultados del ensayo clínico, implicaciones en la función endotelial.....	140
5.5	Limitaciones	142
5.6	Perspectivas	143
6	Conclusiones.....	145
7	Bibliografía	146
8	Anexos.....	168
I.	Dictamen favorable del Comité de Ética de Investigación con Medicamentos del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca.....	168
II.	Propuesta favorable de la Comisión para la Realización de Trabajos de Investigación en el Área I de Salud a la Dirección Gerencia del Área	169
III.	Informe favorable de la Comisión de Ética de Investigación de la Universidad de Murcia	170
IV.	Informe favorable del Comité de Bioseguridad en Experimentación de la Universidad de Murcia	171
V.	Consentimiento informado firmado por los participantes del estudio	172
VI.	Características técnicas de los ensayos utilizados para el estudio	176
VII.	Valores de normalidad de los biomarcadores analizados en el estudio.....	177
VIII.	Curvas de emisión de los fluorocromos del panel	178
IX.	Tablas de resultados.....	182

1 Introducción

1.1 Preeclampsia

La preeclampsia (PE) es una enfermedad multisistémica caracterizada por la aparición de hipertensión arterial y proteinuria en la segunda mitad de la gestación. Constituye una importante causa de morbilidad y mortalidad materna y neonatal que complica el 2 al 8% de los embarazos (Duley, 2009). En la madre puede progresar a disfunción endotelial generalizada que afecta principalmente al hígado, cerebro y riñones. En el feto se asocia a crecimiento intrauterino retardado y a partos prematuros (Sibai et al., 2005).

1.1.1 Definición

Según la Sociedad Internacional para el Estudio de la Hipertensión en el Embarazo (ISSHP, International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy), la PE es la hipertensión persistente *de novo* (presión arterial sistólica ≥ 140 mmHg, presión arterial diastólica ≥ 90 mmHg) que se desarrolla a partir de las 20 semanas de gestación acompañada de una o más de las siguientes condiciones de nueva aparición:

- Proteinuria (definida como la excreción de ≥ 300 mg de proteína en orina de 24h; o un cociente proteína/creatinina $\geq 0,3$ (medidas ambas en mg/dL).
- Otras disfunciones de órganos maternos:
 - o Daño renal agudo (creatinina ≥ 1 mg/dL).
 - o Afectación hepática (elevación de las transaminasas, por ejemplo, ALT o AST >40 UI/L) con o sin dolor abdominal en el cuadrante superior derecho o epigástrico.
 - o Complicaciones neurológicas (ejemplos: eclampsia, alteración del estado mental, ceguera, derrame cerebral, *clonus*, cefaleas graves y escotoma visual persistente).
 - o Complicaciones hematológicas (trombocitopenia, coagulación intravascular diseminada, hemólisis, etc.).
- Disfunción uteroplacentaria (como restricción del crecimiento fetal, forma anormal de la onda del Doppler de la arteria umbilical, o mortinato) (Brown et al., 2018).

1.1.2 Epidemiología y factores de riesgo

La PE es responsable de más de 500 000 muertes fetales y neonatales y de más de 70 000 muertes maternas cada año a nivel mundial (Brown et al., 2018). Complica hasta un 10% de las

gestaciones, aunque la falta de estandarización del diagnóstico y la heterogeneidad de las poblaciones estudiadas dificultan las estimaciones. La incidencia de la enfermedad es superior en los países en vías de desarrollo, aunque sigue siendo alta en los países desarrollados (Hutcheon et al., 2011).

Existen varios factores que aumentan el riesgo de desarrollar la enfermedad. Una mujer tiene alto riesgo de PE si ha tenido una enfermedad hipertensiva durante un embarazo, enfermedad renal crónica, enfermedades autoinmunes (lupus eritematoso sistémico, síndrome antifosfolípido, etc.), diabetes o hipertensión crónica. Las mujeres corren un riesgo moderado si son nulíparas, tienen una edad ≥ 40 años, un índice de masa corporal (IMC) ≥ 35 kg/m², antecedentes familiares de PE, un embarazo multifetal, mola hidatiforme, un intervalo entre embarazos de más de 10 años y si su origen étnico es afroamericano. Existen otros factores clínicos que aumentan significativamente el riesgo de PE, como la elevación de la presión arterial media (PAM) antes de las 15 semanas de gestación, los estados de hipercoagulación, las enfermedades vasculares, el síndrome del ovario poliquístico, los trastornos respiratorios del sueño y diversas infecciones como la enfermedad periodontal, las infecciones del tracto urinario y el *Helicobacter pylori*. En cuanto a los antecedentes obstétricos, el sangrado vaginal durante al menos cinco días durante el embarazo aumenta el riesgo de PE, al igual que el uso de la donación de ovocitos (Fox et al., 2019; Wang et al., 2009). Se ha demostrado que el tabaquismo reduce la aparición de la PE (Wikström et al., 2010).

1.1.3 Clasificación

En función de la edad gestacional a la que se instaura, la PE puede clasificarse como PE de inicio temprano (antes de 34 semanas) o PE de inicio tardío (a las 34 semanas o después). La relevancia de esta clasificación va más allá de etiquetar la enfermedad ya que estos subtipos difieren en su fisiopatología, complicaciones derivadas y manejo clínico (Álvarez-Fernández et al., 2016).

En la PE de inicio temprano (placentaria) se produce una placentación anormal por hipoxia, que provoca un aumento de los niveles de la forma soluble de la tirosina quinasa tipo 1 similar al FMS (sFlt-1) y una disminución del factor de crecimiento placentario (PIGF). Esto altera el equilibrio angiogénico y modifica el flujo sanguíneo al embrión en desarrollo; la PE placentaria se asocia con una alteración de la transformación fisiológica de las arterias espirales que ocasiona una resistencia al flujo sanguíneo en las arterias uterinas. La PE de inicio tardío (materna) surge debido a la interacción entre la placenta y factores maternos que, en última instancia, causan daños microvasculares, y provocan disfunción endotelial materna. La PE

materna se produce en las fases más tardías del embarazo, por lo que realmente hay poco o ningún cambio en la transformación arterial y, por tanto, se mantiene la perfusión placentaria. La PE de inicio temprano es más grave que la de inicio tardío (Nirupama et al., 2021).

1.1.4 Fisiopatología

La PE, que a menudo se presenta como hipertensión de inicio reciente y proteinuria durante el tercer trimestre de embarazo, puede progresar rápidamente a complicaciones graves, incluida la muerte tanto de la madre como del feto. Si bien aún se debate la causa de la PE, numerosos estudios fisiopatológicos y clínicos sugieren que la placenta es un elemento central en la patogenia de este síndrome.

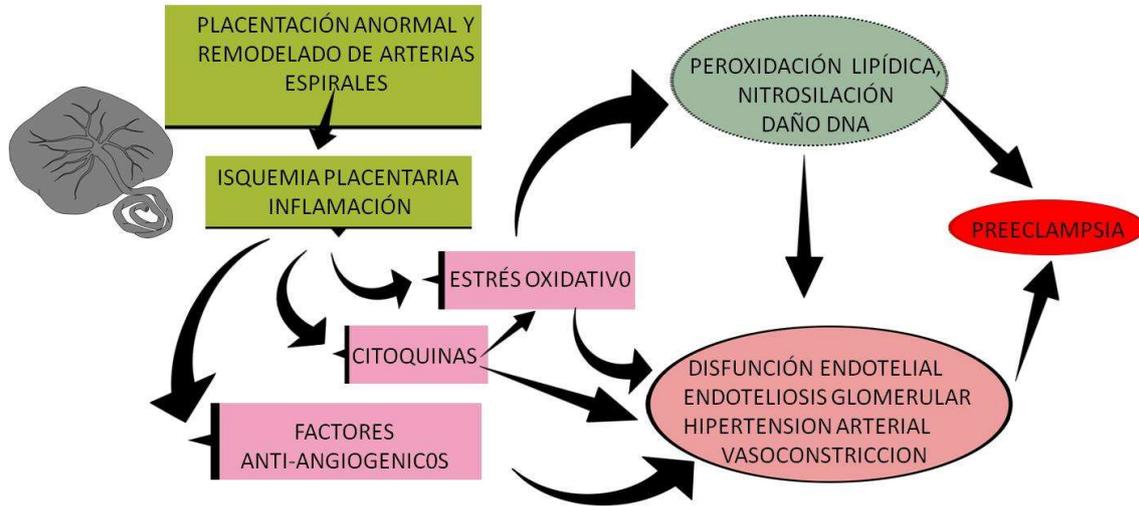
La PE es una enfermedad de la placenta que progresa en dos etapas: una placentación anormal al principio del primer trimestre, seguida de un "síndrome materno" en el segundo y tercer trimestre, caracterizado por un exceso de factores antiangiogénicos. Aunque el mecanismo por el que ocurre la placentación anormal es controvertido, se ha demostrado en modelos animales que la isquemia uteroplacentaria impulsa la respuesta hipertensiva y el fallo multiorgánico observado en el síndrome preecláptico materno. Se han propuesto varias teorías para explicar la disfunción placentaria observada en el primer estadio, entre ellas el aumento del estrés oxidativo, la presencia de células asesinas naturales (NK) anormales en la interfaz materno-fetal y la influencia de factores genéticos y ambientales. La placenta enferma provoca la liberación de factores solubles en la circulación materna que dan lugar a inflamación, disfunción endotelial y enfermedad sistémica materna (Rana & Karumanchi, 2017).

Durante el embarazo normal, el citotrofoblasto extraveloso de origen fetal invade las arteriolas espirales de la decidua y el miometrio, que pierden su naturaleza endotelial y se transforman de vasos de alta resistencia en grandes vasos, capaces de proporcionar una perfusión placentaria adecuada para alimentar al feto en desarrollo. En la PE se produce una invasión endovascular superficial que afecta el remodelado de las arteriolas espirales, que permanecen estrechas y sin dilatar (Rana & Karumanchi, 2017), reduciendo la presión de perfusión uterina y provocando isquemia placentaria e hipoxia (Figura 1.1).

La principal causa de insuficiencia placentaria es la hipoxia. En la PE, la falta de oxígeno en la placenta regula al alza la expresión del factor inducible por hipoxia 1α (HIF- 1α), que en estas condiciones potencia la expresión del sFlt-1 y del factor de crecimiento transformante $\beta 3$ (TGF- $\beta 3$), que inhibe la diferenciación del trofoblasto extraveloso y la proliferación del citotrofoblasto. Tanto HIF- 1α como TGF- $\beta 3$ se sobreexpresan en la placenta preecláptica y se

consideran indicativos de condiciones hipóxicas persistentes (Laresgoiti-Servitje & Gómez-López, 2012).

Figura 1.1
Fisiopatología de la PE



El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes que conduce a una alteración de la señalización y el control de los procesos de oxidorreducción endógenos. El estrés oxidativo implica especies reactivas de oxígeno (ERO), siendo las más comunes el superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Un proceso paralelo se conoce como estrés nitrosativo, que involucra especies reactivas del nitrógeno (ERN) como el óxido nítrico (NO) y el peroxinitrito. Debido a sus propiedades altamente reactivas, las ERO y las ERN pueden causar daños estructurales y fisiológicos en el ADN, el ARN, las proteínas y los lípidos, incluidos los lípidos unidos a la membrana celular.

Está bien documentado que el crecimiento embrionario y fetal requiere una cantidad moderada de estrés oxidativo y nitrosativo. En la fertilización, la embriogénesis, la implantación del embrión y el crecimiento y diferenciación de la placenta es necesario un balance adecuado entre las ERO, las ERN y los antioxidantes (Al-Gubory et al., 2010). Para combatir el estrés oxidativo existe un sistema de protección interno constituido por mecanismos de defensa antioxidantes, como el formado por la enzima superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa y el glutatión. Además, existe una relación entre las ERO y la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) que contribuye a mantener la salud endotelial y la PAM mediante la producción de NO, un potente vasodilatador (Del Rio et al., 2005).

A nivel celular, la PE se ha asociado en gran medida a la liberación de radicales libres por parte de la placenta. El estrés oxidativo y nitrosativo transmitido por la placenta se considera uno de los determinantes moleculares principales de la enfermedad materna. Como planteamos anteriormente, la PE se origina por un defecto de implantación de la placenta en la pared uterina materna debido a una alteración de la remodelación de las arteriolas uterinas espirales por parte del trofoblasto extraveloso, que conduce a una disminución de la perfusión placentaria. En consecuencia, se produce un flujo sanguíneo arterial intermitente que genera episodios repetidos de isquemia/reperfusión, creando así un entorno favorable para el aumento del estrés oxidativo. El daño oxidativo en la placenta conduce a la inflamación, la apoptosis y la liberación de restos celulares en la circulación materna, junto con varios factores antiangiogénicos, como el sFlt-1 y la endoglina soluble (sEng), citoquinas y oxidantes. Estos factores derivados de la placenta actúan sobre el endotelio vascular materno, induciendo estrés oxidativo y estimulando la producción y secreción de citoquinas proinflamatorias, así como de compuestos vasoactivos, que finalmente dan lugar a una disfunción endotelial sistémica masiva caracterizada por la inflamación y la constricción vascular. De hecho, el estrés oxidativo parece ser el componente central tanto de la disfunción placentaria como de la endotelial (Aouahe et al., 2018).

Varios estudios han ilustrado el efecto del estrés oxidativo en la función renal y la presión arterial en la PE, donde se ha establecido una clara asociación entre las ERO, la lesión renal aguda, el daño endotelial y la pérdida de podocitos (Kattah, 2020). Además, las ERO producen vasoconstricción a través de la reducción del NO, produciendo hipertensión y proteinuria (D'Souza et al., 2016).

La hipoxia y la isquemia placentaria son factores desencadenantes de la reducción en la síntesis de NO, un potente vasodilatador que relaja el endotelio vascular y disminuye la resistencia de las arterias espirales. La disminución de los niveles de NO provoca vasoconstricción y parece estar asociada a varios cambios uteroplacentarios como la disminución del diámetro de las arterias uterinas, la longitud de las arterias espirales y el flujo sanguíneo uteroplacentario (Kulandavelu et al., 2012).

La placentación inadecuada también puede causar un desbalance entre factores antiangiogénicos como el sFlt-1 y la sEng, y entre factores proangiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el PlGF, o estimular la liberación de citoquinas inflamatorias, del HIF-1 α , de ERO, de autoanticuerpos agonistas del receptor de angiotensina I y de otros factores circulantes que podrían actuar sobre las células endoteliales y producir una disfunción endotelial generalizada (Possomato-Vieira & Khalil, 2016).

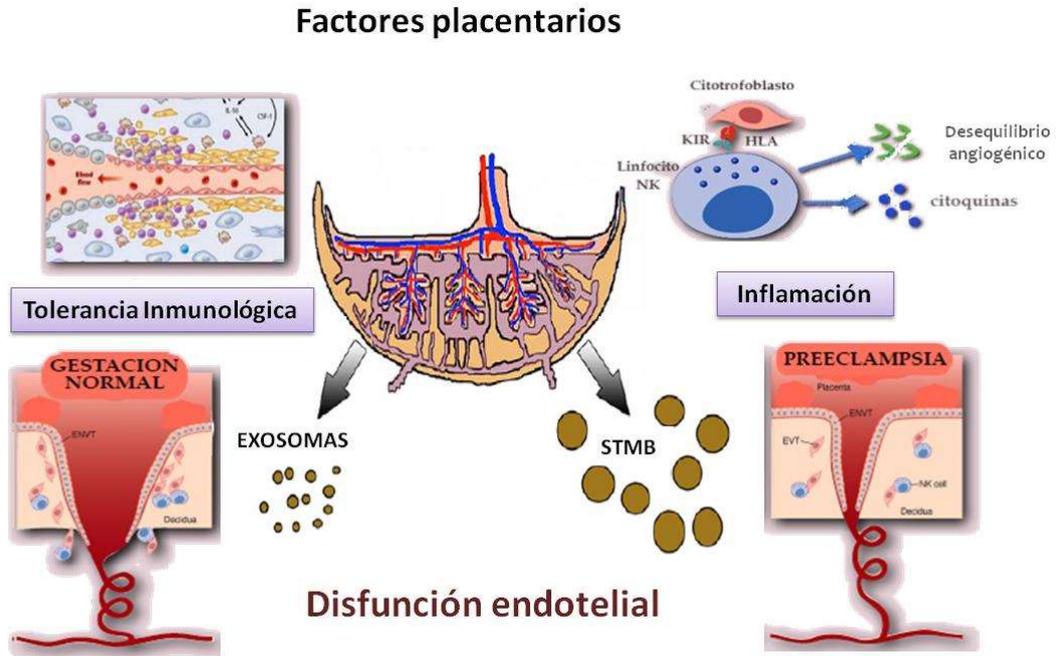
Las alteraciones en los factores angiogénicos desempeñan un papel importante en la PE. Una reducción del PlGF bastante temprana se observa en las mujeres destinadas a desarrollar PE, mientras se elevan los niveles de sFlt-1. El sFlt-1 se une tanto al VEGF como al PlGF en la PE e impide que se unan a sus receptores endógenos. El sFlt-1 parece ser el mediador central de la PE, su elevación en la circulación materna precede a la aparición de la PE clínica (Hertig et al., 2004).

Por otro lado, se plantea que una respuesta inmune alterada contribuye significativamente a la PE. Durante el embarazo normal, la invasión del trofoblasto y la remodelación de las arterias espirales son asistidas por células inmunes como los macrófagos, las células dendríticas y las células NK, que se infiltran en la decidua y se congregan alrededor de las células del trofoblasto permitiéndoles alcanzar el endotelio. La invasión inadecuada del trofoblasto en la PE y la isquemia placentaria debida a una remodelación inadecuada de las arterias espirales contribuyen al desequilibrio inmunitario que se observa normalmente en la condición preecláptica (Nirupama et al., 2021).

La alteración de la respuesta inmunitaria puede iniciar la inflamación en la PE, tal y como se muestra en la Figura 1.2. Durante el embarazo normal hay un aumento de la inmunidad innata que se manifiesta por un aumento de los monocitos y los granulocitos, mientras que las células NK y las células dendríticas disminuyen. En cambio, durante la PE se produce un aumento de la cantidad de células NK y dendríticas debido a la alteración de la respuesta inmunitaria. Esto activa mecanismos inflamatorios similares a los observados en las enfermedades autoinmunes, donde las citoquinas proinflamatorias como el Interferón gamma, el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y las interleuquinas (IL) 1, 2, 6, 8, 15, 16 y 18 están significativamente elevadas, mientras que las citoquinas antiinflamatorias están reducidas en la circulación materna de las mujeres preeclápticas. Este desequilibrio provoca una inflamación crónica y complica aún más el embarazo. El TNF- α y la IL-6 contribuyen a la disfunción del endotelio, donde estimulan una mayor producción de moléculas de adhesión. El TNF- α también activa las células endoteliales y produce niveles significativamente altos de un potente vasoconstrictor, la endotelina-1 (Nirupama et al., 2021).

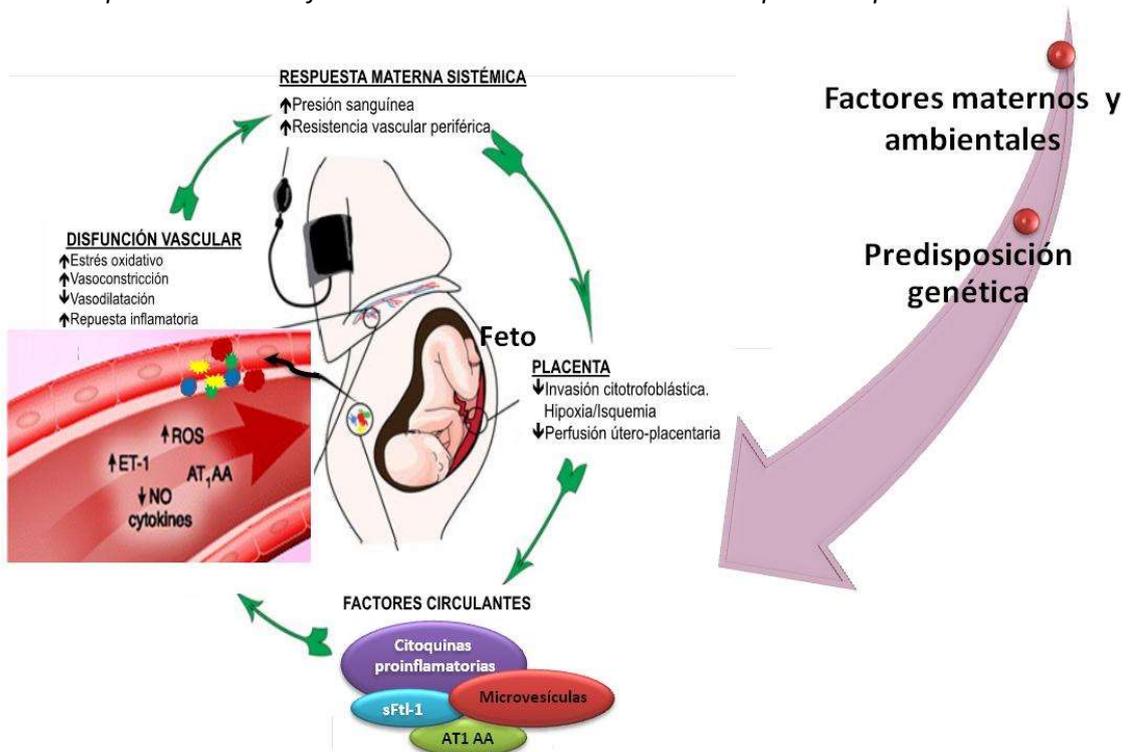
La PE comienza en la placenta, sin embargo, su órgano diana es el endotelio materno. Tal y como muestra la Figura 1.3, junto con factores predisponentes maternos, la liberación de factores circulantes vasoconstrictores por la placenta enferma produce daño generalizado en el endotelio de varios órganos. En la PE varios marcadores séricos de activación y disfunción endotelial están fuera del rango fisiológico (Young et al., 2010).

Figura 1.2
Participación de la respuesta inmune en la fisiopatología de la preeclampsia



Nota. NK, células asesinas naturales; KIR, receptores tipo inmunoglobulina de las células NK. HLA, antígeno leucocitario humano; STMB, liberación de microvesículas de sincitiotrofoblasto.

Figura 1.3
Factores implicados en la disfunción endotelial característica de la preeclampsia.



Nota. ROS, especies reactivas del oxígeno; ET-1, endotelina 1; AT₁AA, autoanticuerpo antagonista del receptor de la angiotensina I; NO, óxido nítrico; sFLT-1, forma soluble de la tirosina quinasa tipo 1 similar al FMS.

Varios ensayos clínicos e investigaciones experimentales sugieren que la endoteliosis generalizada que ocurre en los sistemas renal, cerebral y en la circulación hepática podrían reducir la presencia de vasodilatadores de origen endotelial como el NO, la prostaciclina y el factor de hiperpolarización, y aumentar los niveles de vasoconstrictores como la endotelina-1 y el tromboxano A2, provocando un incremento de la resistencia vascular, hipertensión y otras manifestaciones de la PE (Possomato-Vieira & Khalil, 2016). Los componentes de la red de inflamación intravascular (leucocitos, células endoteliales y cascada de la coagulación) contribuyen a la exacerbación de la respuesta inflamatoria en la PE. Además de esto, las citoquinas placentarias, los factores angiogénicos, los fragmentos apoptóticos y otras microvesículas (MVs) liberados a la sangre materna son elementos que precipitan este proceso inflamatorio sistémico.

1.1.5 Presentación clínica

La presentación clínica de la PE es compleja porque es asintomática en los primeros meses del embarazo, sus manifestaciones son muy variables y puede empeorar rápidamente. La PE se diagnostica por la aparición de hipertensión después de las 20 semanas de gestación, acompañada de proteinuria y/o evidencia de lesión renal aguda materna, disfunción hepática, trastornos neurológicos, hemólisis o trombocitopenia, o restricción del crecimiento fetal. En algunos casos la PE puede desarrollarse o reconocerse por primera vez durante el parto o en el posparto temprano.

La hipertensión arterial es la característica principal de las gestantes con PE. El aumento de la presión arterial se debe a la alteración en la producción de factores reguladores del tono vascular, que inducen vasoconstricción e incrementan la resistencia vascular. Si la presión arterial sistólica ≥ 160 mmHg y la presión arterial diastólica ≥ 110 mmHg, la hipertensión se considera severa (Brown et al., 2018).

Aunque la proteinuria no es imprescindible para diagnosticar la PE, es otro hallazgo frecuente en esta patología, donde se altera la función renal. En la PE se presenta una lesión glomerular característica llamada endoteliosis glomerular, una microangiopatía trombótica en la que ocurre edema endotelial glomerular con pérdida de fenestraciones endoteliales y disminución de la luz de los capilares. Estos cambios producen lesión celular y alteración del aparato de filtración con la subsiguiente pérdida de proteínas en la orina (Stillman & Karumanchi, 2007), que pueden igualar o superar los 300 mg/24h.

En los casos más graves de PE pueden presentarse alteraciones hepáticas que provocan síntomas como el dolor epigástrico y son una consecuencia de la disfunción endotelial de los sinusoides hepáticos, que desencadena fibrosis, trombosis y en algunos casos necrosis del parénquima hepático. Una evidencia de la disfunción hepática en la PE es el síndrome caracterizado por la presencia de hemólisis, elevación de enzimas hepáticas y disminución de las plaquetas (HELLP), en el que se produce hemólisis intravascular (lactato deshidrogenasa ≥ 600 UI/L), elevación de las transaminasas hepáticas (aspartato aminotransferasa ≥ 70 UI/L) y trombocitopenia (recuento de plaquetas $\leq 100\ 000/\mu\text{L}$). Este síndrome es una manifestación grave de la PE y no un trastorno independiente (Brown et al., 2018; Álvarez-Fernández et al., 2016).

En la PE también pueden presentarse complicaciones neurológicas (eclampsia, alteración del estado mental, ceguera, derrame cerebral, *clonus*, cefaleas severas y escotomas visuales persistentes). Las convulsiones eclámpticas complican alrededor del 2% de las PE. Estas convulsiones también pueden producirse desde las 48 horas hasta un mes después del parto. En la base fisiopatológica de estos trastornos que se producen en la PE están la inflamación, la disfunción del endotelio vascular y cambios en la vasorreactividad. Las complicaciones neurológicas son reconocidas como un importante contribuyente a la morbilidad y mortalidad del embarazo con PE (Miller & Vollbracht, 2021).

Como señalamos anteriormente, a nivel hematológico es habitual encontrar anemia hemolítica y/o trombocitopenia, 2 signos que son característicos del síndrome HELLP. En algunos casos se produce una activación descontrolada del sistema de la hemostasia, lo que puede culminar con el desarrollo de coagulación intravascular diseminada (Álvarez-Fernández et al., 2016).

La alteración de la permeabilidad vascular provoca edemas en las gestantes, que en los casos más graves pueden llegar a desarrollar edema pulmonar agudo, una complicación rara y potencialmente mortal que afecta aproximadamente al 0,08% de las mujeres durante el embarazo, siendo más común durante el período posparto inmediato. Los cambios fisiopatológicos relacionados con este fenómeno se asocian con el daño endotelial y la hemodinámica anormal que ocurren en la PE con características graves (Ram et al., 2021).

Las complicaciones fetales y neonatales de la PE incluyen el parto prematuro, la prematuridad iatrogénica, la restricción del crecimiento fetal, el oligohidramnios y la muerte perinatal. Estas

complicaciones se producen debido a la insuficiencia placentaria, la placentación anormal y el flujo sanguíneo uteroplacentario anormal (Nirupama et al., 2021).

1.1.6 Manejo

Las intervenciones para el tratamiento y la prevención de las complicaciones fetales de la PE son limitadas. Dado que la PE es responsable de alrededor del 20-30% de todos los partos prematuros, las opciones de tratamiento disponibles para optimizar el estado del feto, como la administración de corticosteroides prenatales y las infusiones de sulfato de magnesio, están dirigidas principalmente a prevenir los resultados adversos asociados a la prematuridad. Además, la prevención de resultados fetales adversos implica optimizar el momento del parto, que no es una mera intervención para reducir las complicaciones fetales, sino que requiere un cuidadoso análisis del equilibrio entre el estado del feto y el estado de la madre. El tratamiento de la PE también implica la optimización del estado de la madre con antihipertensivos y sulfato de magnesio si es necesario, lo que también puede beneficiar al feto (Fox et al., 2019).

1.1.6.1 Prevención

La prevención de la PE puede ser primaria, secundaria o terciaria (Bezerra et al., 2012). La prevención primaria implica evitar el embarazo en mujeres con alto riesgo de PE y modificar estilos de vida o de alimentación para disminuir la incidencia de la enfermedad. La prevención secundaria se basa en la interrupción de los mecanismos fisiopatológicos conocidos de la enfermedad antes de su establecimiento; los esfuerzos en esta dirección se han centrado en la identificación de mujeres con alto riesgo de PE y en la instauración de una intervención eficaz lo más precozmente posible para evitar la enfermedad o sus graves complicaciones. La prevención terciaria se basa en el uso de tratamientos para evitar las complicaciones de la PE, como el sulfato de magnesio en la reducción de la tasa de eclampsia.

Uno de los retos más importantes de la obstetricia moderna es la identificación de embarazos con alto riesgo de PE y la adopción de las medidas necesarias para reducir la incidencia de la enfermedad. Hasta el momento ninguna prueba o conjunto de pruebas del primer o segundo trimestre ha podido predecir de forma fiable el desarrollo de todos los casos de PE; sin embargo, una combinación de factores de riesgo materno, presión arterial, PIGF y la ecografía doppler de la arteria uterina permite seleccionar a las mujeres que pueden beneficiarse de 150 mg/día de aspirina para prevenir la PE precoz, aunque no disminuye la incidencia de PE a término. Utilizando este algoritmo, un gran ensayo clínico (ensayo ASPRE) confirmó que el cribado en el

primer trimestre, combinado con la administración de dosis bajas de aspirina, produce una disminución sustancial de la incidencia de PE temprana [odds ratio, 0,38; intervalo de confianza (IC) del 95%, 0,20-0,74; $p=0,004$] (Rolnik, et al., 2017a).

Aunque los resultados adversos para la madre y el bebé son más graves con la PE temprana, la contribución de la PE tardía a dichos resultados adversos es al menos igual de alta porque la condición es tres veces más común (Andrietti et al., 2016). Por esta razón, también se han desarrollado algoritmos para su predicción en la recta final del embarazo. Nicolaides *et al* validaron un cribado para predecir la PE tardía basado en el modelo de riesgos competitivos, un método que aplica el teorema de Bayes. Con su propuesta el cribado se realiza mediante una combinación de factores maternos con mediciones de la PAM, el PIGF y el sFlt-1 en suero entre las semanas 35 y 37 de gestación, con una tasa de detección de aproximadamente el 75% de los casos y una tasa de cribado positiva del 10%. Sin embargo, no se conoce ninguna intervención para reducir la incidencia de la enfermedad.

Una vez que se dispone de herramientas efectivas para la evaluación del riesgo en diferentes momentos de la gestación, en los últimos años se ha dirigido la atención hacia posibles actuaciones para disminuir la incidencia. Gran cantidad de publicaciones dan cuenta del esfuerzo realizado por la comunidad científica para desarrollar un tratamiento preventivo de la PE, aunque el éxito ha sido limitado.

Se sabe que la PE comparte varios mecanismos fisiopatológicos con la enfermedad cardiovascular (ECV) y esto ha llevado a investigar la utilidad potencial de las estatinas (uno de los pilares del tratamiento primario y secundario de la ECV) en la prevención y manejo de la PE. Las estatinas inhiben la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, que reduce en plasma los niveles de colesterol. Además, las estatinas tienen propiedades pleiotrópicas (antioxidantes, antiinflamatorios, antitrombóticas y antiproliferativas) que ejercen un efecto protector sobre la función endotelial y esto las convierte en una terapia potencial en el tratamiento y prevención de la PE (Katsi et al., 2017).

Hace algunos años Costantine *et al* publicaron un estudio piloto aleatorizado del tratamiento con pravastatina de gestantes con alto riesgo de PE desde las semanas 12-16 de gestación hasta el parto (Costantine et al., 2016) en el que no se produjeron efectos adversos y se consiguieron resultados promisorios para reducir la tasa de PE. Ellos concluyeron que era necesario realizar un estudio de mayor alcance para examinar la eficacia del tratamiento, dando lugar al desarrollo de un ensayo clínico para examinar el efecto de la pravastatina en la reducción de la incidencia

del parto con PE (Dobert et al., 2021), en el que nuestro grupo consideró conveniente examinar el efecto de este fármaco sobre la función endotelial vascular.

1.1.6.2 Tratamiento

La PE puede producir daño severo, incluso fatal, a corto y largo plazo tanto en la madre como el feto. Los pilares del tratamiento de la PE son la corrección de la hipertensión materna, la profilaxis de las convulsiones y garantizar el bienestar fetal. Cuando se realizan oportuna y adecuadamente, estas intervenciones han demostrado reducir la morbilidad y la mortalidad materna y fetal.

Para limitar las complicaciones materno-fetales se utilizan antihipertensivos orales combinados con antiagregantes plaquetarios y sulfato de magnesio (Brown et al., 2018). Si la edad gestacional es inferior a 34 semanas y la presión sanguínea puede controlarse, en ausencia de otros síntomas, el embarazo puede prolongarse para evitar las complicaciones de un parto prematuro. Si el tratamiento no corrige la hipertensión materna grave o si hay indicios de sufrimiento fetal, se justifica el parto. El único tratamiento definitivo de la PE es la eliminación de la placenta.

El reconocimiento y tratamiento de la hipertensión grave persistentemente elevada son necesarios para prevenir la morbilidad y mortalidad materna y fetal. El labetalol (un betabloqueante) y/o la hidralazina (un vasodilatador) se consideran tratamientos de primera línea para la emergencia hipertensiva aguda y se administran por vía intravenosa en bolo. El nifedipino oral de liberación inmediata, un bloqueante de los canales de calcio también puede utilizarse como tratamiento de primera línea (Too & Hill, 2013). El objetivo del tratamiento es reducir la presión arterial materna en un 15-25%, con un objetivo de presión arterial sistólica de 140-150 mmHg y de presión arterial diastólica de 90-100 mmHg. Se debe evitar un descenso excesivo de la presión arterial, ya que esto puede disminuir aún más la perfusión placentaria y potenciar los efectos negativos sobre el estado fetal. Cuando se desarrolla una PE grave antes de las 34 semanas de gestación en una paciente por lo demás estable, puede considerarse un tratamiento hospitalario conservador. En caso de enfermedad grave progresiva o síndrome HELLP está indicado el parto (Amaral et al., 2017). También se ha utilizado con resultados favorables el intercambio de plasma y la terapia con esteroides en mujeres con PE grave recalcitrante y síndrome HELLP no remitente (Owens et al., 2013).

La profilaxis contra las convulsiones maternas (eclampsia) se consigue mediante el uso de sulfato de magnesio. El sulfato de magnesio se administra en bolo intravenoso o en inyección

intramuscular. Aunque el sulfato de magnesio puede tener el efecto favorable de bajar la presión arterial materna, se ha demostrado que es superior a otros anticonvulsivantes en la prevención de las crisis eclámpicas y se considera el tratamiento de primera línea. Sin embargo, cuando está contraindicado pueden utilizarse los anticonvulsivantes tradicionales (Amaral et al., 2017).

La evaluación del estado del feto se realiza en función de la edad gestacional y del estado de la madre. En contextos más agudos, se utiliza la monitorización fetal continua en un esfuerzo por evaluar los signos de hipoxia intrauterina. Tras la estabilización materna, pueden utilizarse otros mecanismos de evaluación fetal (perfiles biofísicos, prueba no estresante fetal y/o evaluaciones doppler de la arteria umbilical fetal). Si los resultados son alarmantes, se justifica el parto (Amaral et al., 2017).

1.2 Endotelio

El endotelio consiste en una monocapa de células que reviste internamente los sistemas vascular y linfático, se estima que cubre una superficie de más de 1000 m² y es considerado el órgano más grande del cuerpo. La forma de las células endoteliales varía a lo largo del árbol vascular, pero generalmente son delgadas y ligeramente alargadas. Su superficie basolateral está separada de los tejidos circundantes por una membrana basal de glucoproteínas que las propias células endoteliales producen y anclan a su membrana celular, mientras que la superficie luminal está revestida por el glicocálix, una capa de macromoléculas unidas a la membrana que junto a proteoglicanos secretados por las células endoteliales y otras proteínas plasmáticas absorbidas forman la capa superficial endotelial (Krüger-Genge et al., 2019).

El endotelio desempeña un papel importante en diversas funciones fisiológicas, entre las que se encuentran la regulación de la presión sanguínea a través de la liberación de agentes vasoactivos como el NO y la endotelina, y el control de la extravasación de solutos, fluidos, macromoléculas, hormonas, plaquetas y células sanguíneas (Endemann & Schiffrin, 2004).

Mediante el control del tono vascular, las células endoteliales regulan el flujo sanguíneo regional, dirigen las células inflamatorias contra materiales extraños y hacia áreas que necesitan reparación o defensa contra las infecciones. Las células endoteliales son importantes para controlar la fluidez sanguínea, la adhesión y agregación de plaquetas, la activación, adhesión y migración de los leucocitos. También mantienen un estrecho equilibrio entre la coagulación y la fibrinólisis y desempeñan un papel importante en la regulación de las respuestas inmunitarias, la inflamación y la angiogénesis (Krüger-Genge et al., 2019).

1.2.1 Disfunción endotelial

La disfunción endotelial es un término general que se utiliza para definir el cambio de un endotelio normal y saludable a uno dañado o estresado con un fenotipo provasoconstrictor, procoagulante y proinflamatorio. Se asocia con la mayoría de las formas de ECV, como la hipertensión, la enfermedad arterial coronaria, la insuficiencia cardíaca crónica, la enfermedad arterial periférica, la diabetes y la insuficiencia renal crónica (Burger & Touyz, 2012). Una función endotelial anormal ha sido también descrita en la PE (Possomato-Vieira & Khalil, 2016).

Los mecanismos que participan en las respuestas vasodilatadoras reducidas en la disfunción endotelial incluyen la insuficiente generación de NO, el exceso oxidativo y la menor producción del factor hiperpolarizante. En la disfunción endotelial el aumento de las moléculas de adhesión, la generación de quimiocinas como el péptido quimioatrayente de macrófagos-1 y la producción del inhibidor del activador del plasminógeno 1 participan en la respuesta inflamatoria y contribuyen a un estado protrombótico. Los péptidos vasoactivos como la angiotensina II y la endotelina 1, la acumulación de dimetil arginina asimétrica (ADMA), la hipercolesterolemia, la hiperhomocisteinemia, la alteración de la señalización de la insulina y la hiperglucemia también pueden contribuir a través de diferentes mecanismos. El desprendimiento y la apoptosis de las células endoteliales son también fenómenos que se asocian a la disfunción endotelial (Endemann & Schiffrin, 2004).

El curso normal del embarazo incluye variaciones en la hemodinámica, como la frecuencia y el gasto cardíaco, que permiten a la placenta el intercambio adecuado de nutrientes y la eliminación de residuos entre la madre y el feto. Esta interfaz materno-fetal se desarrolla durante el primer trimestre de gestación, cuando el trofoblasto extraveloso de la placenta conquista la decidua materna. Durante esta etapa, las arterias espirales maternas de la decidua sufren un proceso de remodelación en el que pasan de ser vasos de baja capacidad y alta resistencia a vasos de alta capacidad y baja resistencia, un proceso que va acompañado de la sustitución del músculo liso y del tejido elástico de la pared de los vasos por material fibrinoide. A su vez, la PE se caracteriza por una invasión deficiente del trofoblasto fetal que provoca una remodelación reducida de las arterias espirales maternas, lo que a la larga conduce a una disminución del flujo sanguíneo que afecta al feto y al estado nutricional y la oxigenación de la placenta. Para compensar el déficit de flujo sanguíneo la madre desarrolla hipertensión, normalmente al final del segundo o tercer trimestre de gestación (Sánchez-Aranguren, et al., 2014). Curiosamente, los problemas asociados a este trastorno desaparecen tras el parto, lo que sugiere que la PE es un problema originado en gran medida en la placenta (Redman, 1991).

La perfusión placentaria reducida que se observa en estas circunstancias crea cambios en el entorno placentario, en el que las ERO y la activación de las células endoteliales a través de diferentes mecanismos dan lugar a la disfunción endotelial. Debido a la invasión defectuosa del trofoblasto, se produce una intermitencia del flujo sanguíneo arterial que da lugar a periodos de isquemia/reperfusión, creando un entorno hipóxico que favorece el estrés oxidativo, el consiguiente daño oxidativo y la inflamación (Myatt & Webster, 2009).

Uno de los mecanismos de la disfunción endotelial implica la liberación del sFlt-1, que es una proteína antiangiogénica circulante y un inhibidor endógeno del VEGF, que actúa potenciando la disfunción endotelial ya establecida por el estrés oxidativo (Sato et al., 2000). El VEGF es clave en el proceso de crecimiento de nuevos vasos sanguíneos y en el mantenimiento general y la salud de las células endoteliales. Se sabe que los niveles de sFlt-1 aumentan en la PE y que este aumento precede a la manifestación del trastorno. Los niveles elevados de sFlt-1 provocan una alteración en el funcionamiento del VEGF al impedir que se una a su receptor, que se encuentra en la membrana de la célula endotelial. El sFlt-1 es una forma trunca del receptor del VEGF, que lo antagoniza al igual que al PlGF, potenciando la disfunción endotelial. Varios estudios han demostrado que el VEGF y el PlGF son regulados a la baja en la PE por el sFlt-1 (Sánchez-Aranguren, et al., 2014; Sato et al., 2000).

En resumen, la PE es una enfermedad compleja que surge de problemas placentarios que afectan posteriormente a la madre y al feto, donde ocurren y concurren diversos acontecimientos que inducen una invasión defectuosa del trofoblasto que puede dar lugar a una intermitencia del flujo sanguíneo arterial, a periodos de isquemia/reperfusión que crean un entorno hipóxico que favorece el estrés oxidativo y el consiguiente daño oxidativo, a una respuesta inflamatoria y, por último, a la liberación de factores antiangiogénicos, que en conjunto producen una disfunción endotelial materna generalizada.

1.2.2 Estudio de la función endotelial

La función endotelial se determina examinando la vasodilatación dependiente del endotelio. Clásicamente, se realiza evaluando la respuesta vascular a la infusión de acetilcolina por cateterización o mediante pletismografía venosa; sin embargo, la naturaleza invasiva de estos procedimientos limita su utilización clínica de forma rutinaria. Existen otros métodos menos invasivos, como la medida de la vasodilatación mediada por flujo con ecografía de la arteria humeral, el análisis de la onda del pulso, la pletismografía digital durante la hiperemia postisquémica y la fluximetría láser doppler (Arrebola-Moreno et al., 2012). Cada uno de estos

procedimientos tiene sus propios retos técnicos y limitaciones, que son notables en relación con la estandarización. La función endotelial también puede ser determinada a través de biomarcadores circulantes que permiten estudiar mecanismos de patología endotelial y obtener información del estatus funcional del endotelio, al tiempo que mantienen una mínima invasividad (Burger & Touyz, 2012).

Los biomarcadores circulantes se derivan de vías moleculares relacionadas con aspectos de la función endotelial y pueden reflejar la biodisponibilidad de NO, los niveles de estrés oxidativo, el estado de la coagulación o la inflamación del endotelio.

La producción de NO por las células endoteliales es un determinante principal de la vasodilatación dependiente de endotelio. Se ha prestado una considerable atención a los niveles de este biomarcador de función endotelial, pero al tener una vida media muy corta en su lugar se han utilizado productos de su degradación oxidativa como los nitritos, los nitratos y los nitrosotioles, indicadores indirectos de su producción. Una alternativa para medir la producción de NO es la determinación de ADMA, un potente inhibidor competitivo endógeno de la producción de NO por la eNOS y un inhibidor del transportador catiónico de aminoácidos que proporciona L-arginina a la eNOS. Los niveles plasmáticos de ADMA correlacionan bien con la actividad de la eNOS y pueden asociarse a la disfunción endotelial (Burger & Touyz, 2012; Holden et al., 1998; Laskowska et al., 2012).

Además de la reducción en la producción de NO, el incremento de su catabolismo afecta la vasodilatación dependiente del endotelio. Por ejemplo, el anión superóxido (O_2^-) puede reaccionar con el NO para formar peroxinitrito ($ONOO^-$), reduciendo la biodisponibilidad de NO y afectando la distensión de los vasos. Además, los radicales peroxilo lipídicos formados durante la lipoperoxidación pueden reaccionar con el NO e inactivarlo. Por lo tanto, las ERO también han sido consideradas biomarcadores de disfunción endotelial, aunque no son específicas porque muchas células son capaces de producirlas. El estudio en el plasma o el suero del estrés oxidativo incluye indicadores de peroxidación lipídica como los F2-isoprostanos y niveles de nitrotirosina, que es un producto de la nitración de tirosina mediado por ERN tales como el anión peroxinitrito y dióxido de nitrógeno. La peroxidación lipídica se incrementa en las enfermedades relacionadas con la disfunción endotelial y por ello hay una fuerte correlación negativa entre el estrés oxidativo y la función endotelial. Por otro lado, los niveles plasmáticos elevados de ácido úrico (AU), que puede inactivar el NO e inhibir el transportador de arginina, pueden también indicar una disponibilidad reducida de NO y por ello se han correlacionado inversamente con la función endotelial en la enfermedad renal crónica (Burger & Touyz, 2012). La homocisteína (HCIS) es un

compuesto citotóxico que afecta negativamente al sistema endotelial y es un conocido factor de riesgo de enfermedad vascular (Peng et al., 2015). También se sabe que la hiperhomocisteinemia favorece la producción de peróxido de hidrógeno y de radicales libres superóxidos, que provocan daño oxidativo sobre las células endoteliales (Dai et al., 2021).

Debido a que la alteración de la función endotelial se acompaña frecuentemente de estados inflamatorios, los marcadores de inflamación también se han utilizado como indicadores indirectos de función endotelial. La proteína C reactiva (PCR), una molécula que se encuentra en el plasma y que aumenta en la respuesta inflamatoria, es un predictor independiente de la función endotelial anormal (Teran et al., 2005). Otros marcadores circulantes de inflamación incluyen citoquinas como la IL-6 (Greer et al., 1994), el TNF- α (Vince et al., 1995) y el factor de diferenciación del crecimiento 15 (GDF-15) (Rochette et al., 2020).

En la disfunción endotelial con frecuencia existen cambios en el estado procoagulante, lo que permite considerar los índices de coagulación como biomarcadores del estatus del endotelio. Incrementos en el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI), la selectina-P y el fibrinógeno se registran en varias enfermedades y correlacionan bien con la disfunción endotelial. El PAI es un inhibidor de la fibrinólisis producido primariamente en el endotelio y la selectina-P es un marcador de la activación de las plaquetas, que junto a los niveles de fibrinógeno son un reflejo del estado procoagulante. También se ha establecido una correlación con el factor von Willebrand, una glicoproteína sintetizada por el endotelio y los megacariocitos que se libera al plasma después del daño endotelial (Burger & Touyz, 2012).

Hasta hace pocos años los biomarcadores circulantes de disfunción endotelial utilizados habían sido mayoritariamente marcadores bioquímicos o marcadores basados en proteínas circulantes. Sin embargo, existe una evidencia creciente que respalda el uso de biomarcadores celulares como las MVs para estudiar la función endotelial (Alijotas-Reig et al., 2013). Las MVs se forman a partir de la membrana plasmática de varios tipos de células o de sus fragmentos (leucocitos, células endoteliales y sincitiotrofoblasto, plaquetas, etc.) en respuesta a procesos de activación celular o apoptosis y se consideran potentes vectores de información biológica y elementos centrales de las redes de comunicación celular, como la inducción de modificaciones endoteliales, la inflamación, la diferenciación celular y la angiogénesis (Marques et al., 2012). Aunque en el plasma de individuos sanos pueden encontrarse MVs, sus cantidades se incrementan bajo ciertas condiciones patológicas y su determinación mediante citometría de flujo puede proporcionar una medida indirecta del daño endotelial.

Se ha demostrado que los biomarcadores individualmente correlacionan bien con las medidas funcionales del estatus endotelial como la vasodilatación mediada por flujo, sin embargo, el uso combinado de múltiples biomarcadores puede proporcionar una visión más completa de la salud endotelial. Aunque se ha reportado que la determinación de múltiples biomarcadores no proporciona una medida de la contribución relativa de los distintos mecanismos a la disfunción endotelial, su utilización permite una valoración global más completa del estatus endotelial. Además, el uso de múltiples biomarcadores a lo largo de rutas biológicas similares permite superar las limitaciones asociadas a las mediciones de cada uno de forma aislada.

En este trabajo utilizamos biomarcadores de todas las categorías anteriormente mencionadas para el estudio de la función endotelial vascular.

1.3 Biomarcadores

1.3.1 Biomarcadores de estrés oxidativo

1.3.1.1 Capacidad antioxidante total del suero

Para hacer frente al metabolismo oxidativo el organismo cuenta con sistemas de defensa antioxidante que mantienen la capacidad de reducir a los radicales libres, las especies reactivas y los oxidantes endógenos y exógenos. Todos los sistemas antioxidantes se encuentran enlazados en un sistema amortiguador global, donde se suman y colaboran entre sí, haciendo frente a cualquier agresión oxidativa. Los sistemas antioxidantes se pueden medir de diferentes formas específicas, mientras que el sistema amortiguador antioxidante global se puede determinar mediante el análisis de la capacidad antioxidante total del suero (CATS). Este parámetro puede ofrecer una idea de cómo se encuentra el conjunto de la respuesta antioxidante.

Se sabe que en el embarazo aumenta el estrés oxidativo, producido principalmente por una respuesta inflamatoria sistémica normal, que da como resultado altas cantidades de ERO y ERN circulantes. Tanto las ERO como las ERN juegan un papel importante como mensajeros en muchas cascadas de señalización intracelular, pero también pueden ejercer efectos críticos en procesos patológicos que involucran a la mujer embarazada (Chiarello et al., 2020).

La principal fuente de ERO durante el embarazo es la placenta. En este sentido, el aumento del estrés oxidativo observado en el embarazo podría conducir a un daño tisular potencial. Sin embargo, en condiciones normales, se contrarresta con el aumento de la síntesis de antioxidantes. Cuando el estrés oxidativo supera la defensa antioxidante en la placenta, el daño oxidativo podría propagarse a tejidos distantes (Burton & Jauniaux, 2011).

En el desarrollo de la PE, la insuficiencia placentaria debida a una remodelación inadecuada de la vasculatura materna que perfunde el espacio intervilloso juega un papel importante, lo que da lugar a un proceso complejo de isquemia/reperfusión en la placenta con liberación de factores citotóxicos a la circulación materna. La alternancia placentaria entre un ambiente con poco oxígeno y la reoxigenación está relacionada con un desequilibrio en la angiogénesis, el daño endotelial vascular, las complicaciones cardiovasculares y una respuesta inflamatoria exagerada. La hipoxia/reoxigenación uteroplacentaria durante la PE aumenta el estrés oxidativo, que tiene consecuencias negativas para la madre y la salud fetal (Chiarello et al., 2020)

Varias publicaciones establecen una relación entre el estrés oxidativo y el desarrollo de la PE (D'souza et al., 2016) (Mannaerts et al., 2018), y su papel en la disfunción endotelial que ocurre en esta patología (Sánchez-Aranguren et al., 2014). En mujeres con PE se ha demostrado una reducción estadísticamente significativa de la CATS, el NO, la superóxido dismutasa, el glutatión, las vitaminas E y C, mientras que se produce un aumento estadísticamente significativo de malondialdehído, proteína carbonilo, peróxido total, glutatión peroxidasa, catalasa y AU (Taravati & Tohidi, 2018).

Dada la estrecha relación existente entre el estrés oxidativo y la capacidad antioxidante en diversas enfermedades, la determinación de la CATS podría ser utilizada como un indicador del estado patológico.

1.3.1.2 Homocisteína

La HCIS es un aminoácido con un grupo tiol que se sintetiza por desmetilación intracelular de la metionina. La hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo para la disfunción endotelial y la enfermedad vascular (Peng et al., 2015).

En comparación con las mujeres no embarazadas, el nivel de HCIS es más bajo en los embarazos normales (Cikot et al., 2001). Esto se debe a la hemodilución que causa el aumento del volumen de la sangre y a una tasa de filtración glomerular más elevada en el embarazo; además, el feto podría absorber una proporción de HCIS durante su desarrollo y la demanda de la madre también es mayor.

El aumento de la homocisteína plasmática puede estar asociado con resultados adversos del embarazo, como la PE, y también neonatales. La hiperhomocisteinemia favorece la producción de peróxido de hidrógeno y de radicales libres superóxidos, que provocan un daño oxidativo

sobre las células endoteliales y disminuyen la circulación sanguínea en la interfaz materno-fetal (Dai et al., 2021).

La asociación de hiperhomocisteinemia y PE fue sugerida inicialmente por Decker *et al* (Dekker et al., 1995; Dekker & van Geijn, 1996) y la mayoría de la evidencia sugiere una correlación positiva. Un elevado número de estudios ha encontrado niveles significativamente más altos de HCIS sérica entre mujeres que desarrollan PE en diferentes etapas del embarazo (Baksu et al., 2006; Dai et al., 2021; Makedos et al., 2007). También se ha publicado que los niveles elevados de HCIS durante el embarazo preceden a las manifestaciones clínicas de la PE y que la determinación seriada de sus concentraciones puede ser útil para identificar a las mujeres en riesgo (López et al., 2015).

1.3.1.3 Ácido úrico

El AU es el producto final del metabolismo de las purinas y es sintetizado por la enzima xantina-oxidoreductasa, que *in vivo* tiene dos isoformas: xantina deshidrogenasa y xantina oxidasa (Many et al., 1996).

En gestaciones normales, las concentraciones de AU disminuyen en un 25-35% como consecuencia de la expansión de la volemia, del aumento en el flujo sanguíneo renal y la velocidad de filtración glomerular, y por la acción uricosúrica del estrógeno. Sin embargo, hacia el final de la gestación, los niveles séricos de AU aumentan hasta alcanzar valores similares a los de las mujeres no embarazadas. Este incremento podría deberse al aumento de la producción fetal, a la disminución de la fracción unida a la albúmina y al descenso de su excreción renal (Damiano et al., 2014).

La asociación entre los niveles elevados de AU y la PE se conoce desde el comienzo del siglo XX. Está bien documentado que en la PE aumenta el AU en relación con los embarazos normales (Corominas et al., 2022). Varios factores explican la hiperuricemia en la PE. En primer lugar, el nivel elevado de AU en la PE es el resultado de una disminución en la eliminación de AU secundaria a una caída desproporcionada en la tasa de filtración glomerular debido a vasoconstrictores como la angiotensina II, la epinefrina y la endotelina (Sánchez-Aranguren, et al., 2014). En segundo lugar, la PE se asocia con una mayor formación de radicales libres y un estrés oxidativo elevado; la producción de AU se combina con la formación de ERO cuando la enzima xantina oxidoreductasa está en forma de oxidasa (Many et al., 1996). Por último, los niveles elevados de ácido láctico en sangre que produce una placenta hipóxica interfieren con la excreción de AU (Nair & Savitha, 2017).

La utilidad del AU como biomarcador de la PE ha sido corroborada por numerosos estudios. El AU se puede utilizar como predictor temprano de la enfermedad (Corominas et al., 2022), como indicador de la gravedad de la PE (Voto et al., 1988) y se ha asociado en numerosas investigaciones a complicaciones y malos resultados durante el embarazo y el parto (Nair & Savitha, 2017; Ugwuanyi et al., 2021); Sin embargo, también existen resultados contradictorios: Pecoraro y Trenti evaluaron la utilidad del AU en la predicción de resultados maternos y perinatales adversos en mujeres embarazadas con presión arterial alta (Pecoraro & Trenti, 2020) concluyendo que no existe evidencia sólida que sugiera que su medición tenga utilidad para este fin; y Chen *et al* no encontraron diferencias en los niveles de AU en el primer y segundo trimestre de mujeres que desarrollaron PE, reportando que solo aumentaron después de la presentación de los síntomas clínicos de la PE (Chen et al., 2016a), llevándolos a cuestionar su papel en el desarrollo de la PE y su utilidad como biomarcador de predicción temprana de esta enfermedad.

En los últimos años ha crecido la evidencia sobre el papel del AU en la fisiopatología de la PE. El AU puede interactuar con citoquinas proinflamatorias y tiene capacidad para promover la inflamación (Mulla et al., 2011); además, es un inhibidor potente de la función endotelial, puede inducir hipertensión sistémica y glomerular, y pasar libremente a la circulación fetal. Se ha encontrado que el AU puede bloquear la proliferación endotelial inducida por VEGF, afectando la angiogénesis fetal y provocando embarazos que terminan con recién nacidos pequeños para la edad gestacional. Por último, el AU también puede bloquear la invasión del trofoblasto *in vitro* (Johnson et al., 2011). Por todo es importante analizar el AU no solo como biomarcador, sino como un factor modificador en la patogénesis de esta enfermedad.

1.3.2 Marcadores angiogénicos

1.3.2.1 Factor de crecimiento placentario

El PIGF es un miembro de la familia del VEGF que se expresa predominantemente en la placenta a lo largo de todas las etapas de la gestación (de Falco, 2012).

El PIGF circulante está notablemente elevado en el embarazo normal, donde promueve el desarrollo y la maduración del sistema vascular placentario, por lo que se define como un factor proangiogénico. Sus concentraciones dependen de la edad gestacional; son bajas en el primer trimestre, aumentan a partir de las semanas 11-12 del embarazo hasta hacer un pico en la semana 30, después de lo cual disminuyen (Saffer et al., 2013).

Mucho antes del inicio de los síntomas y en el momento del diagnóstico de PE los niveles de PIGF sérico están disminuidos. Esta deficiencia de PIGF probablemente se deba a que disminuye

su expresión y a la reducción del PIGF libre por la unión al sFlt-1, que está elevado en las mujeres afectadas (Levine et al., 2004). El PIGF circulante bajo es al mismo tiempo una consecuencia de eventos tempranos anormales en la placentación y un factor que contribuye al crecimiento anormal continuo de la placenta durante la segunda mitad del embarazo (Chau et al., 2017). La hipótesis de que el PIGF es un indicador de placentación anormal está respaldada por la observación de que las mujeres sin PE que dan a luz a bebés pequeños para la edad gestacional también tienen el PIGF bajo al principio del embarazo (Poon et al., 2008).

A pesar de la existencia de diferencias entre los embarazos sin y con PE, el PIGF por sí solo no tiene capacidad como biomarcador para predecir la enfermedad. Se necesita una combinación de este marcador con datos de la historia clínica, hallazgos ecográficos y otros biomarcadores, para crear herramientas predictivas multifactoriales que permiten predecir con un mejor rendimiento la PE. Akolekar y colaboradores desarrollaron un modelo eficaz para la predicción de PE en el primer trimestre (Akolekar et al., 2013) basado en el tiempo de supervivencia para el momento del parto con PE utilizando el teorema de Bayes, en el que combinando información previa de las características maternas con el índice de pulsatilidad de la arteria uterina (UtA-PI), la PAM, la proteína plasmática A asociada al embarazo y el PIGF, consiguieron detectar el 96% de los casos de PE que requirieron parto antes de las 34 semanas y el 54% de todos los casos de PE con una tasa fija de falsos positivos del 10%.

1.3.2.2 Forma soluble de la tirosina quinasa tipo 1

El sFlt-1 es una proteína con propiedades antiangiogénicas. Constituye una variante no asociada a la membrana del receptor 1 del VEGF (Heydarian et al., 2009; Kendall et al., 1996) que se une a los factores angiogénicos VEGF y PIGF con alta afinidad, reduciendo la formación y crecimiento de los vasos sanguíneos. Niveles anormalmente altos de sFlt-1 se han implicado en la disfunción endotelial, la hipertensión y la proteinuria que ocurren en la PE (Maynard et al., 2003).

Las condiciones hipóxicas estimulan la expresión de sFlt-1. En embarazos normales, la placenta se desarrolla en un ambiente hipóxico, lo que lleva a un aumento de 20 veces la expresión de sFlt-1 (Shibata et al., 2005). En pacientes con PE de inicio temprano, se calcula que este aumento es hasta 43 veces más pronunciado y puede ser provocado por condiciones de poca perfusión uterina que conducen a una hipoxia local más grave (Wikström et al., 2007).

En la PE la invasión vascular es insuficiente, lo que reduce la perfusión de la placenta, produciendo hipoxia crónica y restricción del crecimiento intrauterino. La deficiencia de oxígeno da como resultado la producción placentaria de factores antiangiogénicos, como sFlt-1, que

pasan al torrente sanguíneo materno, dando como resultado disfunción endotelial, hipertensión y proteinuria (Heydarian et al., 2009).

Varios estudios confirman que, entre los factores angiogénicos, no solo el PIGF sino también el sFlt-1 mejora sustancialmente la predicción de PE temprana y tardía (Crovetto et al., 2014).

1.3.2.3 Relación sFlt-1/PIGF

El descubrimiento de los factores angiogénicos circulantes en la patogénesis de la PE ha sido un gran avance para el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad. Dado que la patogenia de la PE implica un desequilibrio en los factores angiogénicos, la relación sFlt-1/PIGF es una medida más relevante que la medición de cualquiera de los biomarcadores por separado. Ambas moléculas se producen mayormente en la placenta y son marcadores no invasivos de la salud placentaria, en los que se demostró una relación específica con el inicio y la gravedad de la PE. Entre las mujeres con sospecha de PE, la relación sFlt-1/PIGF tiene un valor predictivo negativo (VPN) muy alto para descartar el desarrollo de PE dentro de los 7 días, resultados maternos adversos dentro de los 14 días o parto con PE dentro de los 14 días (Verlohren et al., 2022).

Zeisler y colaboradores desarrollaron un estudio prospectivo, multicéntrico y observacional para determinar y validar una relación sFlt-1/PIGF sérica predictiva de la ausencia o presencia de PE a corto plazo en mujeres con embarazos de feto único en las que se sospechaba PE desde las 24-36⁺⁶ semanas de gestación (Zeisler et al., 2016). En una cohorte de 500 mujeres identificaron un valor de corte de 38 en la relación sFlt-1/PIGF con un importante valor predictivo. En un estudio de validación posterior entre 550 mujeres adicionales, una relación sFlt-1/PIGF de 38 o inferior tuvo un VPN (es decir, sin PE en la semana siguiente) del 99,3% (IC del 95%, 97,9 - 99,9), con una sensibilidad del 80,0% (IC del 95%, 51,9 - 95,7) y una especificidad del 78,3% (IC del 95%, 74,6 - 81,7). El valor predictivo positivo (VPP) de una relación sFlt-1/PIGF superior a 38 para un diagnóstico de PE dentro de las 4 semanas fue del 36,7% (IC del 95%, 28,4 - 45,7), con una sensibilidad del 66,2% (IC del 95%, 54,0 - 77,0) y 83,1% de especificidad (IC del 95%, 79,4 - 86,3), llegando a la conclusión de que se podía usar una relación sFlt-1/PIGF de 38 o menos para predecir la ausencia a corto plazo de PE en mujeres en las que se sospechaba clínicamente el síndrome.

Estos biomarcadores se han incorporado en modelos predictivos de PE, aumentando considerablemente la sensibilidad y especificidad del cribado de la enfermedad en diferentes momentos de la gestación.

1.3.3 Biomarcadores de inflamación

Durante el embarazo se produce una inflamación local de la placenta y una respuesta inflamatoria sistémica moderada que se manifiesta mediante la elevación de diversas citoquinas en el suero materno. En condiciones normales se sintetizan moléculas antiinflamatorias que permiten mantener un equilibrio en este proceso. En la PE, la incorrecta invasión del trofoblasto conduce a una isquemia placentaria que exagera la liberación de citoquinas inflamatorias, como la IL-6, que contribuyen a la inflamación sistémica y a la disfunción endotelial que caracterizan a la enfermedad (Serrano et al., 2020). Estas respuestas proinflamatorias aumentadas y no controladas junto a un menor nivel de citoquinas antiinflamatorias reguladoras son factores importantes que contribuyen a la patogenia de la PE. Se ha demostrado que el perfil de citoquinas maternas difiere entre el embarazo normotenso y la PE, y que existen diferencias en las concentraciones de citoquinas entre las mujeres sanas y aquellas que desarrollan PE más tarde, lo que sugiere que estas pueden ser predictoras potenciales de PE y de otras complicaciones del embarazo (Spence et al., 2021).

1.3.3.1 Interleuquina 6

La IL-6 fue identificada originalmente por Kishimoto y colaboradores como una proteína soluble activadora de la diferenciación de linfocitos B en células productoras de anticuerpos (Kishimoto, 1976). Es secretada por macrófagos, monocitos, células T, células endoteliales y fibroblastos, donde se induce su liberación por la IL-1 y se incrementa en respuesta al TNF- α . Es una citoquina con actividad antiinflamatoria y proinflamatoria que interviene en la regulación de la respuesta inmunológica, en la hematopoyesis y en las reacciones de fase aguda.

La IL-6 produce sus efectos biológicos a través del receptor de superficie celular IL-6R α (CD126) y del componente transductor de señales gp130, que activan las vías JAK (del acrónimo: Just Another Kinase) y STAT (proteínas transductoras de señal y activadoras de la transcripción). Ambos receptores, en su forma soluble, se unen a la IL-6, pero mientras que el IL-6R α soluble actúa como agonista de la IL-6, la gp130 soluble antagoniza la acción de la IL-6. Además, la gp130 se expresa casi de forma ubicua, mientras que la expresión de IL-6R α está restringida a hepatocitos y leucocitos (Prins et al., 2012). El tropismo de los receptores, y los efectos contrapuestos de su interacción con la IL-6, son los responsables de la multifuncionalidad y la complejidad de los mecanismos en los que interviene la IL-6.

La IL-6 se expresa ampliamente en el aparato reproductor femenino y en los tejidos gestacionales, donde ejerce funciones reguladoras en la implantación del embrión y el desarrollo de la placenta, así como en las adaptaciones inmunitarias necesarias para tolerar el embarazo (Prins et al., 2012).

Muchos estudios han descrito una asociación entre niveles alterados de IL-6 sérica y PE, sobre todo en el tercer trimestre de embarazo (Freeman et al., 2004; Greer et al., 1994; Kupferminc et al., 1996; Ma et al., 2019; Vince et al., 1995). Se plantea que su aumento puede contribuir al daño endotelial que se produce en la PE y que estos niveles más altos pueden deberse, en parte, a una mayor síntesis de esta citoquina por los monocitos circulantes (Luppi & DeLoia, 2006). La IL-6 también puede influir en la progresión de la PE a través de la activación vascular de las células endoteliales después que fagocitan restos del trofoblasto necrótico. Esta activación por niveles elevados de IL-6 puede propagarse a otros lechos vasculares sin necesidad de contacto directo con restos de trofoblasto desprendidos por la placenta, contribuyendo de esta forma a la activación sistémica del endotelio, que es un sello distintivo de la PE (Chen et al., 2009). La producción alterada de IL-6 se ha asociado con la expresión de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión de células vasculares 1 (VCAM-1), que proporcionan un fenotipo adhesivo al endotelio que conduce a su daño (Pober & Sessa, 2007).

Existe un interés creciente en el papel de las citoquinas como biomarcadores tempranos de la PE, aunque no hay consenso sobre su utilidad. Mientras que varias publicaciones han reportado un aumento de IL-6 en el suero materno de mujeres que más tarde desarrollaron PE (Freeman et al., 2004; Taylor et al., 2016), otros grupos no han encontrado diferencias significativas en relación con embarazos transcurridos con normalidad (Tangeras et al., 2015). El aumento de los niveles séricos maternos de IL-6 también se ha asociado con el momento de aparición de la PE y su gravedad (Xiao et al., 2012).

Una de las complicaciones más graves observadas en mujeres con PE es el desarrollo de ECV en etapas posteriores de la vida. Además de estar involucrada en la PE, la IL-6 desempeña un papel clave en la fisiopatología de las ECV (Kanda & Takahashi, 2004), reforzando el planteamiento de que ambas entidades guardan una estrecha relación. Freeman y colaboradores estudiaron el estatus inflamatorio 20 años después del parto en mujeres que tuvieron PE (Freeman et al., 2004), demostrando un aumento de la proporción entre IL-6 e IL-10 al compararlas con mujeres que tuvieron embarazos sanos de la misma antigüedad, permitiéndoles relacionar la PE con cambios en el estatus inflamatorio a largo plazo.

1.3.3.2 Factor de diferenciación del crecimiento 15

El GDF-15, también llamado citoquina 1 inhibidora de macrófagos, es un miembro divergente de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (Bootcov et al., 1997). Su expresión fisiológica es apenas detectable en la mayoría de los tejidos somáticos humanos, sin embargo, puede inducirse en condiciones de estrés. Se incrementa por la acción de varias proteínas inflamatorias o relacionadas con el estrés, como la IL-1 β , el TNF- α , la IL-2 y el factor estimulante de colonias de macrófagos 1, lo que sugiere una regulación compleja y específica (Adela & Banerjee, 2015).

Los niveles elevados de GDF-15 están relacionados principalmente con condiciones patológicas que incluyen inflamación, hipoxia, lesión y reparación tisular, y cáncer. Por lo tanto, GDF-15 ha sido ampliamente explorado como biomarcador para el pronóstico de varias enfermedades (Wischhusen et al., 2020). Las funciones biológicas del GDF-15 aún no se comprenden bien; se le atribuyen papeles diferentes y, a veces, contrapuestos, por lo que exhibe un patrón intrincado de funciones beneficiosas y perjudiciales. Aun así, se plantea que la molécula es esencial en la regulación de las adaptaciones endoteliales después del daño vascular (Rochette et al., 2020).

Los tipos de células en las se expresa el GDF-15 incluyen cardiomiocitos, adipocitos, macrófagos, células de músculo liso vascular y células endoteliales, tanto en tejidos sanos como enfermos (Tsai et al., 2018). El GDF-15 es abundante en la placenta (Yokoyama-Kobayashi et al., 1997).

Los niveles de GDF-15 aumentan al inicio del embarazo y alcanzan su concentración más alta al comienzo del tercer trimestre (Moore et al., 2000). Se plantea que el trofoblasto placentario es una fuente importante del GDF-15 presente en el suero materno y en el líquido amniótico y que juega un papel importante en la supervivencia fetal al suprimir la producción de citoquinas proinflamatorias derivadas de la madre dentro del útero.

La medición de GDF-15 en el suero de mujeres con PE ha producido resultados contradictorios. Mientras que algunos grupos han reportado incrementos del marcador (Cruickshank et al., 2021; Sugulle et al., 2009; Temel-Yuksel et al., 2018), otros no han encontrado cambios (Marjono et al., 2003), o han informado disminuciones de GDF-15 en la PE (Chen et al., 2016b). Recientemente se ha publicado que el GDF-15 está aumentado antes del desarrollo de la PE y que tiene potencial para mejorar la sensibilidad de la relación sFlt-1/PIGF (Cruickshank et al., 2021), por lo que puede tener valor como biomarcador clínico.

En la ECV el GDF-15 es un biomarcador predictivo establecido (Rochette et al., 2020). Su concentración sérica aumenta en la arteriopatía coronaria estable, en el síndrome coronario

agudo, en la insuficiencia cardíaca y en la hipertensión pulmonar, y lo hace en función de la severidad de la enfermedad. Existe una fuerte evidencia que documenta la asociación de altos niveles de GDF-15 con la ECV en el futuro (Wollert et al., 2017).

1.3.3.3 Proteína C reactiva

La PCR fue descubierta en 1930 por Tillett y Francis (Tillett & Francis, 1930) cuando identificaron una sustancia en el suero de pacientes con neumonía aguda que precipitaba al entrar en contacto con el polisacárido C de la pared del neumococo. Esta proteína pertenece a la familia de las pentraxinas, posee una alta conservación filogenética y está formada por cinco subunidades globulares no glicosiladas idénticas, asociadas de forma no covalente y dispuestas en un patrón cíclico simétrico alrededor de un poro central, lo que determina una configuración pentamérica, discoidal y aplanada (Thompson et al., 1999).

La PCR se sintetiza en el hígado, forma parte de los reactantes de fase aguda y su concentración aumenta dramáticamente durante los procesos inflamatorios que ocurren en el organismo. La producción de PCR en los hepatocitos está regulada principalmente a nivel transcripcional por la IL-6, un efecto que puede ser potenciado por la IL-1 β . El ligando más importante de la PCR es la fosfatidilcolina de las células bacterianas, fúngicas y eucariotas, particularmente si proviene de células necróticas o apoptóticas. Una vez que se establece la unión es capaz de fijar el fragmento C1q, activando la vía clásica del sistema del complemento (Salazar et al., 2014).

La PCR existe en dos formas conformacionales distintas: la PCR pentamérica nativa y la PCR monomérica, que pueden unirse a distintos receptores y balsas de lípidos y exhibir diferentes propiedades funcionales. La PCR pentamérica tiene capacidad proinflamatoria o antiinflamatorias dependiendo del contexto, mientras que la PCR monomérica ejerce potentes acciones proinflamatorias sobre las células endoteliales, las células progenitoras endoteliales, los leucocitos y las plaquetas, y puede amplificar la respuesta inflamatoria (Wu et al., 2015). La disociación de la PCR pentamérica en la PCR monomérica proinflamatoria podría vincular directamente a la PCR con la inflamación.

La PCR se utiliza en la detección y evaluación de enfermedades inflamatorias, infecciosas y daños tisulares, por lo que no es un marcador específico; por esta razón sus valores deben interpretarse teniendo en cuenta la historia y el contexto clínico en que se determina. Aunque la PCR se considera un importante regulador del sistema inmunitario innato y un mediador fundamental de la respuesta de fase aguda, también se ha asociado con procesos inflamatorios crónicos, como ciertas afecciones reumatológicas, el cáncer y la ECV (Dhingra et al., 2007). La

PCR es el biomarcador que mejor correlaciona con eventos cardiovasculares futuros y puede estar levemente elevado durante la etapa temprana de la inflamación vascular del miocardio, por lo que es considerado un predictor fiable del riesgo (Luan & Yao, 2018).

Los valores de PCR en embarazos normales parecen ser más altos que los estandarizados para mujeres no embarazadas, y se elevan más durante el trabajo de parto. En la PE se produce una respuesta inflamatoria que conduce a un incremento aún mayor de la PCR. Varias publicaciones dan cuenta de aumentos significativos de esta proteína en la PE (Chen et al., 2018; Mihi et al., 2008) y lo señalan como un marcador de gravedad del síndrome (Chen et al., 2018; Hwang et al., 2007; Mihi et al., 2008).

Sobre la utilidad de la PCR en la predicción de la PE existen resultados contradictorios. En una revisión sistemática realizada por Hamadeh *et al* se encontró una asociación positiva entre los niveles de PCR y el desarrollo de PE en 18 estudios (Hamadeh et al., 2021), concluyendo que era un biomarcador rentable y prometedor que podría utilizarse en la predicción de la PE y en la toma de decisiones, como el inicio del tratamiento con aspirina en dosis baja en embarazos de bajo riesgo. Sin embargo, otros estudios no la consideraron adecuada para la predicción del riesgo de desarrollar la enfermedad (Savvidou et al., 2002; Teran et al., 2005).

Por otro lado, hay evidencias de la asociación entre los desórdenes hipertensivos del embarazo y niveles alterados de PCR en etapas posteriores de la vida; Brown y colaboradores demostraron que una historia de hipertensión en el embarazo guardaba relación con niveles persistentemente elevados de PCR más adelante en la vida, independientemente de los factores de riesgo de ECV tradicionales y del IMC (Brown et al., 2013), sugiriendo que la PCR elevada podía reflejar un estado inflamatorio exacerbado con mayor riesgo de desarrollo de ECV.

1.3.4 Biomarcadores de función endotelial

1.3.4.1 Vesículas extracelulares

Las vesículas extracelulares (VE) se encuentran en todos los fluidos biológicos, transportan y transfieren moléculas reguladoras como microARN, ARNm, proteínas, metabolitos, etc. Aprovechando su pequeño tamaño, pueden cruzar las barreras físicas y fisiológicas del organismo con bastante facilidad, desempeñando así un papel vital en la comunicación intercelular. Todos los organismos eucariotas y procariotas secretan VE. Las VE contienen proteínas de la membrana plasmática y proteínas citosólicas, ácidos nucleicos, lípidos, etc. (Das & Kale, 2020), que provienen de las células que las originan.

Las VE pueden subcategorizarse en función de propiedades fisicoquímicas, como la densidad, el perfil lipídico, el tamaño, la morfología, los biomarcadores proteicos, las características moleculares y los mecanismos de secreción implicados en su formación (Yáñez-Mó et al., 2015).

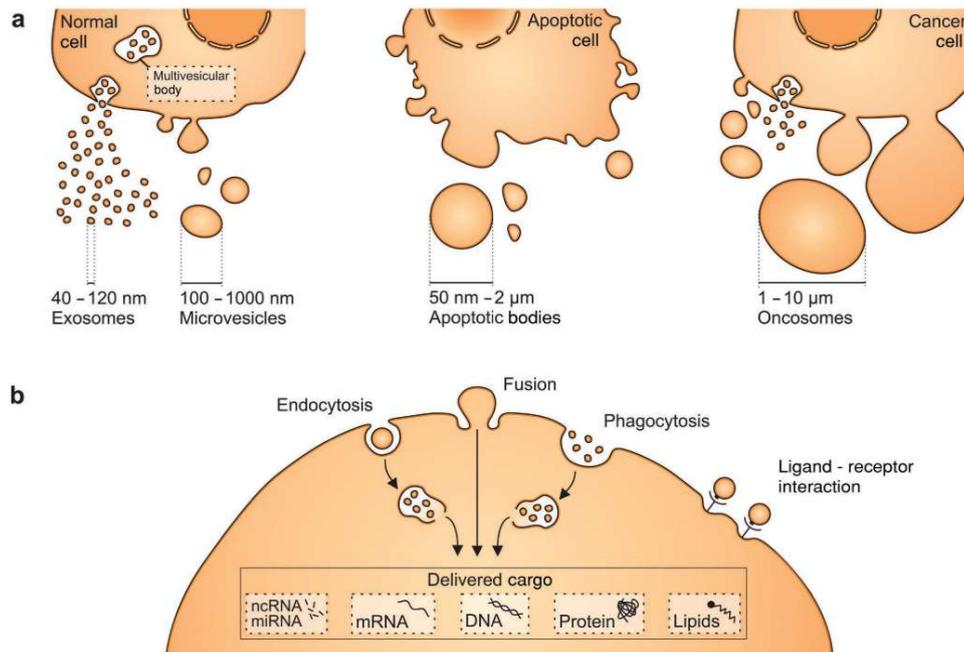
Según la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV), las VE pueden clasificarse en tres grupos principales: (i) exosomas, (ii) MVs y (iii) cuerpos apoptóticos (CAs), también llamados vesículas apoptóticas (Théry et al., 2018). Sin embargo, todavía no se dispone de biomarcadores específicos para categorizar los distintos tipos de VE, aunque su formación implique rutas diferentes (Doyle & Wang, 2019).

1.3.4.1.1 Exosomas

Los exosomas tienen entre 40 y 120 nm de diámetro, se forman por invaginación de la membrana limitante de los endosomas tempranos, que maduran en cuerpos multivesiculares y se secretan al espacio extracelular. Contienen diferentes tipos de proteínas, ARN, componentes lipídicos, etc. En un principio se pensó que eran una fuente de vertido celular o una forma en que las células se deshacían de material innecesario, pero más tarde se descubrió que los exosomas participan en la comunicación intercelular, en el mantenimiento de las células y en la progresión de los tumores. Los exosomas reflejan el estado fisiológico y el origen celular de sus células progenitoras, que se imprimen en ellos mediante microARN. Esto hace que los exosomas sean útiles como biomarcadores de varias enfermedades, porque las moléculas que contienen caracterizan condiciones definidas y pueden reflejar el estado de varios procesos celulares (Zaborowski et al., 2015).

Los exosomas se aíslan generalmente mediante ultracentrifugación de los fluidos corporales o de sobrenadantes de cultivo. Para su caracterización se realizan dos tipos de análisis diferentes: el análisis físico y el químico/bioquímico/composicional. El análisis físico, que permite conocer el tamaño y/o la concentración de las partículas, se lleva a cabo mediante el análisis de seguimiento de nanopartículas, la dispersión de luz dinámica, la microscopía electrónica o la detección de pulso resistivo sintonizable. El análisis químico/bioquímico/composicional se realiza normalmente mediante tinción, inmunoblot o análisis proteómico, y proporciona información sobre el contenido de las vesículas aisladas (Doyle & Wang, 2019).

Figura 1.4
Diferentes tipos de vesículas extracelulares



Nota: (a) Los exosomas y las microvesículas son producidos por células normales y enfermas. La apoptosis desencadena la liberación de cuerpos apoptóticos. Algunas células cancerosas generan vesículas extracelulares de gran tamaño, denominadas oncosomas. (b) Las vesículas extracelulares pueden ser captadas por diferentes mecanismos, como la endocitosis, la fusión de membranas o la fagocitosis. Las vesículas extracelulares entregan ácidos nucleicos, proteínas y lípidos que pueden ser funcionales en las células receptoras. Las interacciones ligando-receptor en la superficie celular también pueden producir efectos biológicos y ayudar a dirigir las vesículas a tipos celulares específicos. Abreviaturas: nm, nanómetro; µm, micrómetro. Tomado y modificado de "Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study" (Zaborowski et al., 2015).

1.3.4.1.2 Microvesículas

Las MVs se originan directamente de la membrana plasmática, tienen un tamaño que va de 100 nm a 1 micrómetro (µm) y contienen material citoplasmático (Zaborowski et al., 2015). En 1967, el profesor Wolf las describió por primera vez (Wolf, 1967). La ruta de formación de las MVs no se conoce bien, pero se cree que requiere componentes del citoesqueleto, como la actina y los microtúbulos, junto con motores moleculares (quinasas y miosinas) y maquinaria de fusión (receptores y factores de unión vesicular) (Cai et al., 2007). Este proceso implica una interacción dinámica entre la redistribución de lípidos y la contracción de proteínas del citoesqueleto, donde intervienen flipasas y flopasas que permiten la translocación de fosfolípidos, la pérdida de la asimetría de la membrana y la característica exposición de fosfatidilserina en la superficie de las MVs; por esta razón, las MVs pueden identificarse por la positividad a la anexina V, que es una molécula capaz de unirse a la fosfatidilserina. A continuación, la liberación de las MVs se regula e induce eficazmente tras la activación de receptores de la superficie celular o por apoptosis y el consiguiente aumento de la concentración de calcio iónico intracelular (Cufaro et al., 2019).

Las MVs pueden transportar moléculas bioactivas entre las células que las originan y las receptoras, efectuando así la comunicación intercelular. Proteínas conocidas por agruparse en la superficie de la membrana plasmática, como las tetraspaninas, proteínas relacionadas con el citoesqueleto, proteínas de choque térmico, integrinas y proteínas modificadas postraduccionalmente por glicosilación o fosforilación, se suman a la carga molecular que transportan las MVs (Badimon et al., 2017). Curiosamente, las proteínas de unión a glucanos de la superficie de las MVs pueden ser un factor clave para entender cómo se dirigen a otras células e interactúan con ellas. (Doyle & Wang, 2019). Las MVs también desempeñan un papel relevante en la comunicación intercelular mediante la transferencia de ARNm y microARN (Marques et al., 2012). El número de MVs producidas depende tanto del estado fisiológico y del microambiente de la célula donante como del que tiene la célula receptora (Zaborowski et al., 2015).

Como mediadores de la comunicación intercelular, las MVs pueden participar en la transducción de señales, así como en la modulación y regulación inmunológica. La singularidad de las MVs es que tienen la capacidad de empaquetar carga activa (proteínas, ácidos nucleicos y lípidos) y entregarla a otra célula, vecina o distante, y alterar las funciones de la célula receptora (Zaborowski et al., 2015). Al igual que los exosomas, las MVs también pueden ser utilizadas como biomarcadores para diagnosticar diferentes condiciones fisiopatológicas durante el desarrollo y la progresión de enfermedades humanas (György et al., 2011).

Las MVs juegan un papel relevante en la trombosis, la inflamación, así como en la inducción de cambios endoteliales y en la diferenciación celular. Tanto la inflamación como la trombosis pueden estar orquestadas por las interacciones entre componentes de la sangre, como los leucocitos y las plaquetas, con las células vasculares, endoteliales y musculares lisas, que, durante la activación o la apoptosis, pueden liberar MVs. En la sangre de individuos sanos, pero también en pacientes con estados patológicos como la sepsis, la PE, la enfermedad de Crohn y la diabetes están presentes las MVs, en cantidades diferentes y con características específicas (Meziani et al., 2008), lo que refuerza la idea de que pueden desempeñar un papel en estas enfermedades.

Las MVs son ricas en fosfolípidos y pueden derivarse de células endoteliales, eritrocitos, plaquetas y leucocitos. Aunque están presentes en la sangre periférica de individuos sanos inducidas tanto por la activación homeostática como por la apoptosis, se puede observar un aumento significativo en ciertas condiciones patológicas, como las enfermedades autoinmunes, la diabetes, el cáncer y las enfermedades infecciosas (Chironi et al., 2009). La composición de proteínas de las MVs determina sus efectos biológicos, que varían en función de la célula de la

que proceden y del tipo de estímulo que interviene en su formación. Las proteínas de membrana proporcionadas por las células específicas que las originan pueden utilizarse para estudiar su origen exacto.

En las últimas décadas se ha producido un fuerte aumento del número de publicaciones científicas que describen las funciones fisiológicas y patológicas de las VE y que abordan su utilidad como biomarcador para el diagnóstico y pronóstico de varias enfermedades. Sin embargo, el potencial de las MVs se ha visto limitado por la complejidad, la falta de validación y de estandarización de los métodos utilizados para aislarlas, cuantificarlas e identificarlas (Dey-Hazra et al., 2010; Gradziuk & Radziwon, 2017; Inglis et al., 2015; Jayachandran et al., 2012), una cuestión crítica que dificulta la utilización generalizada y rutinaria de la medición de MVs en la práctica asistencial. En 2018 la ISEV actualizó sus directrices de publicación de resultados a través de un documento en el que fue definida y especificada la información mínima que debe aportarse en los estudios de VE (Théry et al., 2018). En el texto se recogen 4 puntos centrales: (a) la aceptación del término "Vesícula extracelular" como el genérico preferido para denominar las MVs en la literatura, y que deben definirse según sus características físicas y bioquímicas y/o las condiciones/fuentes; (b) que existe un número creciente de técnicas de separación y de combinaciones de estas técnicas que equilibran de forma diversa la recuperación y la especificidad. En todos los casos, el procedimiento de separación y/o aislamiento de VE debe ser reportado en detalle, para permitir su reproducción; (c) para la caracterización de las VE los marcadores proteicos y lipídicos siguen siendo muy útiles; y (d) las funciones asociadas específicamente con las MVs liberadas de la célula deben demostrarse sin contacto entre las células donantes y las receptoras.

1.3.4.1.3 Cuerpos apoptóticos y oncosomas

Los CAs son vesículas de membrana liberadas al medio extracelular durante las últimas etapas de la muerte celular por apoptosis. Los CAs tienen un diámetro de 1-5 μm , forma heterogénea y contienen orgánulos intactos, histonas y ADN genómico en su interior. En general, los CAs se liberan por un desprendimiento de la membrana que requiere la fosforilación de la cadena ligera de la miosina y la activación de la caspasa-3, una de las enzimas clave de la apoptosis (Cufaro et al., 2019).

La protrusión de la membrana citoplasmática de las células malignas también puede dar lugar a grandes VE denominadas oncosomas, que tienen un diámetro de entre 1 y 10 μm y, por lo tanto, son mucho más grandes que la mayoría de VE (Zaborowski et al., 2015). Su formación y

desprendimiento se ven favorecidos por la pérdida de reguladores citoesqueléticos que inducen la transición de un fenotipo mesenquimal a otro más rápido, invasivo y metastásico (fenotipo ameboide) y por este motivo pueden asociarse a la progresión tumoral. De hecho, sólo las células tumorales liberan una cantidad cuantificable de oncosomas y esto parece correlacionarse con la agresividad del tumor, mientras que su detección en las células benignas es insignificante (Cufaro et al., 2019). Su contenido de ADN es significativamente más abundante que el de otras VE lo que demuestra que el ADN derivado de las VE grandes refleja la composición genómica de las células tumorales de origen. También se han identificado ARNm y microARN dentro de los oncosomas, lo que sugiere que, al ser internalizadas por las células receptoras, pueden regular la expresión génica y aumentar la migración de los fibroblastos (Becker et al., 2016; Ciardiello et al., 2016).

1.3.4.1.4 Microvesículas en el embarazo y la preeclampsia

Las MVs desempeñan un papel dinámico en la comunicación entre componentes del sistema vascular materno (el endotelio vascular, los leucocitos circulantes y las plaquetas) y la placenta, contribuyendo así al desarrollo del embarazo normal. Las MVs aumentan en la gestación debido a la adaptación anatómica y funcional que ocurre en el sistema vascular de la madre para responder a las nuevas demandas fisiológicas asociadas a esta condición (Marques et al., 2012). Redman y Sargent revisaron estudios de MVs realizados en embarazadas en los que se detectó la presencia no sólo de MVs derivadas de plaquetas, endotelio y leucocitos, sino también de sincitiotrofoblasto. Ellos encontraron en la mayoría de los artículos publicados que el aumento de las MVs era especialmente importante en las mujeres embarazadas con PE, donde existía una amplia activación en las células endoteliales, de los leucocitos y del sistema de la coagulación (Figura 1.5), que daba como resultado una mayor cantidad de MVs derivadas de leucocitos, endotelio y de sincitiotrofoblasto, mientras que las MVs producidas por las plaquetas estaban disminuidas (Redman & Sargent, 2008).

Las plaquetas son la fuente más importante de MVs en la sangre de las mujeres sanas no embarazadas. En comparación con estas, las gestantes normotensas tienen concentraciones menores de MVs de plaquetas (MVs-pla) y esta reducción es aún mayor en mujeres con PE (Dragovic et al., 2013). Se han propuesto tres teorías diferentes para explicar las menores concentraciones de MVs-pla en la PE: (a) un menor recuento de plaquetas en la PE puede generar menores concentraciones de MVs-pla; (b) menores MVs-pla circulantes pueden deberse en parte a un mayor atrapamiento o participación de las MVs-pla en la generación de trombina

y la formación de coágulos de fibrina; y (c) (3) la interacción y unión de las MVs-pla con los leucocitos puede dar lugar a menores cantidades en el compartimiento vascular (Gilani et al., 2016).

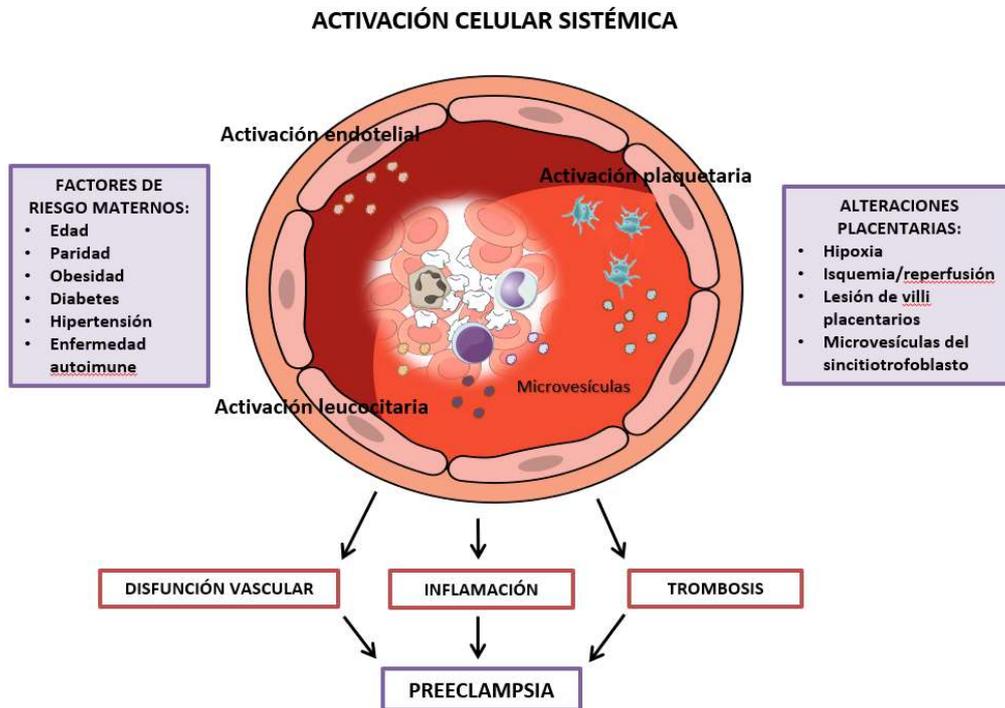
Por el contrario, el recuento de leucocitos y las concentraciones de MVs de leucocitos (MVs-leu) son mayores en las mujeres embarazadas normotensas que en aquellas que no atraviesan una gestación, y lo son aún más en las gestantes con PE, donde existe un estado inflamatorio exacerbado. Los leucocitos en la PE producen mayores niveles de determinados subconjuntos de MVs, como las MVs de monocitos (MVs-mon), las de neutrófilos, etc., que reflejan el estado de activación en que se encuentran las células que las originan (Lok et al., 2009).

Debido a la disminución de la resistencia vascular periférica, al estado del endotelio y a la unión a células sanguíneas circulantes, la concentración MVs de células endoteliales (MVs-end) en las mujeres con embarazos normales es menor que en aquellas que no lo están (Gilani et al., 2016). Sin embargo, en las mujeres con PE la cantidad de MVs-end es mayor, indicando activación de las células endoteliales; se sabe que existe una asociación entre el aumento de la concentración de MVs-end y la disfunción vascular (Petrozella et al., 2012). Por otro lado, se ha demostrado que las MVs-end tienen características diferentes según el estímulo de señalización y los procesos o condiciones trombóticos e inflamatorios que inducen su liberación. Las MVs de células endoteliales activadas (MVs-ena) o proinflamatorias pueden ser producidas por las células endoteliales en respuesta a estímulos o estados proinflamatorios (Gilani et al., 2016). Por lo tanto, la inflamación en la PE puede aumentar la concentración circulante de MVs proinflamatorias derivadas del endotelio.

Las MVs de sincitiotrofoblasto (MVs-sct) provienen de células apoptóticas o activadas que están directamente expuestas a la circulación materna. Estas vesículas contienen un número sustancial y variable de moléculas biológicamente activas que pueden interactuar con las células endoteliales, las plaquetas y los leucocitos de la circulación materna. Estas interacciones son importantes para la fisiología materna y la comunicación materno-fetal durante el embarazo normal. En la PE los MVs-sct se liberan en cantidades significativamente mayores y tienen actividad proinflamatoria, antiangiogénica y procoagulante, un mecanismo que las implica en la inflamación sistémica materna, en la disfunción endotelial y en la activación del sistema de la coagulación que caracteriza a este trastorno (Tannetta et al., 2017).

Figura 1.5

Papel de las microvesículas en la patogenia de la preeclampsia



1.3.4.2 Dimetil arginina asimétrica

El ADMA, un análogo de la L-arginina, es un metabolito endógeno que inhibe competitivamente las tres isoformas de la enzima óxido nítrico sintasa. Altos niveles de ADMA bloquean la síntesis de NO y disminuyen la captación celular de L-arginina, por lo que se reconoce como un biomarcador de disfunción endotelial. En el embarazo normal los niveles maternos de ADMA se reducen en comparación con los de mujeres no embarazadas. Los niveles más bajos de ADMA se dan en el primer trimestre, coincidiendo con el descenso de la presión arterial, para luego aumentar a lo largo del embarazo (Holden et al., 1998). Los niveles de ADMA están elevados en mujeres con alto riesgo de PE en comparación con los de mujeres embarazadas sanas de la misma edad gestacional. En embarazos complicados por PE los niveles de ADMA son significativamente más altos que en el grupo control de la misma edad gestacional (Holden et al., 1998; Laskowska et al., 2012; López et al., 2015) y una mayor concentración de ADMA en pacientes con PE de inicio temprano se relaciona con la gravedad de la PE (Tashie et al., 2020). Se ha descrito ampliamente una elevación de los niveles de ADMA en pacientes con diversas afecciones cardiovasculares y metabólicas, como hipercolesterolemia, aterosclerosis, hipertensión, insuficiencia cardíaca o renal crónica, diabetes mellitus, accidente cerebrovascular

e hiperhomocisteinemia (Sibal et al., 2010). Se ha demostrado que el ADMA aumenta la resistencia vascular sistémica en humanos, como un inhibidor endógeno de la eNOS (Dymara-Konopka & Laskowska, 2019).

1.3.5 Biomarcadores de dislipemia

En el embarazo ocurren múltiples cambios fisiológicos que producen alteraciones del perfil lipídico. En general, estos cambios permiten que el feto reciba los nutrientes adecuados y reflejan el aumento de la resistencia a la insulina en la madre. Inicialmente, hay una fase anabólica con un aumento de la síntesis de lípidos y almacenamiento de grasa para responder al aumento de las necesidades energéticas del feto al final del embarazo. Durante el tercer trimestre, la fisiología de los lípidos pasa a una fase catabólica neta con una reducción de los depósitos de grasa (Grimes & Wild, 2018).

Numerosos estudios han relacionado los trastornos en la concentración de colesterol y triglicéridos (dislipidemia) en el embarazo con resultados adversos, que afectan tanto la salud materna como la fetal. La dislipidemia al principio del embarazo se ha asociado a un mayor riesgo de PE (Enquobahrie et al., 2004). Existen implicaciones directas de la dislipidemia en los resultados perinatales, así como intrincadas relaciones entre la dislipidemia y la morbilidad intrauterina.

En las mujeres preeclámpticas los niveles de triglicéridos, de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL), de colesterol total y de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) son mayores que en los embarazos normales, pero el nivel de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (HDL) es menor (Tesfa et al., 2020). Varios trabajos han estudiado la relación entre los niveles de triglicéridos y el posterior desarrollo de PE; la gran mayoría de estas investigaciones coincide en la existencia de diferencias significativas en los niveles de triglicéridos a favor de las mujeres preeclámpticas en comparación con las gestantes normotensas; un metaanálisis compuesto por 24 estudios de casos y controles confirmó que existía una fuerte asociación entre la hipertrigliceridemia y el riesgo de PE (Gallos et al., 2013). Aunque no todas las publicaciones van en la misma dirección; algunos investigadores no han encontrado diferencias significativas entre el perfil lipídico de mujeres con PE y el de gestantes sanas (Punthumapol & Kittichotpanich, 2008).

El estrés oxidativo provoca cambios bioquímicos en los lípidos y las proteínas que pueden inducir daños en el endotelio vascular y crear complicaciones en el embarazo (León et al., 2017). En la PE el estrés oxidativo favorece la producción de dienos conjugados, lipohidroperóxidos y

malondialdehído, que son productos de la oxidación lipídica que afectan la función endotelial. El colesterol-LDL es muy susceptible a la oxidación por radicales libres; una vez oxidado puede inducir cambios funcionales de las células endoteliales al estimular la expresión de moléculas de adhesión celular, que tienen efectos citotóxicos sobre las células endoteliales vasculares, son quimioatrayentes para los monocitos e inducen la secreción de mediadores proinflamatorios por parte de los macrófagos. El malondialdehído también se une al colesterol-LDL e impide su reconocimiento por el receptor correspondiente. El colesterol-HDL, que es un agente protector de la función vascular porque contienen apolipoproteína AI (ApoAI), también es susceptible de oxidación y da lugar a lipoproteínas disfuncionales.

Como la dislipemia es un importante factor de riesgo de ECV y también de la PE (Lisowska et al., 2018), es posible que aquellos embarazos que transcurren con dislipemia y riesgo de PE tengan mayor probabilidad de desarrollar ECV a largo plazo. Se necesitan más estudios para explorar esta asociación, por el potencial que tiene en la prevención y el seguimiento de eventos cardiovasculares adversos en estas mujeres.

1.4 Preeclampsia y enfermedad cardiovascular

Las mujeres con antecedentes de PE tienen un mayor riesgo de desarrollo de ECV, cerebrovascular y arterial periférica en el futuro, así como de mortalidad cardiovascular (McDonald et al., 2008). Una gran proporción de las mujeres que experimentan PE tienen factores de riesgo cardiovascular importantes en la quinta década de vida, en comparación con controles sanos (Bokslag et al., 2017). Varias revisiones sistemáticas han revelado las consecuencias a largo plazo de la PE y han cuantificado el riesgo de ECV después del embarazo en madres con PE y en sus hijos (Thilaganathan & Kalafat, 2019; Turbeville & Sasser, 2020). La PE y el alto riesgo cardiovascular comparten varios mecanismos fisiopatológicos, como el estrés oxidativo y el inflamatorio, el desequilibrio angiogénico y la disfunción endotelial. Aunque los mecanismos precisos siguen sin estar claros, estudios recientes revelan la persistencia de la disfunción endotelial y vascular materna después del parto (Tomimatsu et al., 2017).

Aunque un porcentaje del riesgo de estas consecuencias posparto puede residir en los factores de riesgo compartidos entre la PE y la ECV, otros mecanismos específicos de la enfermedad pueden explicar este riesgo a largo plazo, entre las que destacan las perturbaciones posparto de vías fisiológicas, que incluyen la sensibilidad al sodio y a la angiotensina II, una mayor activación simpática, la inflamación persistente y el desequilibrio angiogénico. Entre los resultados conseguidos en este activo campo de investigación se cuentan el hallazgo de respuestas

barorreceptoras desadaptativas relacionadas con un volumen plasmático persistentemente reducido en mujeres después de un embarazo con PE, el aumento continuo de citocinas proinflamatorias, el aumento exacerbado en los componentes de la reacción de fase aguda y la disfunción endotelial de 5-8 años después del embarazo preecláptico, con anomalías en factores endoteliales y antiangiogénicos circulantes que persisten por mucho más tiempo después del parto (Turbeville & Sasser, 2020).

Se han publicado varios trabajos basados en la evaluación prospectiva de biomarcadores angiogénicos, de inflamación y de disfunción endotelial en mujeres con PE para determinar si son capaces de distinguir a las mujeres que posteriormente desarrollan hipertensión y ECV de las que no lo hacen, entre los cuales el sFlt-1, el PIGF, la IL-6, la relación IL-6/IL-10, la troponina I cardíaca, la activina A, el antígeno leucocitario humano-G soluble, la proteína plasmática A asociada al embarazo y la norepinefrina, han mostrado potencial y son biomarcadores candidatos interesantes para la estratificación del riesgo de ECV a largo plazo en esta población (Bovee et al., 2021).

Por otro lado, muchas mujeres embarazadas son clasificadas como de alto riesgo de PE en función de factores obstétricos y maternos, pero en última instancia no desarrollan la enfermedad. Esto plantea la posibilidad de la existencia de una predisposición a la disfunción vascular que es evidente en embarazos con alto riesgo de PE, que también puede ser un factor de riesgo para la ECV más tarde en la vida, independientemente de su asociación con el desarrollo de PE. Las recomendaciones para la detección, prevención y el manejo de las mujeres después de tales embarazos aún no están definidas.

La identificación de biomarcadores cardiovasculares con potencial para predecir qué mujeres corren mayor riesgo sería de gran utilidad en la estratificación de las pacientes con PE y podría contribuir al desarrollo de estrategias adecuadas para la prevención de la hipertensión y de eventos cardiovasculares adversos en esta población.

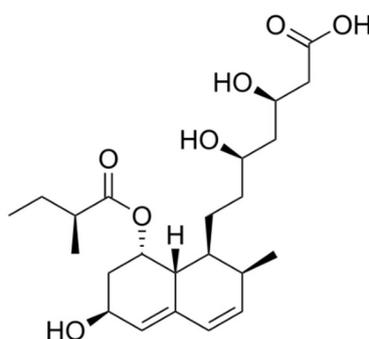
Aunque ahora se reconoce que un antecedente de PE es un factor de riesgo específico de la mujer para la ECV en la vejez, aún no está claro cómo debe mejorarse la salud cardiovascular de estas mujeres. En la actualidad, varias pautas sugieren el control de la hipertensión, la hiperlipidemia y la diabetes, y la provisión de consejos sobre un estilo de vida saludable para mujeres con antecedentes de PE (Tomimatsu et al., 2017). Para definir estrategias de seguimiento e intervención más adecuadas para estas mujeres será preciso investigar más en los próximos años.

1.5 Estatinas

Las estatinas son fármacos que reducen la concentración plasmática de colesterol-LDL, con demostrada eficacia en la prevención cardiovascular primaria y secundaria. Son inhibidores competitivos, parciales y reversibles de la enzima HMG-CoA reductasa, que cataliza la conversión de la HMG-CoA a mevalonato, un metabolito clave en la biosíntesis de colesterol. El bloqueo de la enzima se produce debido al gran parecido estructural que exhiben estos fármacos con el HMG-CoA. La afinidad de las estatinas por la enzima es de 1000 a 10 000 veces la del sustrato natural. Al disminuir la producción de colesterol intracelular, los hepatocitos aumentan la expresión de receptores de las LDL, lo que causa un mayor aclaramiento del colesterol-LDL del plasma. Las estatinas también disminuyen el ensamblaje y la síntesis de VLDL, con lo que se reducen los triglicéridos plasmáticos y, por un mecanismo poco conocido, producen un ligero aumento del colesterol-HDL (Ramos, 2015).

Figura 1.6

Estructura de la pravastatina



Nota. "Estructura química de la pravastatina" por [Edgar181](#), imagen bajo licencia CC.

Las estatinas tienen tres partes principales en su estructura: el análogo del HMG-CoA, un sitio de unión a la enzima HMG-CoA reductasa y una cadena lateral que determina la solubilidad de la molécula (Figura 1.6). Las estatinas difieren en su solubilidad debido a la presencia o ausencia de fracciones polares en sus esqueletos carbonados, que son mayoritariamente hidrofóbicos. Estas variaciones estructurales dan como resultado una distribución diferencial dentro de la bicapa de fosfolípidos de las membranas celulares.

Según su solubilidad, las estatinas se pueden clasificar en lipofílicas e hidrofílicas. Las estatinas predominantemente lipofílicas (simvastatina, fluvastatina, lovastatina, pitavastatina y atorvastatina) pueden penetrar más profundamente en las membranas donde interactúan con las cadenas acilo de los lípidos que las conforman. Por el contrario, las estatinas hidrofílicas

(pravastatina y, en menor grado, rosuvastatina) permanecen en la superficie polar de la membrana y requieren de transportadores proteicos para ingresar al citoplasma celular.

Es probable que la solubilidad y la ubicación distintiva sean factores clave involucrados en las diferencias metabólicas entre las estatinas. Las estatinas lipofílicas pueden ingresar a las células por difusión pasiva y, por lo tanto, distribuirse ampliamente en diferentes tejidos. Sin embargo, los mecanismos mediados por transportadores específicos del hígado necesarios para la captación de estatinas hidrofílicas podrían reducir potencialmente su capacidad para ejercer efectos extrahepáticos. Además, la solubilidad también afecta el aclaramiento plasmático de las estatinas, ya que las lipofílicas son metabolizadas por las enzimas del citocromo P450 unidas a la membrana, mientras que las estatinas hidrofílicas se eliminan en su mayoría sin modificación. Se ha especulado que la capacidad de las estatinas lipofílicas para llegar a los tejidos extrahepáticos podría explicar los resultados cardiovasculares más favorables en sujetos que reciben este tipo de fármaco hipolipemiante, aunque con un mayor riesgo de efectos adversos, como los síntomas musculares asociados a su administración (Climent et al., 2021). Falta evidencia suficiente sobre los posibles efectos beneficiosos o perjudiciales relacionados con la solubilidad de las estatinas.

Los tratamientos con estatinas se pueden clasificar en tres grupos según su potencia o intensidad hipolipemiante. Los de baja intensidad (atorvastatina 10 mg, pravastatina 10-20 mg o simvastatina 10 mg) conducen a una reducción menor del 30% del colesterol-LDL; los de moderada intensidad (rosuvastatina 5-10 mg, atorvastatina 20-40 mg, pravastatina 40 mg, o simvastatina 20-40 mg) consiguen reducciones del 30-50% del colesterol-LDL; y, los de alta intensidad (rosuvastatina 20-40 mg o atorvastatina 80 mg) logran una reducción del colesterol-LDL superior al 50% (Smith & Costantine, 2020).

Además de su acción sobre el perfil lipídico, las estatinas tienen otros efectos cardiovasculares beneficiosos, especialmente sobre la pared arterial, conocidos como efectos pleiotrópicos, que explican el beneficio adicional no atribuible a la reducción del colesterol-LDL observado en muchos estudios de intervención (Davignon, 2004). Pruebas experimentales y clínicas realizadas en los últimos años indican que algunos de los efectos extralipídicos de las estatinas implican mejorar o restaurar la función endotelial, aumentar la estabilidad de las placas ateroscleróticas, disminuir el estrés oxidativo y la inflamación, e inhibir la respuesta trombogénica en el pared vascular. Muchos de estos efectos independientes de la reducción del colesterol-LDL reflejan la capacidad de las estatinas para bloquear la síntesis de importantes intermediarios isoprenoides que facilitan la unión a las membranas celulares de una variedad de moléculas de señalización

intracelular. En particular, la inhibición de las pequeñas proteínas de unión a GTP (Rho, Rac, Rac1 Rab y Ras), cuya localización y función adecuada en la membrana dependen de la isoprenilación, puede desempeñar un papel importante en la mediación de los efectos biológicos de las estatinas (Liao, 2002). La prenilación de las proteínas de unión a GTP, que estimulan vías proinflamatorias e inhiben mecanismos útiles para la homeostasis del endotelio, es necesaria para su anclaje a la membrana celular y poder ejercer su mecanismo de acción relacionado con la migración, la diferenciación y la proliferación celular.

Tabla 1.1

Principales mecanismos de los efectos pleiotrópicos atribuidos a las estatinas

<p><i>Función endotelial</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ↑ Producción y biodisponibilidad de óxido nítrico ↓ Síntesis de endotelina 1 ↑ Perfusión miocárdica en segmentos isquémicos ↑ Respuesta vasodilatadora a la acetilcolina
<p><i>Propiedades antioxidantes</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ↓ Generación de especies reactivas de oxígeno ↓ Expresión y actividad vascular de oxidasa ↓ Actividad de la xantina-oxidasa Inhibición de la peroxidación lipídica ↓ Expresión génica de angiotensina I y su receptor
<p><i>Propiedades antiinflamatorias</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ↑ Estabilidad de la placa ateromatosa ↑ Biodisponibilidad de óxido nítrico Inhibición de interleuquina 6 ↓ Proteína C reactiva ↓ Acumulación de macrófagos en la placa ateromatosa Inhibición de la producción de metaloproteinasas por los macrófagos activados
<p><i>Propiedades antitrombóticas</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Inhibición de la agregación plaquetaria Mantenimiento del equilibrio entre factores hemostáticos, protrombóticos y fibrinolíticos Acción antitrombótica: ↓ expresión del factor tisular, ↓ formación de trombina y factores procoagulantes Acción profibrinolítica: ↓ concentraciones plasmáticas de inhibidor 1 del activador del plasminógeno

Nota. Tomado de "Del concepto de estatinas de alta potencia a los efectos extralipídicos de las estatinas" (Ramos, 2015).

A través de estos potenciales efectos en las proteínas celulares, las estatinas pueden tener una serie de propiedades antiateroscleróticas y antitrombóticas, como la inhibición del crecimiento de las células musculares lisas, de la adhesión celular, de la activación plaquetaria y de la secreción de PCR, entre otras (Ramos, 2015). Se han descrito múltiples acciones de las distintas

estatinas que participarían en este fenómeno vasculoprotector. En la Tabla 1.1 se resumen algunos de los principales mecanismos de la mejora de la función endotelial y de las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antitrombóticas atribuidas a las estatinas.

1.5.1 Pravastatina en la prevención de la preeclampsia

Se sabe que la PE comparte varios mecanismos fisiopatológicos con la ECV y esto ha llevado a investigar la utilidad potencial de las estatinas en la prevención y manejo de la PE en los últimos años.

Las estatinas regulan al alza la eNOS promoviendo la producción de NO en la vasculatura, estimulan la liberación de VEGF y PlGF, y reducen las concentraciones de sFlt-1 y sEng. Tienen propiedades antiinflamatorias, entre las que destacan la reducción de la PCR, el aumento de los niveles de citoquinas antiinflamatorias producidas por linfocitos T colaboradores de tipo 2 y la disminución de la producción de citoquinas proinflamatorias por linfocitos T colaboradores de tipo 1. Estos efectos inmunomoduladores y antiinflamatorios, junto con otras acciones pleiotrópicas sobre la formación de radicales libres y la proliferación de células musculares lisas, hacen de las estatinas candidatas muy prometedoras para la prevención y el tratamiento de la PE (Smith & Costantine, 2020).

Entre las estatinas, se ha utilizado específicamente la pravastatina en varios estudios preclínicos y clínicos para revertir el desequilibrio angiogénico del embarazo asociado con la PE, para restaurar la salud endotelial global y para prevenir lesiones oxidativas e inflamatorias. Además, en ensayos realizados en humanos, se ha encontrado un perfil de seguridad favorable para la pravastatina, y la evidencia disponible actualmente no respalda antiguas preocupaciones teratogénicas que rodeaban su administración en el embarazo (Costantine et al., 2016).

En 2016, Costantine *et al* publicaron un estudio piloto aleatorizado del tratamiento con pravastatina de gestantes con alto riesgo de PE desde las semanas 12-16 de gestación hasta el parto (Costantine et al., 2016) en el que no se produjeron efectos adversos y se consiguieron resultados promisorios para reducir la tasa de PE, concluyeron que era necesario realizar una investigación de mayor alcance para examinar la eficacia del tratamiento.

Teniendo en cuenta que la PE tardía es la forma más común de presentación de la enfermedad, que ya existía un modelo efectivo para predecirla (Andrietti et al., 2016), que se había comprobado que la pravastatina tenía una farmacocinética adecuada y que podía utilizarse con seguridad durante el embarazo, se desarrolló un ensayo clínico multicéntrico (STATIN) para

evaluar su efectividad en la reducción del riesgo de PE a término. En este contexto despertó interés conocer el efecto del tratamiento con pravastatina sobre la función endotelial vascular de las gestantes mediante el estudio de una combinación de biomarcadores circulantes, que es el objetivo general de este trabajo.

2 Hipótesis y objetivos

2.1 Hipótesis

El tratamiento con pravastatina en la gestación con alto riesgo de preeclampsia tardía mejora la función endotelial vascular asociada a una disminución del estrés oxidativo, la inflamación y la liberación de microvesículas circulantes vasculares maternas y de sincitiotrofoblasto.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo general:

- Estudiar el efecto del tratamiento con pravastatina sobre la función endotelial vascular mediante la determinación de biomarcadores circulantes en mujeres con alto riesgo de preeclampsia tardía.

2.2.2 Objetivos específicos:

- Comparar el nivel de estrés oxidativo, el estatus inflamatorio, la función endotelial y el perfil lipídico, entre las semanas 35-37 de gestación, en gestantes con bajo y alto riesgo de preeclampsia a término.
- Analizar el rendimiento de biomarcadores circulantes, sus relaciones de dependencia y la posible asociación con variables demográficas y clínicas entre las semanas 35-37 de gestación, en gestantes con bajo y alto riesgo de preeclampsia a término.
- Desarrollar un modelo explicativo del riesgo de preeclampsia a término a partir de la combinación de biomarcadores circulantes relacionados con la función endotelial vascular.
- Estudiar el efecto del tratamiento con pravastatina sobre los niveles de biomarcadores circulantes de estrés oxidativo, inflamatorios, de función endotelial, y el perfil lipídico, desde la semana 35-37 hasta el parto en mujeres con alto riesgo de preeclampsia a término.

3 Material y método

3.1 Ámbito, sujetos y diseño del estudio

El estudio comprendido en esta tesis doctoral se realizó con pacientes de la Unidad de Medicina Fetal del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA) sometidas a un cribado de PE tardía.

Se trata de un estudio prospectivo, descriptivo y analítico del efecto del tratamiento con pravastatina sobre la función endotelial vascular de embarazadas con riesgo de PE a término (ENDOSTATIN), desarrollado en el marco de un ensayo clínico multicéntrico aleatorizado doble ciego controlado con placebo (STATIN, EC Nº EducraCT 2016-005206-19, ISRCTN16123934 <https://doi.org/10.1186/ISRCTN16123934>) realizado para examinar el uso profiláctico de este fármaco, a partir de las semanas 35-37 de gestación, en la reducción de la incidencia y gravedad de la PE a término. Para completar los objetivos propuestos, también fueron reclutadas embarazadas de la misma edad gestacional con bajo riesgo de PE a término.

En el ensayo clínico STATIN el objetivo primario fue determinar la incidencia de PE después de la aleatorización. Como objetivos secundarios se propusieron analizar el efecto de la pravastatina sobre los resultados adversos de cualquier gestación, en la morbilidad y mortalidad neonatal y en el valor de los marcadores angiogénicos. También se evaluó la seguridad de la administración de pravastatina durante el embarazo. El estudio ENDOSTATIN se centró en la evaluación del estatus del endotelio durante el tratamiento con pravastatina de las participantes del ensayo clínico, utilizando biomarcadores circulantes relacionados con la función endotelial vascular.

La investigación se llevó a cabo bajo el cumplimiento de los principios éticos promulgados por la Asociación Médica Mundial en la Declaración de Helsinki (1996) y al amparo de lo establecido en el Real Decreto 223/2004, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos, y el Real Decreto Legislativo 1/2015, que recoge el texto refundido de la Ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios. Antes de iniciar este trabajo fue solicitada la autorización de las instancias competentes, que emitieron los siguientes informes y dictámenes:

- Dictamen favorable del Comité de Ética de Investigación con Medicamentos del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, con fecha 29 de octubre de 2018 (Anexo I)

- Propuesta favorable de la Comisión para la Realización de Trabajos de Investigación en el Área I de Salud a la Dirección Gerencia del Área, con fecha 10 de enero de 2019 (Anexo II)
- Informe favorable de la Comisión de Ética de Investigación de la Universidad de Murcia, con fecha 18 de febrero de 2019 (Anexo III)
- Informe favorable del Comité de Bioseguridad en Experimentación de la Universidad de Murcia, con fecha 25 de junio de 2019 (Anexo IV)

3.1.1 Selección de la población

Para identificar las participantes potenciales del STATIN se invitó a las mujeres con embarazos únicos que acudieron a revisión ginecológica rutinaria entre las semanas 35⁺⁰-36⁺⁶ de gestación a formar parte de un cribado de PE utilizando una combinación de factores maternos, PAM y marcadores angiogénicos.

Las gestantes con alto riesgo de PE a término recibieron información sobre el ensayo clínico STATIN y sobre el estudio de función endotelial ENDOSTATIN. Se les explicó el propósito, la metodología, los beneficios, los riesgos potenciales de cada investigación y se les propuso participar, solicitando a las que aceptaron que firmaran el documento de consentimiento (Anexo V). Las embarazadas con bajo riesgo de PE tardía pasaron a formar parte del grupo de gestantes sanas del estudio ENDOSTATIN.

3.1.2 Criterios de elegibilidad

Las gestantes seleccionadas para cada estudio (STATIN y ENDOSTATIN) cumplieron todos los criterios de inclusión y ninguno de los criterios de exclusión definidos a continuación:

- ✓ Criterios de inclusión para el cribado de riesgo de PE a término:
 - Embarazo único
 - Feto vivo
 - Recibir información verbal y escrita de las características de cada estudio y firmar el consentimiento para participar.
- ✓ Criterios de exclusión para el cribado:
 - Edad inferior a 18 años
 - Embarazo múltiple
 - Inconsciencia o estar muy enfermo
 - Enfermedad mental severa

- Dificultad para el aprendizaje
- No hablar con fluidez el idioma local y no contar con un intérprete

- ✓ Criterios de inclusión de participantes en la fase de aleatorización (STATIN):
 - Los mismos que para el cribado; y,
 - Identificada mediante cribado como de alto riesgo de PE a término
 - Recibir información verbal y escrita de las características del estudio y firmar el consentimiento para participar

- ✓ Criterios de exclusión de participantes en la fase de aleatorización (STATIN):
 - Los mismos que para el cribado; y,
 - Existencia de anomalía fetal mayor
 - PE establecida
 - Consumo de estatinas dentro de los 28 días anteriores a la aleatorización
 - Contraindicaciones para el tratamiento con estatinas:
 - Hipersensibilidad a la pravastatina
 - Intolerancia a la lactosa
 - Cáncer previo o en curso
 - Ser receptoras de trasplante de órgano sólido
 - Enfermedad hepática activa en los 6 meses previos
 - Enfermedad renal crónica o insuficiencia renal con creatinina basal ≥ 1.5 mg/dL
 - Historia de miopatía o rabdomiólisis
 - Niveles de GOT o GPT que dupliquen el límite superior de referencia
 - Niveles de creatina quinasa que quintupliquen el límite superior de referencia
 - Uso de medicamentos de forma crónica (>6 meses) o concurrente con interacciones potenciales con las estatinas: inmunosupresores, fibratos, gemfibrozilo, niacina, inhibidores de proteasa, efavirenz, eritromicina, claritromicina, itraconazol, colestiramina, digoxina y rifampicina
 - Participación en otro estudio con intervención que pueda influir en los resultados de este estudio

- ✓ Criterios de inclusión de participantes en el grupo de gestantes con bajo riesgo de PE (ENDOSTATIN):
 - Los mismos que para el cribado; además,
 - Identificadas como gestantes con bajo riesgo de PE a término

- Recibir información verbal y escrita de las características del estudio y firmar el consentimiento para participar
- ✓ Criterios de exclusión de participantes en el grupo de gestantes con bajo riesgo de PE (ENDOSTATIN):
 - Los mismos que para el cribado; y, además,
 - Los mismos utilizados para la exclusión de participantes en la fase de aleatorización
 - Dos o más biomarcadores inflamatorios y/o de dislipemia que dupliquen los límites superiores de referencia
- ✓ Criterio de elegibilidad de gestantes con riesgo admitidas en el estudio aleatorizado STATIN, para participar en el estudio de función endotelial (ENDOSTATIN):
 - Acudir a la primera o segunda visita de seguimiento clínico, con una semana o más de tratamiento

3.1.3 Grupos de estudio

Las participantes en el estudio de función endotelial se clasificaron de la siguiente forma:

- ✓ Grupo I: gestantes con bajo riesgo de PE tardía
- ✓ Grupo II: gestantes con alto riesgo de PE tardía
 - Subgrupo IIa: gestantes con alto riesgo de PE tardía a las que se administró placebo
 - Subgrupo IIb: gestantes con alto riesgo de PE tardía tratadas con pravastatina

3.1.4 Intervención

Las embarazadas con riesgo de PE recibieron un número de identificación y un código de aleatorización que determinó si recibían placebo o el tratamiento en investigación. Para equilibrar los grupos en el ensayo se utilizó un sistema de aleatorización online basado en el método de los bloques permutados.

El investigador principal y todas las personas involucradas permanecieron ciegos a la asignación del fármaco, al tiempo que el proveedor del medicamento en investigación (Mawdsley Brooks and Co.) mantuvo bajo custodia y en secreto el listado con los códigos de asignación, que fueron revelados al finalizar el estudio o por necesidad clínica.

La intervención se realizó con dosis diarias de 20 mg de pravastatina. El tratamiento se entregó en frascos con 45 cápsulas que contenían el medicamento o el placebo. Las cápsulas con placebo tenían el mismo aspecto que las que contenían el fármaco. A las gestantes se les dio instrucciones para tragar la cápsula íntegra y evitar medicamentos que contuvieran estatinas o antiinflamatorios no esteroideos a lo largo del estudio. Se les indicó que tomaran una cápsula cada día hasta la semana 41 de gestación o hasta el inicio del trabajo de parto (como máximo 42 días).

3.1.5 Etapas del ensayo clínico

El ensayo se desarrolló a través de una serie de visitas y una entrevista telefónica, como se refleja en la Figura 3.1.

En la visita de cribado se recogieron datos demográficos y de la historia clínica de las embarazadas, se midió la estatura, el peso y la presión arterial, se hizo un ultrasonido fetal, se extrajeron muestras de sangre para la medida del PIGF y el sFlt-1 y se determinó la proteinuria en orina; una parte de las muestras se destinó para ambos estudios (STATIN y ENDOSTATIN) y otra se almacenó para investigaciones futuras.

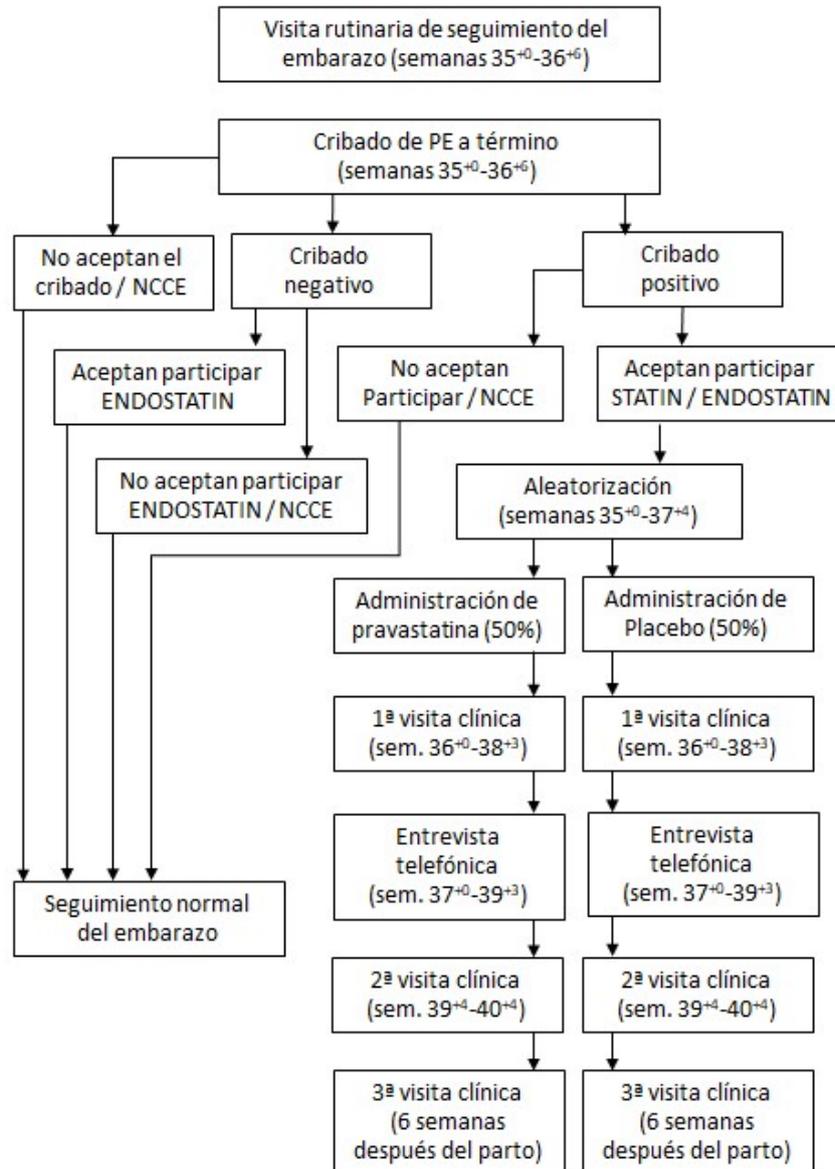
Con la información obtenida se determinó el riesgo de PE a término (Panaitescu et al., 2018). Las pacientes con cribado negativo fueron reclutadas de forma consecutiva hasta completar la n del Grupo I. En las que tuvieron un cribado positivo, antes de incluirlas en los dos brazos del ensayo (Grupo II), se midieron la creatina quinasa y marcadores de función hepática.

A continuación, se analizó la medicación concomitante de las participantes con riesgo y se les entregó un frasco con las cápsulas de 20 mg de pravastatina o de placebo, en la visita de aleatorización, en función del código de asignación recibido.

Una semana después se produjo la primera visita de seguimiento clínico, donde se midió nuevamente la presión arterial, el peso y se recogieron muestras clínicas para la medición de biomarcadores y almacenar. Además, se preguntó sobre la medicación concomitante, el grado de cumplimiento del tratamiento y los efectos adversos asociados al mismo. En esto último, se insistió en la entrevista telefónica, que tuvo lugar 2 semanas post-aleatorización.

En la segunda visita de seguimiento clínico las pacientes llevaban aproximadamente 4 semanas de tratamiento. En esta ocasión se realizó un ultrasonido fetal y se repitió el mismo esquema de la primera visita.

Figura 3.1
Diagrama de los estudios STATIN y ENDOSTATIN



Nota. NCCE: No cumplen los criterios de elegibilidad.

3.1.6 Tamaño de la muestra

Para calcular el tamaño de la muestra se utilizó la diferencia de medias de biomarcadores angiogénicos en grupos de sujetos tratados con pravastatina (Costantine et al., 2016). De acuerdo con estos resultados, para alcanzar diferencias significativas en los niveles plasmáticos de marcadores circulantes de daño endotelial, y entre el tratamiento con pravastatina y el placebo, con una potencia del 95% y un nivel de significación del 5%, era necesario seleccionar aleatoriamente 180 gestantes: 60 de bajo riesgo de PE (grupo control sano) y 60 de alto riesgo

de PE en cada uno de los brazos de pravastatina y placebo procedentes del ensayo clínico. Como no fue posible reclutar suficientes pacientes para completar la n de las gestantes de los subgrupos en los que se realizó la intervención, se recalculó la potencia con las 33 mujeres tratadas con pravastatina (subgrupo IIb), utilizando esta vez la diferencia de medias pareadas de las microvesículas endoteliales, que con un nivel de confianza del 95%, dieron como resultado una potencia del 91,6%.

3.2 Método

3.2.1 Recogida y procesamiento de las muestras

Se extrajo sangre periférica de la vena cubital de las gestantes con una aguja calibre 20 en tubos secos con gel, con citrato de sodio al 3,8% y con anticoagulante EDTA. Las muestras fueron centrifugadas a 3000g durante 5 min a temperatura ambiente y a continuación se aspiró cuidadosamente el plasma/suero, dejando una capa inalterada de 1 o 2 mm en la interfaz con las células sanguíneas. Seguidamente, se hicieron alícuotas de 400 μ L y se congelaron a -80 °C hasta el momento de la medición. El procesamiento se realizó dentro de las 2 horas siguientes a la extracción para evitar la generación de MVs *ex vivo*.

Las muestras y datos de las embarazadas incluidas en este estudio fueron almacenadas por el Biobanco en Red de la Región de Murcia (PT17/0015/0038), integrado en la Red Nacional de Biobancos (B.000859), con la aprobación de sendos Comités Ético y Científico, y fueron procesadas siguiendo procedimientos normalizados.

3.2.2 Parámetros del estudio

En el estudio se analizaron variables clínicas, biomarcadores y se calcularon índices, relaciones y otras variables utilizando fórmulas y algoritmos adecuados, que se desglosan a continuación:

- Variables clínicas

Datos demográficos y epidemiológicos

- Edad
- Estatura
- Peso
- IMC
- Raza

- Hábito de fumar
- Nuliparidad
- Consumo de alcohol o drogas
- Historia familiar de PE

Comorbilidades

- Lupus eritematoso sistémico
- Síndrome antifosfolípido
- Diabetes mellitus
- Hipertensión arterial crónica

Datos clínicos del embarazo

- Conseguido mediante técnicas de reproducción asistida
- Edad gestacional
- Riesgo de PE
- PAM
- Consumo de aspirina en dosis bajas
- UtA-PI
- Diabetes mellitus gestacional (DMG)
- Hipertensión inducida por el embarazo
- Desarrollo de PE

Resultados del embarazo

- Inicio del trabajo de parto
 - Tipo de parto
 - Edad gestacional al parto
 - Peso al nacer
- Biomarcadores

Biomarcadores de estrés oxidativo

- CATS
- HCIS
- AU

Biomarcadores de inflamación

- IL-6
- GDF-15
- PCR

Biomarcadores angiogénicos

- PlGF
- sFlt-1
- Relación PlGF/sFlt-1

Biomarcadores de función endotelial

- Total de microvesículas anexina V+ (MVs-tot)
- MVs-pla
- MVs-leu
 - MVs-mon
- MVs-end
 - MVs-ena
- MVs-sct
- ADMA

Marcadores de dislipemia

- Colesterol total
- Triglicéridos
- Colesterol-HDL
- Colesterol-no-HDL
- Colesterol-LDL
- Apolipoproteína B (ApoB)
- ApoAI
- Relación ApoB/ApoAI
- Lipoproteína A (LpA)

La información de las variables clínicas y el valor de los marcadores angiogénicos se obtuvieron del ensayo clínico STATIN. Los biomarcadores de estrés oxidativo, inflamación, función endotelial y dislipemia se midieron para esta investigación.

En las tablas de los anexos VI y VII se recogen las características técnicas de los ensayos utilizados y los valores de normalidad de los biomarcadores en el tercer trimestre de embarazo.

3.2.3 Cálculo del riesgo de preeclampsia tardía (enfoque del riesgo competitivo)

El riesgo fue calculado a partir de un modelo de tiempo transcurrido hasta el evento que permite estimar el momento en que se produce el parto con PE (Andrietti et al., 2016; Ciobanu et al., 2019; Panaitescu et al., 2018). Cada mujer embarazada tiene una distribución personalizada de la edad gestacional en la que pare con PE, que proviene de la aplicación del teorema de Bayes a una distribución previa, determinada a partir de características demográficas de la madre, su historial médico y el valor de biomarcadores específicos. Que experimente PE depende de la competencia que se establece entre el parto antes o el parto después del momento en que ocurre la PE.

En este modelo, el riesgo se incrementa con la edad materna, el aumento de peso, el origen racial negro y del sur de Asia, los antecedentes médicos de hipertensión crónica, diabetes mellitus, lupus eritematoso sistémico o síndrome antifosfolípido, la concepción por fertilización *in vitro* y antecedentes familiares o personales de PE. El riesgo disminuye con el aumento de la altura materna y en mujeres que han tenido hijos sin PE previa. Los biomarcadores útiles para estimar el riesgo en embarazos de 35-37 semanas son la PAM, el PIGF y el sFlt-1, expresados como múltiplos de la mediana (MoM) tras su ajuste por la edad gestacional, el peso, la raza, el método de concepción, elementos de la historia obstétrica y el instrumento utilizado para la medición (Ciobanu et al., 2019). Los MoM de PAM y sFlt-1 tienden a ser más altos en embarazos con PE, mientras que los del PIGF son más altos en los embarazos normales.

3.2.4 Determinación de la presión arterial media

La PAM fue medida con dispositivos automatizados validados y un protocolo estandarizado. Para calcularla se realizaron dos mediciones del brazo derecho y dos del brazo izquierdo y se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{PAM} = \text{Presión arterial diastólica} + (\text{Presión arterial sistólica} - \text{Presión arterial diastólica}) / 3$$

3.2.5 Estudio doppler de la arteria uterina

Las arterias uterinas fueron visualizadas mediante una ecografía doppler a color transabdominal, en la que se midió el índice de pulsatilidad de las arteria derecha e izquierda, se calculó su valor medio y su expresión en MoM.

3.2.6 Medición de biomarcadores

3.2.6.1 Citometría de flujo

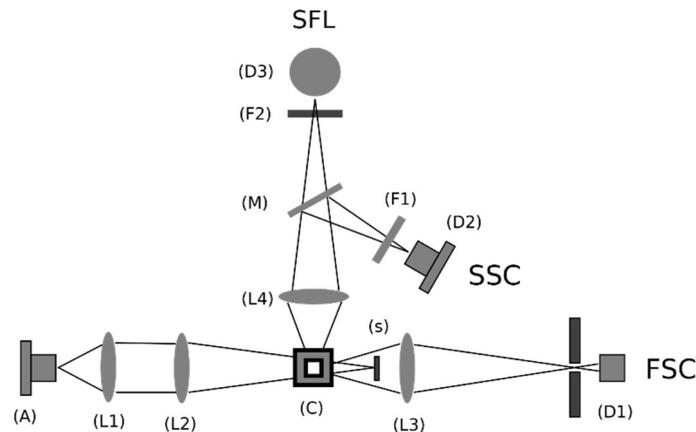
La citometría de flujo es una técnica ampliamente utilizada en la investigación, especialmente en biomedicina. Entre sus aplicaciones destacan el diagnóstico y seguimiento de muchas enfermedades hematológicas, inmunológicas, microbiológicas, etc. En los últimos años se ha demostrado su utilidad en la medición de MVs celulares (Dey-Hazra et al., 2010).

Está basada en el análisis de células o partículas en suspensión que se mueven de forma ordenada y a gran velocidad a través de una celda de flujo laminar, sobre la que incide un fino rayo de luz láser, mientras que una serie de detectores del aparato miden la luz dispersada frontal (FSC), la luz dispersada lateral (SSC) y la luz fluorescente lateral (SFL), que aportan información sobre el tamaño, la complejidad y el fluorocromo específicamente unido a cada célula o partícula (Figura 3.2).

La información que aportan los instrumentos se recoge mediante un proceso denominado adquisición, para lo cual se utiliza un programa informático instalado en el ordenador que está conectado al citómetro. Este software permite ajustar diversos parámetros del aparato y visualizar la información que se va obteniendo de la muestra mientras se está realizando la medición. Los datos generados por el citómetro pueden representarse en forma de diagramas de dispersión, histogramas y muchas otras formas gráficas, en las cuales pueden delimitarse regiones y separarse secuencialmente grupos de eventos en función de sus características, para estudiarlos individualmente. La información que se genera del análisis de los datos, bien de la población total o bien de las diferentes subpoblaciones, se presenta de manera estadística.

Figura 3.2

Disposición de los elementos de un citómetro



Nota. La fuente (A) emite luz láser sobre una cámara de flujo laminar (C). La luz directa es detenida por una pantalla (s), mientras que la luz dispersada frontalmente es enfocada por una lente sobre el detector de dispersión frontal (FSC). La luz dispersada lateralmente y la fluorescencia se enfocan por medio de otra lente sobre un espejo dicróico (M), que refleja la luz con igual longitud de onda que la fuente hacia el detector de dispersión lateral (SSC) y deja pasar la que tiene una longitud de onda diferente a la emitida, que atraviesa un filtro ajustado para una determinada longitud de onda (F2), discriminando así entre diferentes fluorocromos, para finalmente incidir sobre el detector lateral de fluorescencia (SFL). L, lente; D, detector; F, filtro. "Esquema de disposición de los elementos en un citómetro de flujo" por J3D3 licencia bajo CC BY-SA 3.0 ES.

En este trabajo, la separación, marcaje y análisis de las MVs mediante citometría se realizó según los procedimientos descritos por varios grupos de trabajo (Inglis et al., 2015; Nieuwland et al., 1997; Suades et al., 2013), con modificaciones. La secuencia seguida se describe a continuación:

- Aislamiento de las microvesículas

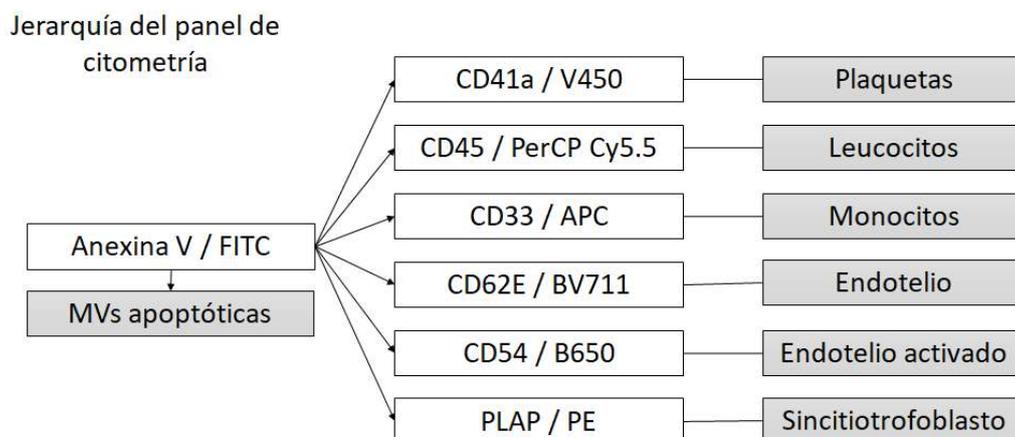
Las alícuotas de plasma se descongelaron por espacio de una hora y se centrifugaron a 3000g durante 10 min para eliminar artefactos producidos durante su conservación. A continuación, se centrifugaron 250 µL de plasma a 18890g durante 30 min, se descartaron 225 µL de sobrenadante y el sedimento enriquecido en MVs se lavó con una solución de PBS-Citrato (1,4 mmol/L de fosfato, 154 mmol/L de NaCl, 10,9 mM de citrato trisódico, pH 7,4). Seguidamente, se llevó a cabo una segunda centrifugación en las mismas condiciones, tras la cual se retiraron 225 µL de sobrenadante y se reconstituyó el sedimento en PBS-Citrato hasta un volumen final de 100 µL.

- Desarrollo del panel de marcadores moleculares

Para identificar las MVs se diseñó un panel (Figura 3.3) con anexina V y anticuerpos conjugados con fluorocromos, dirigidos contra las dianas moleculares de interés.

Figura 3.3

Panel de anexina V y anticuerpos conjugados utilizados para la medición de las MVs



Nota. MVs, microvesícula. Anexina V / FITC, BD Pharmingen™ FITC Annexin V; CD41a / V450, BD Horizon™ V450 Mouse Anti-Human CD41a, clone HIP8; CD45 / PerCP Cy5.5, BD PerCP Cy5.5 Mouse Anti-Human CD45, clone HI30; CD33 / APC, BD Pharmingen™ APC Mouse Anti-Human CD33, clone WM53; CD62E / BV711, BD Pharmingen™ APC Mouse Anti-Human CD62E, clone 68-5H11; CD54 / B650, BD OptiBuild™ BV650 Mouse Anti-Human CD54, clone HA58; PLAP / PE, Canvax PLAP Monoclonal Mouse Antibody, cat no MA0074.

El Anexo VIII contiene las curvas de excitación y emisión de los fluorocromos del panel, realizadas con la aplicación BD Spectrum Viewer (Becton Dickinson and Company), una herramienta que permite determinar los filtros apropiados para detectar cada fluorocromo, analizar su compatibilidad con otros fluorocromos y el desbordamiento fluorescente.

Tabla 3.1

Características del panel de fluorocromos conjugados utilizados para la medición de las microvesículas

Diana	Expresión	Fluorocromo	Láser	Vol. en (μL)
Anexina V	MVs	FITC	Azul (488 nm)	2
CD41a	Plaquetas	V450	Violeta (405 nm)	2
CD45	Leucocitos	PerCP Cy5.5	Azul (488 nm)	1
CD33	Monocitos	APC	Rojo (640 nm)	4
CD62E	Endotelio	BV711	Violeta (405 nm)	1
CD54 (ICAM-1)	Endotelio activado	BV650	Violeta (405 nm)	1
PLAP	Sincitiotrofoblasto	PE	Amarillo-Verde (561 nm)	1
Mezcla de anticuerpos (volumen/tubo)				12

Nota. MVs, microvesícula. Anexina V / FITC, BD Pharmingen™ FITC Annexin V; CD41a / V450, BD Horizon™ V450 Mouse Anti-Human CD41a, clone HIP8; CD45 / PerCP Cy5.5, BD PerCP Cy5.5 Mouse Anti-Human CD45, clone HI30; CD33 / APC, BD Pharmingen™ APC Mouse Anti-Human CD33, clone WM53; CD62E / BV711, BD Pharmingen™ APC Mouse Anti-Human CD62E, clone 68-5H11; CD54 / B650, BD OptiBuild™ BV650 Mouse Anti-Human CD54, clone HA58; PLAP / PE, Canvax PLAP Monoclonal Mouse Antibody, cat no MA0074.

Los componentes del panel (Tabla 3.1) se combinaron en proporciones adecuadas y fueron filtrados por centrifugación a 850g durante 3 min en tubos eppendorf utilizando una matriz de nitrocelulosa con poros de 0,22 μm . Para asegurar que las cantidades de cada ingrediente fueran correctas se comprobó que al diluirlas diez veces (1/10), en las condiciones del experimento, marcaban con la misma eficacia.

- Compensación del panel de marcadores

La medición de varios fluorocromos a la vez hizo necesario el establecimiento de ajustes de compensación de fluorescencia. Para esto se utilizó el kit CompBead Plus (Catálogo No. 552843, de BD™), que contiene dos tipos de microesferas de poliestireno: CompBead Plus Anti-Mouse Ig κ , que se unen a inmunoglobulinas portadora de cadenas ligeras κ de ratón, y BD™ CompBead Plus Negative Control, recubiertas con albúmina de suero bovino, que no tienen capacidad de unión. Al mezclarlas con los anticuerpos de ratón conjugados con fluorocromos del panel, el kit proporcionó poblaciones teñidas positivas y negativas (fluorescencia de fondo), que permitieron calcular los niveles de compensación mediante el software de configuración del instrumento.

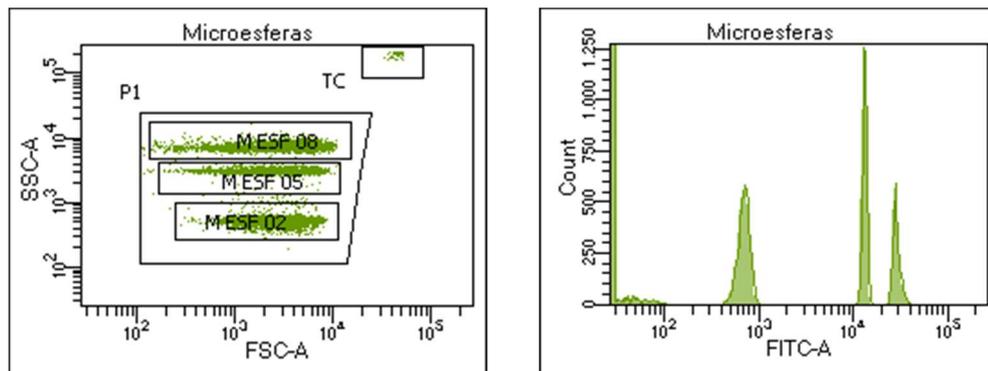
- Marcado y cuantificación de las microvesículas

Para la cuantificación se utilizaron tubos TruCount (Catálogo No. 340334, de BD™), con un número conocido de microesferas fluorescentes. En cada tubo se añadieron 35 μL de tampón de anexina V (10 mM HEPES/NaOH, pH7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2), 15 μL de la muestra con las MVs y 12 μL de la mezcla de marcadores del panel. Los tubos se incubaron durante 15 min en la oscuridad a temperatura ambiente, se completaron con 650 μL de tampón de anexina V y a continuación fueron leídos.

- Adquisición

Para detectar las MVs fue definida una ventana que recogiera los eventos producidos por partículas con un diámetro inferior a un micrómetro, utilizando un kit con microesferas calibradas de 0,2, 0,5 y 0,8 μm de diámetro (Catálogo No. 832, de Bang Laboratories, Inc). El umbral inferior de detección se fijó por encima del ruido electrónico del citómetro y los parámetros de voltaje de FSC, SSC y SFL se obtuvieron con ajustes de ganancia en la escala logarítmica (Figura 3.4). En la configuración de cada experimento se utilizó la compensación obtenida para el panel.

Figura 3.4
Ventana de adquisición de las MVs



Nota. Definición de la ventana con microesferas calibradas de diferentes diámetros y microesferas TruCount. P1, ventana de adquisición de microvesículas; TC, ventana de recuento de microesferas TruCount; M ESF, microesferas de 0,2, 0.5 y 0.8 μm).

Las MVs se identificaron en función de su tamaño, la unión a la anexina V y su afinidad por los anticuerpos específicos de cada población. La adquisición se realizó a bajo flujo hasta contabilizar 10 000 eventos en la ventana de recuento de las microesferas TruCount.

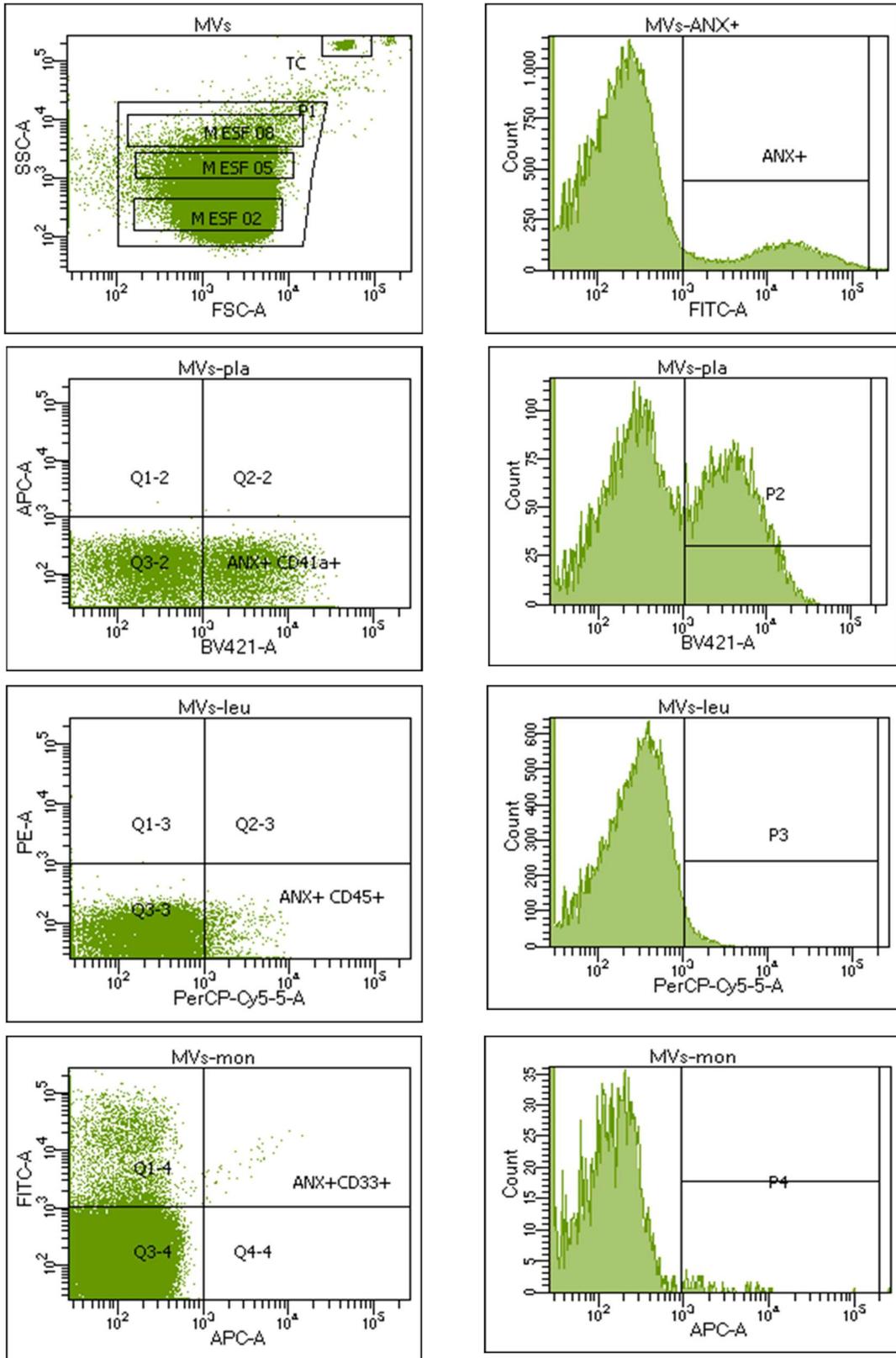
Para el procesamiento de la información y la obtención de los datos se realizaron gráficos de puntos bidimensionales de dos o más parámetros e histogramas, teniendo en cuenta la jerarquía del panel.

La medición de MVs se realizó en un citómetro de flujo multiparamétrico Fortessa LSR X-20 de BD Biosciences. La compensación del panel, la adquisición de los datos y el análisis de los resultados se llevó a cabo con la aplicación FACSDivaTM Software v8.0.2.

En la Figura 3.5 se resume la estrategia seguida para la identificación, cuantificación y fenotipado de las MVs. En el diagrama de puntos del extremo superior izquierdo se ve la ventana definida para la adquisición de las MVs (P1), así como la zona donde fueron registrados los eventos producidos por las esferas TruCount (TC). En el extremo superior derecho hay un histograma donde se distinguen las MVs anexina V+. En los gráficos restantes se van segregando estas MVs en función del fluorocromo utilizado para identificar cada población; para este propósito (marcado doble) se contrastó el marcador de interés frente a otro ausente en la población, y en los casos en que se exploró más de un marcador (marcado triple) las MVs anexina V+ se contabilizaron representando en cada eje uno de los marcadores de interés.

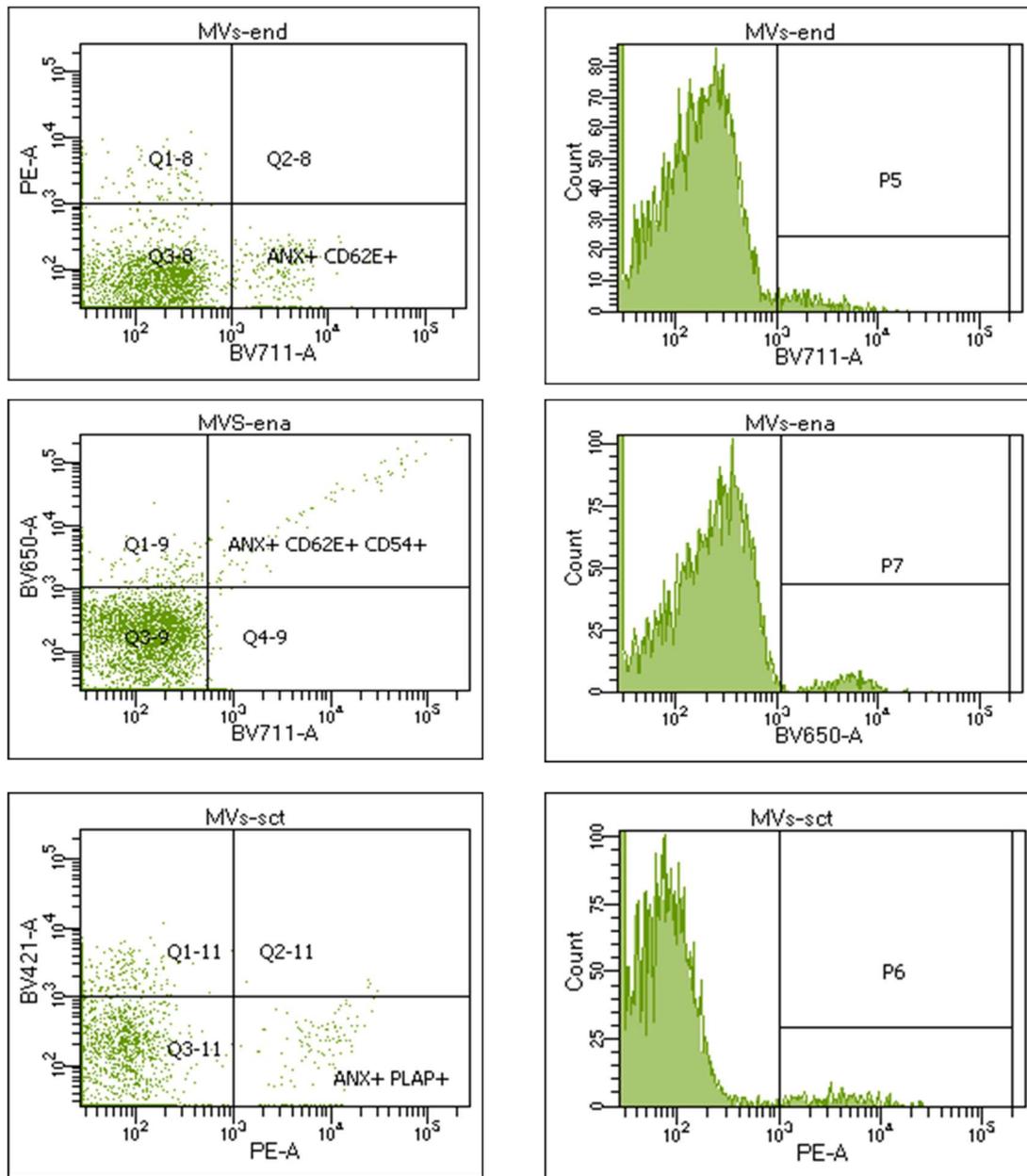
Figura 3.5

Diagramas de puntos e histogramas obtenidos durante la identificación y cuantificación de las microvesículas



(Continúa en la página siguiente)

Figura 3.5
(continuación de la página anterior)



Nota. La ventana de adquisición P1 fue definida con microesferas calibradas de diferentes diámetros. La cuantificación se consiguió comparando los eventos registrados de cada población o subpoblación de MVs con los obtenidos de una concentración conocida de microesferas TruCount. TC, microesferas TruCount; M ESF, microesferas calibradas de 0,2, 0,5, y 0,8 μm ; ANX, Anexina V+; MVs-ANX, MVs anexina V+; MVs-pla, MVs de plaquetas; MVs-leu, MVs de leucocitos; MVs-mon, MVs de monocitos; MVs-end, MVs de endotelio; MVs-ena, MVs de células endoteliales activadas; MVs-sct, MVs de sincitiotroblasto.

3.2.6.2 Electroquimioluminiscencia

La electroquimioluminiscencia es un método que combina la reacción antígeno-anticuerpo sobre la superficie de una micropartícula magnética con una reacción electroquímica que se

produce sobre un electrodo de platino que genera luminiscencia. En las técnicas donde se aplica se incuban, conjuntamente, para formar un complejo tipo sándwich, un anticuerpo monoclonal de captura biotinilado, un segundo anticuerpo monoclonal trazador marcado con quelato de rutenio y la muestra. Después de incorporar micropartículas recubiertas de estreptavidina, el complejo se fija a la fase sólida por interacción entre la biotina y la estreptavidina. Esta mezcla de reacción es trasladada a una célula de medida donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan a la superficie del electrodo de platino. Al aplicar una corriente eléctrica controlada se produce una reacción quimioluminiscente por la interacción entre el quelato de rutenio y la tripropilamina, que se mide con un fotomultiplicador.

La medición de los niveles de IL-6 y GDF-15 se realizó por este método, en un analizador Cobas e 411 (Roche Diagnostics®) con reactivos de la misma casa comercial. Los resultados se calcularon mediante una curva de calibración de dos puntos generada para el instrumento y una curva máster suministrada por el fabricante.

3.2.6.3 Nefelometría

La nefelometría es un procedimiento analítico que se basa en la cuantificación de la radiación que se dispersa cuando un rayo de luz atraviesa las partículas suspendidas en un líquido. Mide la luz dispersada en una dirección distinta a la de la luz emitida (en ángulos que oscilan entre 15° y 90°) y se suele utilizar para medir analitos cuya concentración es baja.

Con este método se determinaron las concentraciones de ApoB, ApoAI, LpA y HCIS, en un autoanalizador compacto BN ProSpec (Siemens Healthcare Diagnostics®), utilizando antisueros específicos. Para la ApoB se usaron anticuerpos de conejos inmunizados con LDL proveniente de suero humano, mientras que el antisuero contra la ApoAI fue producido mediante la inmunización de conejos con apolipoproteína humana altamente purificada. En ambos casos se midieron directamente los inmunocomplejos formados entre la apolipoproteína y el antisuero. La medición de la HCIS se realizó, tras su disociación de las proteínas de unión y reducción con ditiotreitol, mediante un ensayo inmunonefelométrico competitivo potenciado con partículas de poliestireno, utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón anti-S-adenosil-homocisteína. La LpA se determinó mediante un ensayo nefelométrico directo potenciado con partículas de poliestireno recubiertas con gammaglobulina de conejo anti LpA humana.

3.2.6.4 ELISA

El ensayo ELISA (acrónimo del inglés Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) es una técnica basada en la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo, donde uno de los componentes se inmoviliza sobre un soporte sólido y el otro se conjuga con un tercer elemento que le confiere capacidad inmunológica o enzimática; este último se detecta por la adición posterior de un sustrato que produce un color que se mide por espectrofotometría. Se han desarrollado múltiples variantes de ensayos ELISA que permiten la cuantificación de antígenos o anticuerpos en solución. Entre los más comunes están el ELISA directo, el ELISA indirecto, el ELISA «sándwich» y el ELISA inhibidor o competitivo.

En esta investigación el ADMA fue determinado mediante un ELISA competitivo de inhibición compuesto por un anticuerpo de captura no marcado, un competidor biotinilado y un estándar o calibrador (No. de catálogo KSB301Ge11, de Cloud-Clone Corporation). Para la captura se inmovilizó sobre la placa un anticuerpo policlonal de conejo, como competidor biotinilado se utilizaron complejos de acoplamiento ADMA-Albúmina de suero bovino y como calibrador ADMA natural. Tras la adición de la muestra, la detección de los inmunocomplejos se resolvió añadiendo estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante; como sustrato cromogénico se adicionó 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina y para detener la reacción se utilizó ácido sulfúrico; la lectura hizo a 450 nm. Para calcular la concentración de ADMA se realizó una curva de calibración con el rango recomendado por el fabricante del kit.

3.2.6.5 Métodos automatizados

Los parámetros bioquímicos de rutina se midieron en una plataforma modular Cobas c8000 (Roche Diagnostics®). El perfil lipídico (triglicéridos, colesterol total y colesterol-HDL) y el AU se determinaron mediante ensayos enzimáticos colorimétricos. Para la medición de la PCR se utilizó inmunturbidimetría potenciada con partículas. En todos los casos se utilizaron reactivos de la casa comercial Roche. El colesterol-LDL se calculó con la ecuación de Friedewald. El colesterol-no-HDL se determinó por la diferencia entre el colesterol total y el colesterol-HDL.

3.2.6.6 Colorimetría manual

La CATS fue determinada mediante un kit comercial (Nº de catálogo 615700, de Sigma-Aldrich), en un autoanalizador ILab 650 (Diamond Diagnostics Inc). El ensayo está basado en la capacidad de los antioxidantes presentes en la muestra de inhibir la oxidación del sustrato ABTS™ (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenz-thiazolin sulfonate]) a ABTS™(+) por la acción de la metmioglobina, que

es una peroxidasa. La cantidad de producto ABTS™(+) puede cuantificarse leyendo la absorbancia a 600 nm. En las condiciones de reacción utilizadas, los antioxidantes de la muestra provocan la supresión de la absorbancia a 600 nm en un grado proporcional a su concentración.

3.2.6.7 Fluoroimmunoanálisis

La Emisión Amplificada de Criptato Resuelta en el Tiempo (TRACE, Time-Resolved Amplified Cryptate Emission) es una tecnología que aprovecha la transferencia de energía no radiante desde una molécula donante (criptato de europio) a una molécula aceptora (XL665) cuando se completa la reacción inmunológica. La fluorescencia específica que se mide, proporcional a la concentración de antígeno, se obtiene mediante una doble selección: espectral (separación en función de la longitud de onda) y temporal (medición resuelta en el tiempo). La tecnología TRACE permite realizar mediciones en una fase homogénea, proporcionando resultados precisos en un corto tiempo de reacción, haciendo posible el análisis de biomarcadores en la práctica rutinaria del laboratorio. La tecnología TRACE® está disponible exclusivamente en los analizadores KRYPTOR®. Para determinar sFlt-1 y PlGF se utilizó un analizador Brahms Kryptor compact plus (Thermo Fisher Scientific).

3.2.7 Registro de los datos del estudio

Los datos obtenidos de las variables clínicas y la información relevante sobre las visitas y entrevistas fueron registrados en el programa ViewPoint (GE Healthcare GmbH, Germany). El resultado de la medición de la mayoría de los biomarcadores se obtuvo del sistema informático del laboratorio del HCUVA. Los datos brutos de la citometría y su procesamiento hasta conseguir los resultados se gestionaron mediante la aplicación FACSDiva™ Software v8.0.2.

3.2.8 Análisis estadístico de los datos

Para realizar el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS para Windows, versión 15.0.1 (Chicago, Illinois, USA).

Las variables cualitativas fueron descritas según su frecuencia absoluta y porcentaje en cada grupo o subgrupo estudiado. Para comprobar a qué tipo de distribución se ajustaban las variables continuas se aplicó la prueba de Kolmogórov-Smirnov. Las que mostraron una distribución normal ($p \geq 0,05$) se describieron mediante la media y la desviación estándar de la media. Las que no siguieron una distribución normal ($p < 0,05$) se describieron mediante la mediana y el rango intercuartílico.

Se consideraron outliers o valores periféricos aquellos que se separaron más de 1,5 veces el Intercuartil (RIC) a partir de los percentiles 25 y 75; por un lado, se realizaron los cálculos utilizando todos los datos de cada variable; por el otro, se hicieron las mismas operaciones separando los outliers de la distribución. Como no se produjeron modificaciones en la significación de las pruebas, se trabajó con todos los datos.

Las variables cualitativas fueron comparadas mediante la prueba de Chi-cuadrado, con test exacto de Fisher cuando fue relevante. Para comparar las variables cuantitativas entre dos grupos se utilizó la U de Mann Whitney. La prueba de los rangos con signo de Wilcoxon se utilizó para el análisis de muestras relacionadas o apareadas. Para el estudio de asociación entre variables cuantitativas se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman.

La capacidad discriminante de los biomarcadores en relación con el riesgo de PE a término se evaluó mediante curvas de rendimiento diagnóstico (ROC). La comparación de las curvas ROC se llevó a cabo por el método propuesto por Hanley & McNeil (Hanley & McNeil, 1983), con el programa Epidat 3.1 (Galicia, España).

Se realizó un análisis de regresión logística binaria, tomando como variable dependiente el riesgo de PE a término, y como covariables los biomarcadores estudiados. Para ello, se llevó a cabo un análisis multivariado de regresión logística, donde se incluyeron, de entre todas las variables con una $p < 0,15$ en el análisis univariado, aquellas que presentaron un mejor nivel de significación y se consideraron clínicamente importantes para obtener el modelo más reducido posible que explicase los datos, sin compromiso del rendimiento diagnóstico. Para determinar la validez del modelo se realizaron pruebas de calibración y discriminación mediante las pruebas de Hosmer-Lemeshov y el cálculo de la diferencia de áreas.

Para analizar la posible relación entre los biomarcadores (como variables independientes) y la PAM (como variable respuesta, dependiente) se realizó una regresión lineal múltiple.

En todos los contrastes de hipótesis se usó un nivel de significación estadística $p < 0,05$.

3.2.9 Confidencialidad

Los datos de las participantes en el estudio se han almacenado de forma codificada y solo han tenido acceso a ellos los miembros del equipo investigador (facultativos de los servicios de Análisis Clínicos y Ginecología del HCUVA, y profesores del Departamento de Fisiología de la Universidad de Murcia).

3.2.10 Financiación

Este estudio ha sido financiado con fondos de la Fetal Medicine Foundation (UK Charity No: 1037116); del Ministerio de Economía y Competitividad de España, Instituto de Salud Carlos III, Fondo Europeo de Desarrollo Regional "Una manera de hacer Europa" (PI17/01350); y a través del Plan Propio de Ayudas a la Investigación de la Universidad de Murcia R-832-219.

4 Resultados

4.1 Análisis de los grupos de estudio

4.1.1 Características demográficas y clínicas

Se reclutaron un total de 125 embarazadas entre diciembre de 2018 y noviembre de 2019. El grupo con bajo riesgo de PE a término (grupo I) incluyó 57 mujeres y el grupo con alto riesgo (grupo II) estuvo conformado por 68 gestantes. En la Tabla 4.1 se muestran las características demográficas y clínicas de los grupos.

La edad media y gestacional de las participantes fue similar. En el grupo I la edad promedió $32,6 \pm 5,7$ años y las gestaciones fueron de $35,1 [35 - 35,4]$ semanas en el momento de iniciar el estudio; en el grupo II las gestantes tuvieron $32,8 \pm 6,4$ años de promedio, con embarazos de $35,4 [35,3 - 35,7]$ semanas. Como se observa en la Tabla 4.2, el porcentaje de participantes con más de 35 años fue parecido en ambos grupos, siendo del 42,1% en el grupo con bajo riesgo y del 44,1% en el grupo con alto riesgo.

Las mujeres del grupo control tuvieron una talla mayor que las del grupo de alto riesgo, $1,63 [1,60 - 1,66]$ m vs $1,60 [1,57 - 1,64]$ m; y pesaron aproximadamente 3 kg menos, aunque la diferencia no fue significativa. En cuanto al IMC, que relaciona el peso y la estatura en una sola magnitud, se registraron valores significativamente menores en el grupo I que en el grupo II, $28,1 \pm 3,2$ kg/m² vs $30,1 \pm 4,7$ kg/m², respectivamente. Al clasificar las gestantes en función de esta variable, como se detalla en la Tabla 4.3, detectamos que 11 (19,3%) embarazadas del grupo control tuvieron un IMC < 25 kg/m², mientras que entre las de alto riesgo apenas 8 mujeres (11,8%) cumplió esta condición. Por otro lado, 13 (22,8%) gestantes del grupo control tuvieron un IMC > 30 kg/m², mientras que en el grupo con alto riesgo fueron 30 (44,1%) las mujeres que superaron este valor.

Entre las 125 mujeres reclutadas, solo dos no fueron de raza blanca, ambas pertenecientes al grupo de alto riesgo de PE a término.

El consumo de tabaco fue mayor en las mujeres del grupo control que en las del grupo de alto riesgo, 10 (17,5%) vs 5 (7,4%), aunque esta diferencia no fue significativa. Ninguna de las participantes consumió alcohol ni drogas.

En el grupo con alto riesgo de PE a término hubo un porcentaje significativamente mayor de mujeres nulíparas (69,1%), en relación con el grupo control (50,9%).

Por otro lado, 8 (11,8%) gestantes del grupo con alto riesgo tuvieron antecedentes familiares de PE, mientras que en el grupo de bajo riesgo solo en una mujer (1,8%) se constató esta situación.

No se encontraron diferencias significativas en las comorbilidades investigadas, a pesar de que en el grupo con alto riesgo fueron más frecuentes, el doble que en el grupo control.

Se utilizaron técnicas de reproducción asistida en más embarazos del grupo con riesgo que en el grupo control, 12 (17,6%) vs 6 (10,5%), aunque para esta variable las diferencias no fueron significativas.

La PAM estuvo más elevada en las participantes con alto riesgo de PE que en las del grupo control, 95,5 [91,0 - 100,2] mmHg vs 86,3 [79,1 - 89,9] mmHg, respectivamente. Los MoM de la PAM tuvieron la misma tendencia y significación.

El tratamiento con aspirina a dosis baja fue mucho mayor entre las mujeres con alto riesgo, 21 (30,9%), que en las del grupo control, 3 (5,3%).

No se encontraron diferencias significativas en el UtA-PI entre los grupos, ni en los MoM calculados para esta variable.

El 11,8% de los embarazos con riesgo desarrolló diabetes gestacional, mientras que solo el 1,8% lo hizo en el grupo control.

En el grupo con alto riesgo de PE, 11 (16,2%) gestantes desarrollaron hipertensión inducida por el embarazo y 7 (10,3%) tuvieron PE, diagnosticada en el momento del parto. Sin embargo, ninguna gestante del grupo control tuvo trastornos hipertensivos.

En las pacientes con bajo riesgo, el 70,2% del trabajo de parto se inició de forma espontánea y un 64,9% de los partos fue vaginal. Como era de esperar, en el grupo con alto riesgo se produjo un porcentaje mayor de inducciones (50%), con un 44% de partos vaginales.

No se encontraron diferencias en la edad gestacional en el momento del parto, ni en el peso de los recién nacidos entre los grupos.

Tabla 4.1

Características demográficas y clínicas basales de los grupos con bajo y alto riesgo de preeclampsia a término

Característica	Bajo riesgo (n=57)	Alto riesgo (n=68)	Significación estadística (p)
<i>Datos demográficos y epidemiológicos</i>			
Edad (años)	32,6 ± 5,7	32,8 ± 6,4	0,760
Estatura (m)	1,63 [1,60 - 1,66]	1,60 [1,57 - 1,64]	0,044
Peso (kg)	73,5 [67,5 - 79,2]	76,25 [70 - 84,9]	0,152
IMC (kg/m ²)	28,1 ± 3,2	30,1 ± 4,7	0,016
Raza blanca	57 (100)	66 (97,1)	0,294
Hábito de fumar	10 (17,5)	5 (7,4)	0,071
Nuliparidad	29 (50,9)	47 (69,1)	0,029
Historia familiar de PE	1 (1,8)	8 (11,8)	0,031
<i>Comorbilidades:</i>			
Lupus eritematoso sistémico	1 (1,8)	0	0,456
Síndrome antifosfolípido	1 (1,8)	1 (1,5)	0,706
Diabetes mellitus	0	1 (1,5)	0,544
Hipertensión arterial crónica	0	2 (2,9)	0,294
<i>Datos clínicos del embarazo</i>			
Conseguido por reproducción asistida	6 (10,5)	12 (17,6)	0,192
Edad gestacional (semanas)	35,1 [35 - 35,4]	35,4 [35,3 - 35,7]	<0,001
Riesgo de PE (1 en)	292 [102 - 876]	9 [6 - 15]	<0,001
Presión arterial media (mmHg)	86,3 [79,1 - 89,9]	95,5 [91,0 - 100,2]	<0,001
Presión arterial media (MoM)	0,97 ± 0,08	1,07 ± 0,08	<0,001
Consumo de aspirina en dosis bajas	3 (5,3)	21 (30,9)	<0,001
IP de la arteria uterina	0,68 [0,6 - 0,81]	0,69 [0,6 - 0,86]	0,392
IP de la arteria uterina (MoM)	0,95 [0,83 - 1,13]	0,99 [0,85 - 1,16]	0,319
Diabetes mellitus gestacional	1 (1,8)	8 (11,8)	0,031
Hipertensión inducida por el embarazo	0	11 (16,2)	-
Desarrollo de PE	0	7 (10,3)	-
<i>Resultados del embarazo</i>			
Inicio del trabajo de parto			
Espontáneo	40 (70,2)	30 (44,1)	0,004
Inducido	12 (21,1)	34 (50)	0,001
Sin trabajo	5 (8,7)	4 (5,9)	0,535
Tipo de parto			
Vaginal	37 (64,9)	30 (44,1)	0,021
Cesárea	12 (21,1)	21 (30,9)	0,216
Instrumental	8 (14)	17 (25)	0,128
Edad gestacional al parto (semanas)	39,9 [39,3 - 40,6]	39,8 [39,1 - 40,4]	0,517
Peso al nacer (g)	3360 [3052 - 3577]	3218 [2929 - 3537]	0,311

Nota. Los datos están expresados como media ± desviación estándar, mediana [rango intercuartílico] o número (porcentaje). IMC, índice de masa corporal; MoM, múltiplos de la mediana; IP, índice de pulsatilidad.

Tabla 4.2*Distribución de las gestantes en función de la edad media a la que se produjo el embarazo*

Edad (años)	Bajo riesgo de PE a término		Alto riesgo de PE a término	
	n	%	n	%
<35	33	57,9	38,0	55,9
≥35	24	42,1	30,0	44,1
Total	57	100,0	68,0	100,0

*Nota. El valor de corte fue de 35 años.***Tabla 4.3***Clasificación de las gestantes en función del índice de masa corporal*

Clasificación	IMC kg/m ²	Bajo riesgo de PE		Alto riesgo de PE	
		n	%	n	%
Peso normal	18,5 - 24,9	11	19,3	8	11,8
Sobrepeso o pre-Obeso	25 - 29,9	33	57,9	30	44,1
Obesidad grado I o moderada	30 - 34,9	11	19,3	20	29,4
Obesidad grado II o severa	35 - 39,9	2	3,5	6	8,8
Obesidad grado III o mórbida	≥40	0	-	4	5,9
Total		57	100	68	100

Nota. IMC, índice de masa corporal.

4.1.2 Biomarcadores

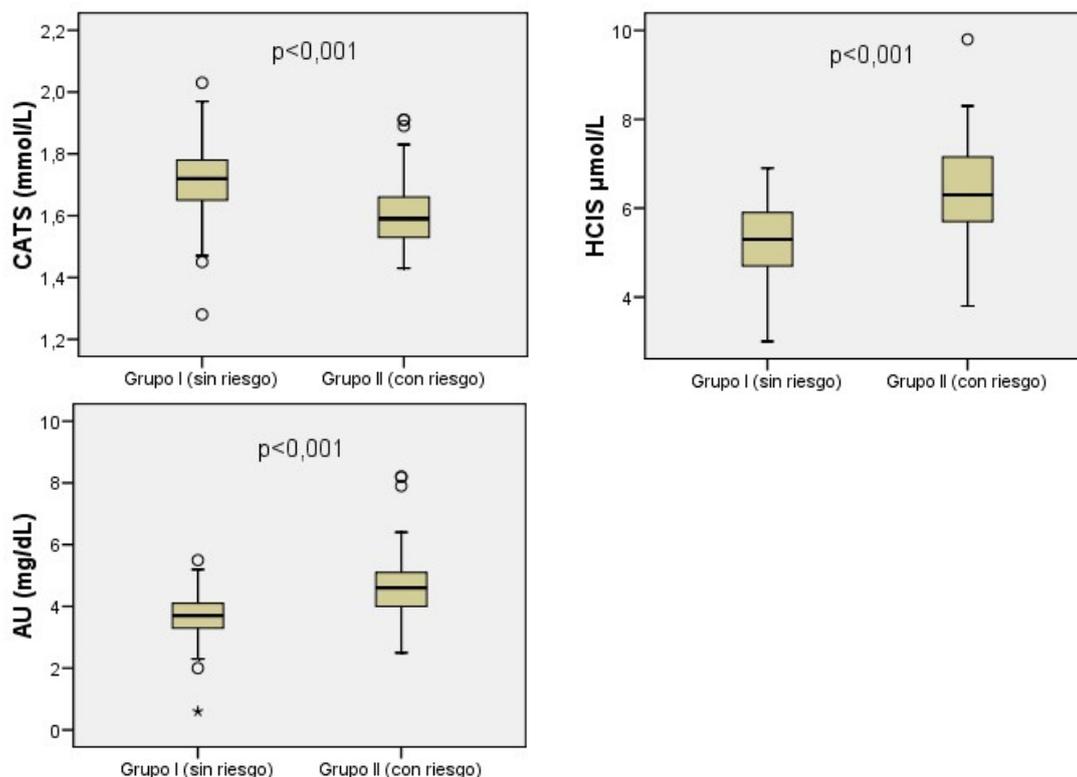
Los valores de los biomarcadores de estrés oxidativo, inflamación, angiogénesis, función endotelial y el perfil lipídico, medidos en los grupos con bajo y alto riesgo de PE a término se recogen en el Anexo IX, Tabla A.1.

4.1.2.1 Biomarcadores de estrés oxidativo

Como se muestra en la Figura 4.1, todos los biomarcadores de estrés oxidativo analizados mostraron diferencias significativas entre los grupos estudiados ($p < 0,001$). La CATS en las gestantes con bajo riesgo fue de 1,72 [1,64 - 1,88] mmol/L, mientras que en las embarazadas con alto riesgo fue significativamente menor, 1,59 [1,53 - 1,66] mmol/L. Por el contrario, la HCIS fue más baja en el grupo control que en el grupo con riesgo, 5,3 [4,7 - 5,9] μ mol vs 6,3 [5,7 - 7,17] μ mol/L. La misma tendencia siguió el AU, que alcanzó valores de 3,7 [3,25 - 4,1] mg/dL y de 4,6 [4 - 5,1] mg/dL, en las gestantes con bajo y alto riesgo de PE, respectivamente.

Figura 4.1

Biomarcadores de estrés oxidativo medidos en los grupos con bajo y alto riesgo de PE a término



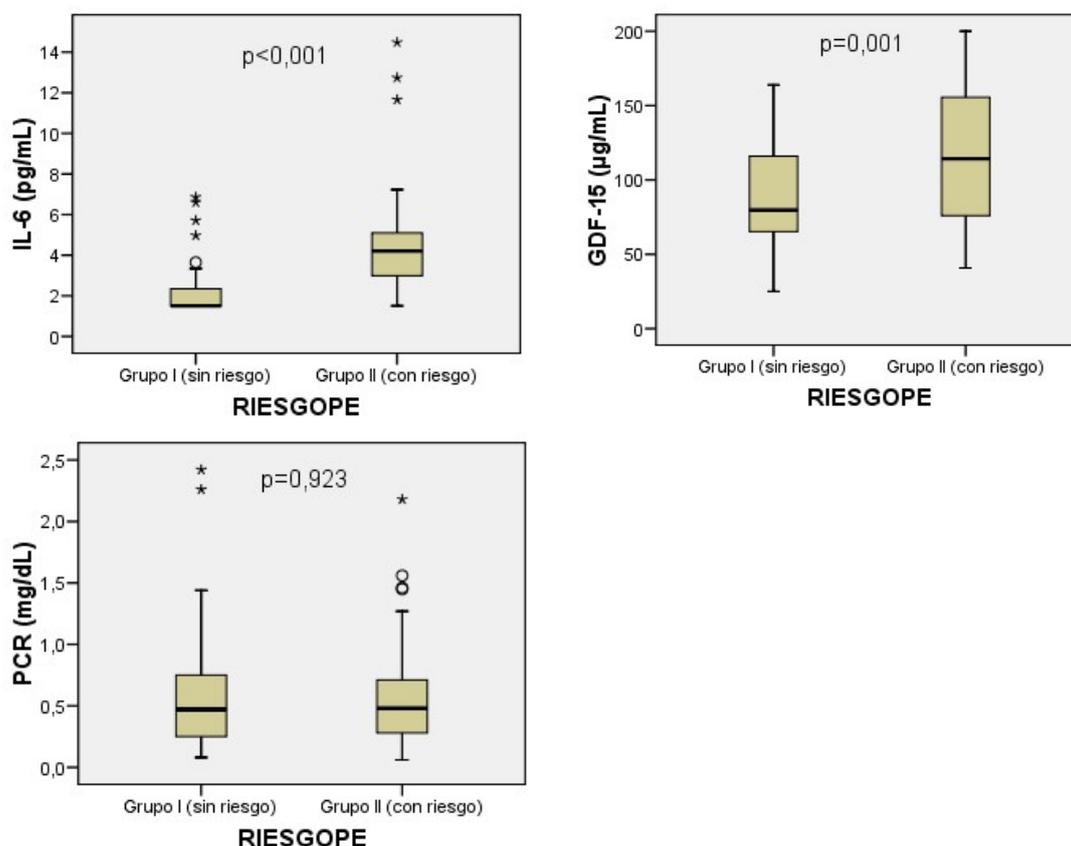
Nota. Las líneas dentro de las cajas representan los valores de la mediana, las líneas superiores e inferiores de las cajas representan los percentiles 25 y 75, respectivamente, y las barras superiores e inferiores fuera de las cajas representan los percentiles 10 y 90, respectivamente. CATS, capacidad antioxidante total del suero; HCIS, homocisteína; AU, ácido úrico.

4.1.2.2 Biomarcadores de inflamación

Los biomarcadores de inflamación se representan en la Figura 4.2. Como se observa, se registró casi el triple de los niveles de IL-6 en el grupo de alto riesgo que en el grupo control, 4,2 [2,95 - 5,15] pg/mL vs 1,5 [1,5 - 2,36] pg/mL, $p < 0,001$, respectivamente. También encontramos niveles de GDF-15 más altos en las gestantes con riesgo, 114,2 [75,1 - 159,8] μ g/mL, al compararlos con el grupo control, 79,7 [64,7 - 117,6] μ g/mL, $p = 0,001$. Sin embargo, la medición de la PCR en el grupo con alto riesgo, 0,48 [0,27 - 0,70] mg/dL, y en el grupo con bajo riesgo, 0,47 [0,25 - 0,76] mg/dL, no mostró diferencias significativas, $p = 0,923$.

Figura 4.2

Biomarcadores de inflamación medidos en los grupos con bajo y alto riesgo de PE a término



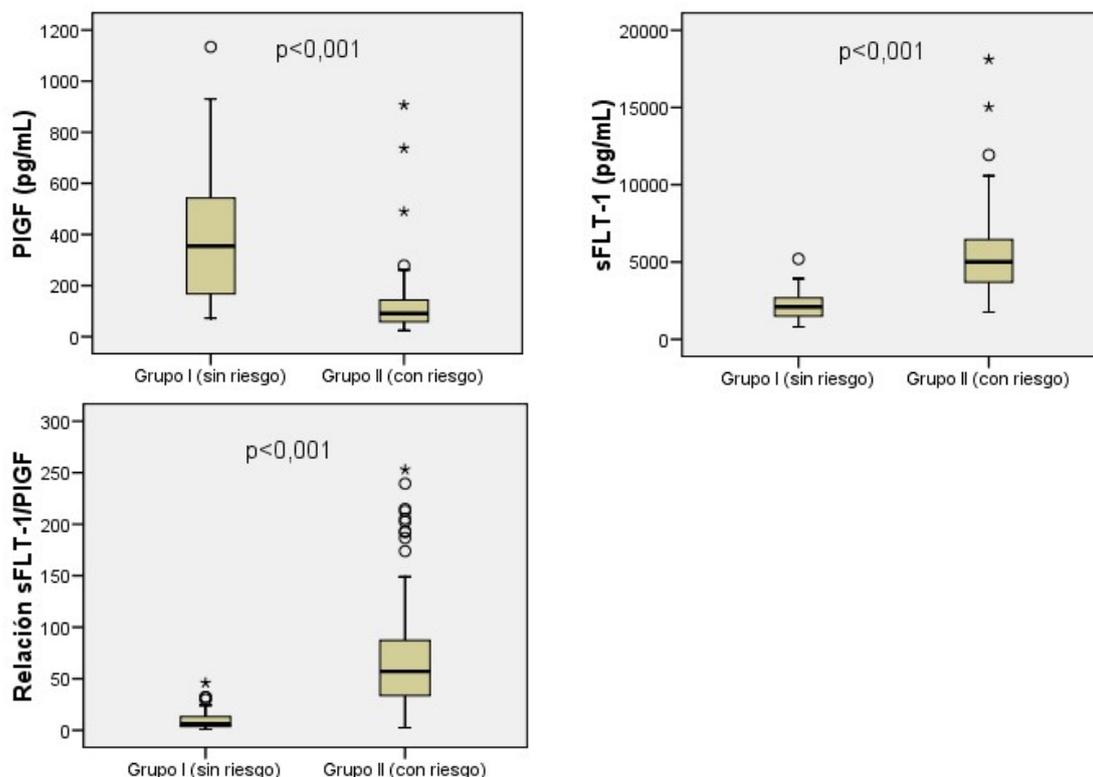
Nota. IL-6, Interleuquina 6; GDF-15, factor de diferenciación del crecimiento 15; PCR, proteína C reactiva. Los datos se representan como se describe en el pie de la Figura 4.1.

4.1.2.3 Biomarcadores angiogénicos

En la Figura 4.3, donde están representados gráficamente los biomarcadores angiogénicos, puede comprobarse que las dos variables siguieron la tendencia esperada. Los niveles de PIGF fueron casi 4 veces más altos en el grupo con bajo riesgo, 354,7 [165,5 - 546,3] pg/mL, que en el de alto riesgo de PE, 91 [57,2 - 146,6] pg/mL, $p < 0,001$; mientras que los de sFlt-1 fueron la mitad en el grupo control, 2090 [1489 - 2689] pg/mL, que en el grupo con riesgo, 5011 [3683,2 - 6478,7] pg/mL. La relación sFlt-1/PIGF de las embarazadas con riesgo de PE fue 10 veces mayor que la obtenida para el grupo control. Los MoM de ambos biomarcadores tuvieron un comportamiento congruente con el observado en cada variable (Anexo IX, Tabla A.1).

Figura 4.3

Biomarcadores angiogénicos medidos en los grupos con bajo y alto riesgo de PE a término



Nota. PIGF, Factor de crecimiento placentario; sFlt-1, Forma soluble de la tirosina quinasa tipo 1 similar al FMS. Los datos se representan como se describe en el pie de la Figura 4.1.

4.1.2.4 Biomarcadores de función endotelial

Para evaluar la función endotelial se analizaron el fenotipo y la concentración de las MVs presentes en el plasma de las gestantes del estudio, así como los niveles de ADMA. Los datos de estos biomarcadores están recogidos en la Tabla A.1 del Anexo IX.

En la Figura 4.4 se representan las concentraciones totales de las MVs anexina V+ y la distribución de los distintos tipos analizados según su origen celular, en los grupos I y II.

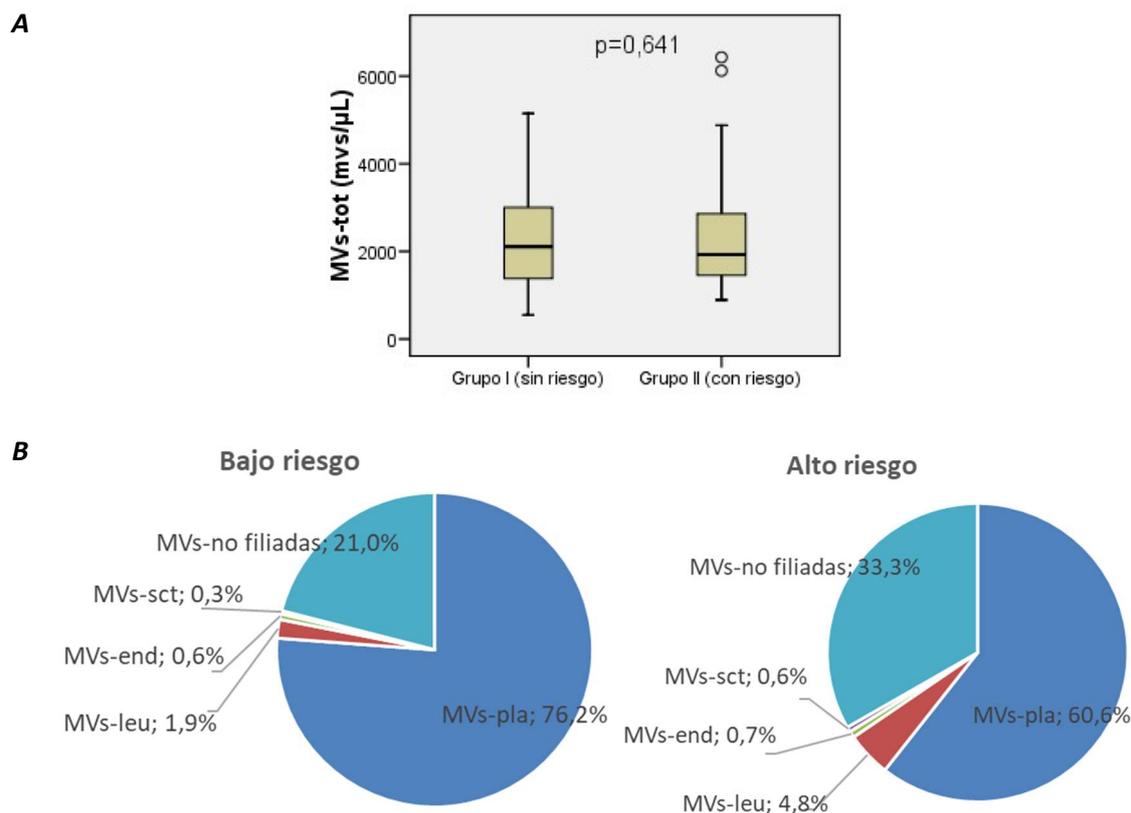
Las MVs anexina V+ no mostraron cambios estadísticamente significativos entre los grupos I y II (Figura 4.4-A); en las gestantes con bajo riesgo se midieron 2108 [1382 - 3017] mvs/ μ L y en el grupo con alto riesgo 2153 [1471 - 3026] mvs/ μ L, $p=0,641$. Sin embargo, entre los diferentes tipos de MVs investigadas si se registraron variaciones significativas.

Las MVs anexina V+ más representadas en ambos grupos se originaron a partir de las plaquetas y las detectadas en menor cuantía fueron liberadas por el endotelio y el sincitiotrofoblasto (Figura 4.4-B). En el grupo con bajo riesgo las MVs-pla fueron aproximadamente el 76,2% del total de MVs, mientras que en las pacientes con riesgo este porcentaje fue inferior, 60,6%. Por

otro lado, las MVs-leu no llegaron al 2% en las pacientes del grupo control, mientras que en las participantes con riesgo alcanzaron aproximadamente un 4,8% del total. El porcentaje de MVs no filiadas fue de un 21% en el grupo control, y de un 33,3% en el grupo con alto riesgo de PE a término.

Figura 4.4

Comparación de la concentración total y la distribución de diferentes poblaciones de MVs en el plasma de las pacientes con bajo y alto riesgo de PE a término.



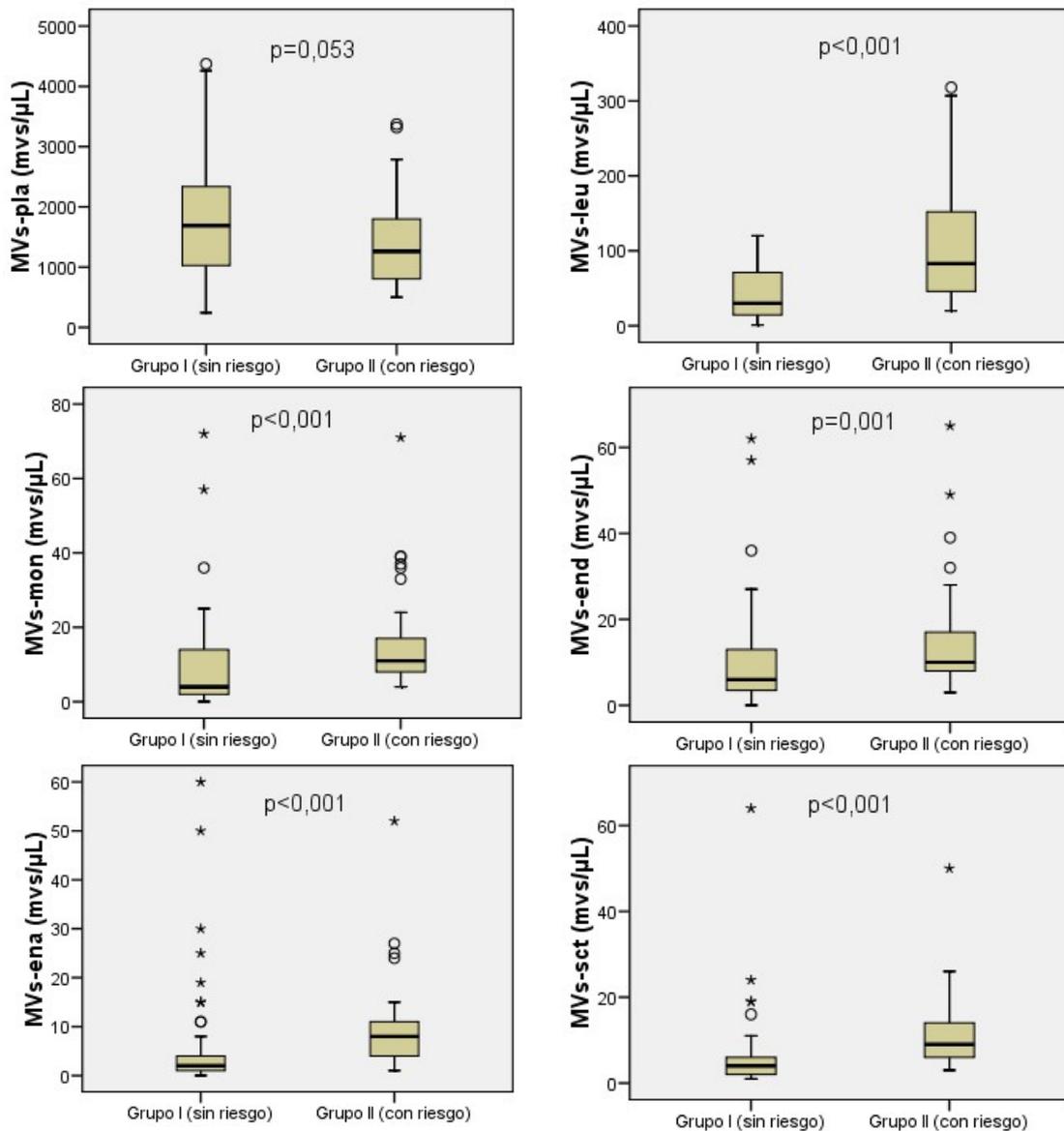
Nota. A: MVs totales anexina V+ en los grupos con bajo y alto riesgo de PE; MVs-tot, total de MVs anexina V+. Los datos se representan como se describe en el pie de la Figura 4.1. B: Distribución de las MVs en el plasma de las pacientes con bajo y alto riesgo de PE a término; MVs-pla, MVs de plaquetas; MVs-leu, MVs leucocitarias; MVs-end, MVs de células endoteliales; MVs-sct, MVs de sincitiotroblasto.

En la Figura 4.5 están representados en diagramas de cajas y bigotes los valores de las distintas poblaciones de MVs. Al analizar las MVs liberadas por las plaquetas, las encontramos en mayor concentración en el grupo control, 1685 [1017 - 2374] mvs/ μ L, que en el de alto riesgo de PE a término, 1283 [839 - 1813] mvs/ μ L, aunque esta diferencia no alcanzó la significación estadística, $p=0,053$. Sin embargo, al comparar los grupos I y II, encontramos en el grupo con riesgo: aproximadamente el triple de MVs leucocitarias, 89 [47 - 159] mvs/ μ L vs 30 [14 - 71] mvs/ μ L, $p<0,001$; tres veces más MVs monocíticas, 12 [8 - 18] mvs/ μ L vs 4 [2 - 15] mvs/ μ L, $p<0,001$; casi el doble de MVs-end, 10 [8 - 17] mvs/ μ L vs 6 [3 - 14] mvs/ μ L, $p=0,001$; cuatro veces

más MVs-ena, 8 [4 - 11] mvs/ μ L vs 2 [1 - 4] mvs/ μ L, $p < 0,001$; y el doble de las MVs-sct, 9 [6 - 14] mvs/ μ L vs 4 [2 - 6] mvs/ μ L, $p < 0,001$.

Figura 4.5

Concentración de diferentes poblaciones de MVs en los grupos con bajo y alto riesgo de PE a término

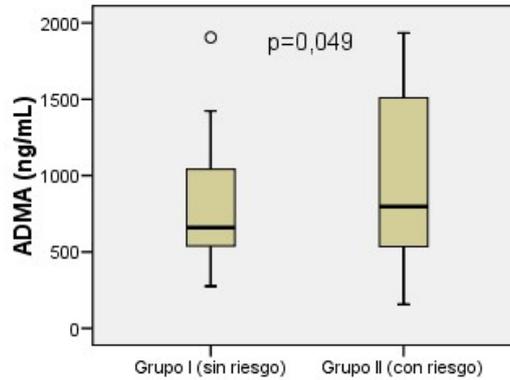


Nota. MVs-pla, MVs de plaquetas; MVs-leu, MVs leucocitarias; MVs-mon, MVs de monocitos; MVs-end, MVs de células endoteliales; MVs-ena, MVs de células endoteliales activadas; MVs-sct, MVs de sincitiotrofoblasto. Los datos se representan como se describe en el pie de la Figura 4.1.

Finalmente, en la Figura 4.6 se encuentran los valores de ADMA medidos en los grupos del estudio, donde se aprecia que fueron más altos en los embarazos con riesgo, 786 [502 - 1497] ng/mL, que en los del grupo control, 657 [537 - 991] ng/mL, $p = 0,049$.

Figura 4.6

Concentración de ADMA medida en los grupos con bajo y alto riesgo de PE a término



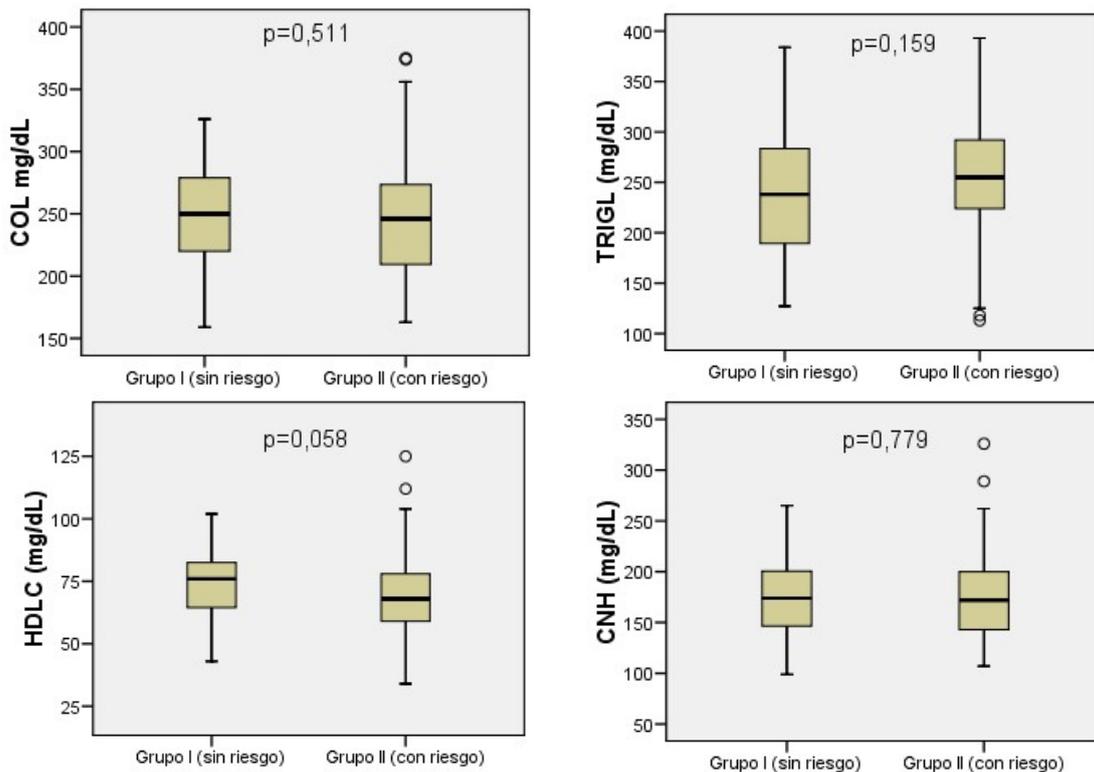
Nota. ADMA, Dimetil arginina asimétrica. Los datos se representan como se describe en el pie de la Figura 4.1.

4.1.2.5 Biomarcadores de dislipemia

No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los biomarcadores de esta categoría analizados entre el grupo con bajo riesgo y el grupo con alto riesgo de PE a término (Tabla A.1 del Anexo IX). En la Figura 4.7 están representadas las variables investigadas del perfil lipídico.

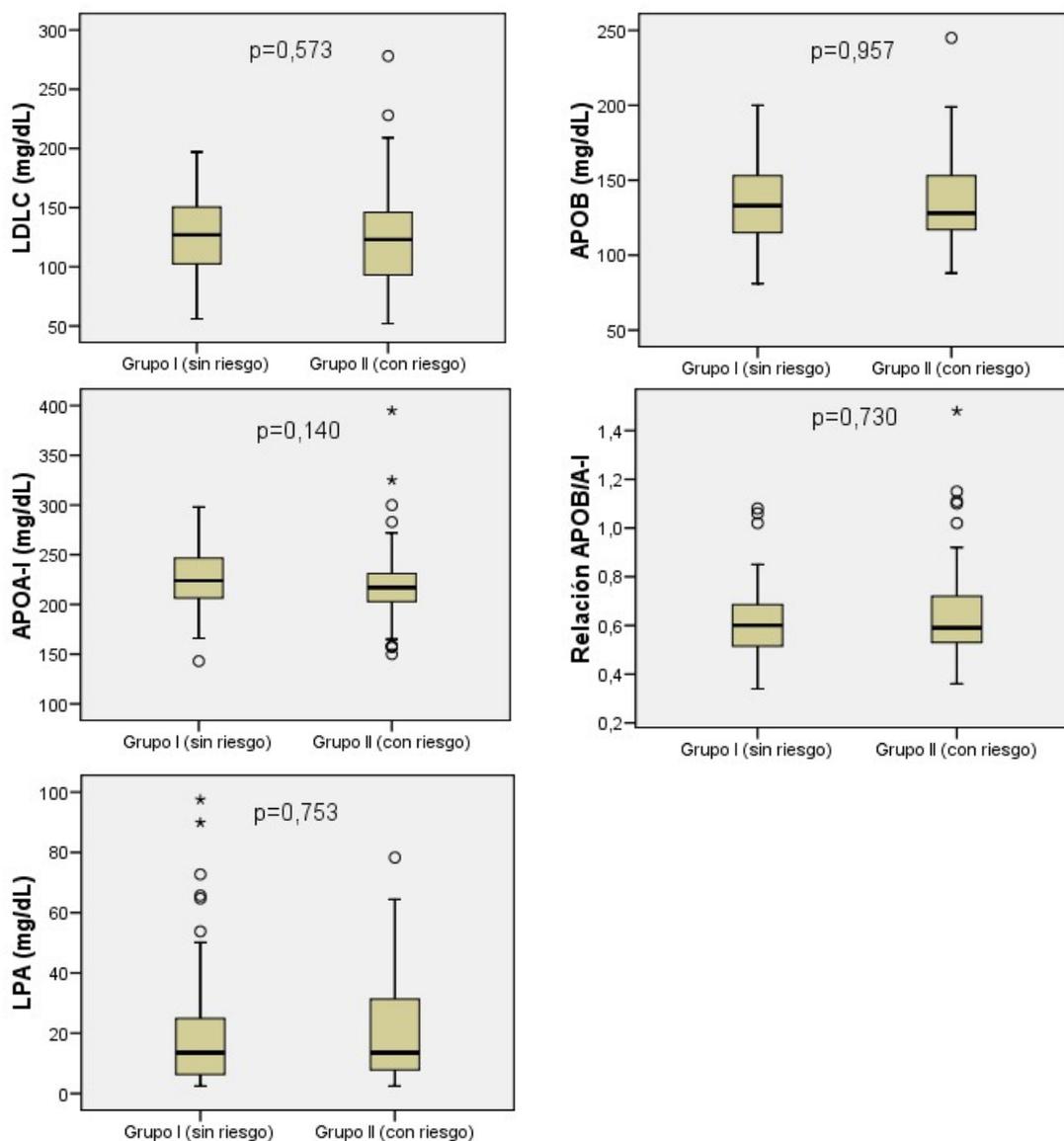
Figura 4.7

Biomarcadores de dislipemia medidos en los grupos con bajo y alto riesgo de preeclampsia a término



(continúa en la página siguiente)

Figura 4.7
(continuación de la página anterior)



Nota. COL, Colesterol total; TRIGL, Triglicéridos; HDLC, Colesterol-HDL; CNH, Colesterol-no-HDL; LDLC, Colesterol-LDL; APOB, Apolipoproteína B; APOA-I, Apolipoproteína A-I; LPA, Lipoproteína A. Los datos se representan como se describe en el pie de la Figura 4.1.

4.1.3 Análisis de las pacientes que desarrollaron preeclampsia

Para estudiar las características clínicas y los biomarcadores en las participantes que desarrollaron PE analizamos por separado las 61 gestantes de alto riesgo que no enfermaron y las 7 que sufrieron PE. En las Tablas 4.4 y 4.5 se recogen los resultados correspondientes a este abordaje de la información obtenida a partir de la muestra investigada.

Sobre el comportamiento de las variables clínicas, el dato más relevante encontrado fue la diferencia significativa que exhibió la PAM, que alcanzó los 101,1 [96,6 - 107,8] mmHg entre las

que desarrollaron PE posteriormente, mientras que fue de tan solo 94,6 [91 - 98,7] mmHg entre las que no la tuvieron, $p=0,048$ (Tabla 4.4). Los MoM de esta variable tuvieron el mismo comportamiento.

También se alcanzó una diferencia estadísticamente significativa en el hábito de fumar, debido a que 3 embarazadas (43,9%) con hábito tabáquico desarrollaron PE, mientras que solo 2 mujeres (3,3%) entre las que no tuvieron PE fumaron durante el embarazo.

Otra variable clínica que mostró diferencias entre las gestantes que desarrollaron o no PE fue la cantidad de partos inducidos, que fue porcentualmente mayor entre las preeclámpticas (85,7%) que entre las que no enfermaron (45,9%).

Entre los biomarcadores evaluados también encontramos cambios significativos y tendencias de interés en las gestantes de alto riesgo que desarrollaron PE (Tabla 4.5).

En las gestantes con PE se detectaron niveles más altos de IL-6 ($\approx 19\%$) y de PCR ($\approx 21\%$) que en aquellas con riesgo que no enfermaron, aunque no se alcanzó la significación estadística.

Entre los biomarcadores de función endotelial se evidenciaron cambios significativos en el número de MVs de origen leucocitario, que aumentaron al doble entre las gestantes preeclámpticas, 173 [88 - 255] mvs/ μL , en comparación con las de alto riesgo que no tuvieron la enfermedad, 83 [45 - 152] mvs/ μL , $p=0,033$. Otros dos biomarcadores de esta categoría que mostraron una tendencia al alza fueron las MVs-tot y el ADMA, que se incrementaron en las mujeres con PE aproximadamente un 71% y un 60%, respectivamente, sin significación estadística.

En el perfil lipídico encontramos un mayor valor en la relación ApoB/ApoAI en las 7 participantes con PE, 0,78 [0,58 - 0,89], que en los embarazos con riesgo que no desarrollaron la enfermedad, 0,58 [0,50 - 0,71], $p=0,045$. Además, en los casos con PE se obtuvieron valores mayores de LpA ($\approx 31\%$), y niveles de colesterol-HDL más bajos ($\approx 13\%$), aunque para estos marcadores no se alcanzó la significación estadística.

Tabla 4.4

Características demográficas y clínicas basales del grupo con alto riesgo de preeclampsia a término en función del desarrollo o no de preeclampsia

Característica	Alto riesgo (no PE) (n=61)	Alto riesgo (PE) (n=7)	Significación estadística (p)
<i>Datos demográficos y epidemiológicos</i>			
Edad (años)	32,6 ± 6,35	34,8 ± 6,84	0,280
Estatura (m)	1,60 [1,57 - 1,64]	1,63 [1,58 - 1,70]	0,188
Peso (kg)	76 [70,0 - 84,9]	78 [69,8 - 93,4]	0,586
IMC (kg/m ²)	29,9 ± 4,60	31,17 ± 5,60	0,657
Raza blanca	59 (96,7)	7 (100)	0,629
Hábito de fumar	2 (3,3)	3 (42,9)	<0,001
Nuliparidad	42 (68,9)	5 (71,4)	0,890
Historia familiar de PE	6 (9,8)	2 (28,6)	0,148
<i>Comorbilidades:</i>			
Lupus eritematoso sistémico	0	0	-
Síndrome antifosfolípido	1 (1,6)	0	-
Diabetes mellitus	1 (1,6)	0	-
Hipertensión arterial crónica	2 (3,3)	0	-
<i>Datos clínicos del embarazo</i>			
Conseguido por reproducción asistida	9 (14,8)	3 (42,9)	0,067
Edad gestacional (semanas)	35,4 [35,3 - 35,7]	35,4 [35,3 - 35,6]	0,847
Riesgo de PE (1 en)	10 [6 - 15]	9 [2 - 13]	0,241
Presión arterial media (mmHg)	94,6 [91 - 98,7]	101,1 [96,6 - 107,8]	0,048
Presión arterial media (MoM)	1,06 ± 0,07	1,12 ± 0,11	0,043
Consumo de aspirina en dosis bajas	18 (29,5)	3 (42,9)	0,472
IP de la arteria uterina	0,69 [0,6 - 0,87]	0,72 [0,53 - 0,85]	0,785
IP de la arteria uterina (MoM)	0,99 [0,85 - 1,17]	0,99 [0,73 - 1,14]	0,754
Diabetes mellitus gestacional	7 (11,5)	1 (14,2)	0,348
Hipertensión inducida por el embarazo	10 (16,4)	1 (14,3)	0,887
Desarrollo de PE	0	7	-
<i>Resultados del embarazo</i>			
Inicio del trabajo de parto			
Espontáneo	29 (47,5)	1 (14,3)	0,096
Inducido	28 (45,9)	6 (85,7)	0,048
Sin trabajo	4 (6,6)	0	0,488
Tipo de parto			
Vaginal	28 (45,9)	2 (28,6)	0,385
Cesárea	17 (27,9)	4 (57,1)	0,115
Instrumental	16 (26,2)	1 (14,3)	0,493
Edad gestacional al parto (semanas)	40 [38,9 - 40,4]	39,7 [39,1 - 40,3]	0,723
Peso al nacer (g)	3200 [2897 - 3547]	3310 [2970 - 3530]	0,579

Nota. Los datos están expresados como media ± desviación estándar, mediana [rango intercuartílico] o número (porcentaje). IMC, índice de masa corporal; MoM, múltiplos de la mediana; IP, índice de pulsatilidad.

Tabla 4.5

Biomarcadores medidos en el grupo con alto riesgo de preeclampsia a término en función del desarrollo o no de preeclampsia

Biomarcador	Alto riesgo (no PE) (n=61)	Alto riesgo (PE) (n=7)	Significación estadística (p)
<i>Estrés oxidativo</i>			
CATS (mmol/L)	1,59 [1,53 - 1,66]	1,59 [1,53 - 1,75]	0,492
HCIS (μmol/L)	6,3 [5,7 - 7,1]	6,5 [4,5 - 8]	0,976
AU (mg/dL)	4,6 [4 - 5,1]	5 [4,5 - 5,8]	0,298
<i>Inflamación</i>			
IL-6 (pg/mL)	4,1 [2,84 - 5,09]	4,87 [3,12 - 7,23]	0,252
GDF-15 (μg/mL)	117 [74,8 - 145,1]	99,9 [80,6 - 200]	0,455
PCR (mg/dL)	0,47 [0,27 - 0,70]	0,57 [0,26 - 0,77]	0,642
<i>Angiogénesis</i>			
PIGF (pg/mL)	88,6 [56,3 - 130,7]	122,6 [77,7 - 489,9]	0,161
PIGF MoM	0,32 [0,23 - 0,56]	0,45 [0,33 - 1,11]	0,173
sFlt-1 (pg/mL)	5027 [3723 - 6452]	4902 [1972 - 7259]	0,391
sFlt-1 (MoM)	2,10 [1,72 - 2,84]	2,06 [1,02 - 5,33]	0,635
Relación sFlt-1/PLGF	58,1 [35,8 - 87,3]	23,5 [3,9 - 134,3]	0,308
<i>Función endotelial</i>			
MVs-tot (mvs/μL)	1872 [1448 - 3019]	3197 [2223 - 3737]	0,053
MVs-pla (mvs/μL)	1262 [787 - 1797]	1337 [1126 - 2358]	0,321
MVs-leu (mvs/μL)	83 [45 - 152]	173 [88 - 255]	0,033
MVs-mon (mvs/μL)	12 [8 - 18]	11 [9 - 15]	0,725
MVs-end (mvs/μL)	10 [8 - 16]	10 [6 - 21]	0,989
MVs-ena (mvs/μL)	8 [4 - 11]	7 [4 - 10]	0,591
MVs-sct (mvs/μL)	9 [6 - 14]	9 [6 - 12]	0,648
ADMA (ng/mL)	787 [502 - 1498]	1269,5 [641,5 - 1862]	0,189
<i>Marcadores de dislipemia</i>			
Colesterol total (mg/dL)	245 [205 - 276]	253 [211 - 266]	0,960
Triglicéridos (mg/dL)	258 [226 - 303,5]	248 [137 - 263]	0,328
Colesterol-HDL (mg/dL)	68 [58 - 78]	59 [45 - 74]	0,176
Colesterol-no-HDL (mg/dL)	172 [143,2 - 200,7]	177 [149 - 210]	0,579
Colesterol-LDL (mg/dL)	121 [90,5 - 147,25]	124 [119 - 159]	0,315
ApoB (mg/dL)	126 [110 - 155]	137 [118 - 161]	0,486
ApoAI (mg/dL)	218 [203,5 - 232]	200 [158 - 226]	0,056
Relación ApoB/ApoAI	0,58 [0,50 - 0,71]	0,78 [0,58 - 0,89]	0,045
LpA (mg/dL)	13 [7,6 - 32,2]	17,1 [4,8 - 31,3]	0,984

Nota. Los datos están expresados como mediana [rango intercuartílico]. Nota. CATS, capacidad antioxidante total del suero; HCIS, homocisteína; AU, ácido úrico; IL-6, Interleuquina 6; GDF-15, factor de diferenciación del crecimiento 15; PCR, proteína C reactiva; PIGF, factor de crecimiento placentario; MoM, múltiplos de la mediana; sFlt-1, forma soluble de la tirosina quinasa tipo 1 similar al FMS; MVs-tot, total de MVs anexina V+; MVs-pla, MVs de plaquetas; MVs-leu, MVs leucocitarias; MVs-mon, MVs de monocitos; MVs-end, MVs de células endoteliales; MVs-ena, MVs de células endoteliales activadas; MVs-sct, MVs de sincitiotrofoblasto; ADMA, dimetil arginina asimétrica; ApoB, apolipoproteína B; ApoAI, apolipoproteína AI; LpA, lipoproteína A.

4.1.4 Análisis del rendimiento de los biomarcadores

La Tabla 4.6 contiene los indicadores estadísticos básicos de los biomarcadores. En primer lugar, se analizó el índice de Youden, que alcanzó su mayor valor en la IL-6 (0,66); este índice es una medida de la eficiencia del biomarcador que combina sensibilidad y especificidad, refleja la diferencia entre la tasa de verdaderos positivos y la de falsos positivos, y cuanto más cercano a 1 mejor es la prueba. A continuación, fueron definidos los puntos de corte de cada variable, que tienen gran importancia porque permiten definir la positividad o negatividad del resultado y determinan la sensibilidad y especificidad del biomarcador; en este caso se establecieron para que la sensibilidad y la especificidad se comportaran de la mejor forma posible; por ejemplo, para la IL-6, un punto de corte de 2,59 pg/mL, rindió valores altos de sensibilidad (85,3%) y especificidad (80,7%) en la valoración del riesgo de PE a término.

La variable con mayor capacidad para detectar embarazos con riesgo fue la concentración de MVs-Mon, que alcanzó una sensibilidad del 97,1%. La variable que tuvo más capacidad para identificar como embarazos sin riesgo a los que efectivamente estaban en esta situación fue el ADMA, que alcanzó un 94,7% de especificidad. El índice de validez, que es la proporción de individuos clasificados correctamente con la prueba, superó el 80% para el AU (83,54%) y la IL-6 (81,16%).

Tabla 4.6

Indicadores estadísticos básicos de los biomarcadores

Biomarcador	IY	PC	S (%)	E (%)	IV	VPP (%)*	VPN (%)*	RV+	RV-
CATS (mmol/L)	0,49	1,68	80,9	68,4	69,97	22,2	97,0	2,56	0,28
HCIS (μmol/L)	0,46	5,95	69,1	77,2	73,38	25,2	95,7	3,03	0,4
AU (mg/dL)	0,48	4,35	61,8	86,0	83,54	32,8	95,3	4,4	0,44
IL-6 (pg/mL)	0,66	2,59	85,3	80,7	81,16	32,9	98,0	4,42	0,18
GDF-15 (μg/mL)	0,29	89,70	67,6	61,4	62,03	16,3	95,0	1,75	0,53
MVC-leu (mvs/μL)	0,49	33,5	94,1	50,9	55,20	17,6	98,7	1,92	0,12
MVs-mon (mvs/μL)	0,51	5,5	97,1	49,1	53,91	17,5	49,1	1,91	0,06
MVs-end (mvs/μL)	0,37	6,5	86,8	47,4	51,31	15,5	97,0	1,65	0,28
MVs-ena (mvs/μL)	0,59	3,5	89,7	64,9	67,39	22,1	98,3	2,56	0,16
MVs-sct (mvs/μL)	0,53	5,5	83,8	64,9	66,80	21,0	97,3	2,39	0,25
ADMA (ng/mL)	0,29	1355,5	36,8	94,7	63,20	43,7	93,1	6,99	0,67

Nota. IY, índice de Youden; PC, punto de corte; S, sensibilidad; E, especificidad; IV, índice de validez; VPP, valor predictivo positivo; VPN, valor predictivo negativo; RV, razón de verosimilitud. () Valores predictivos calculados para una prevalencia del 10%. CATS, capacidad antioxidante total del suero; HCIS, homocisteína; AU, ácido úrico; IL-6, Interleuquina 6; GDF-15, factor de diferenciación del crecimiento 15; MVs-leu, MVs leucocitarias; MVs-mon, MVs de monocitos; MVs-end, MVs de células endoteliales; MVs-ena, MVs de células endoteliales activadas; MVs-sct, MVs de sincitiotrofoblasto; ADMA, dimetil arginina asimétrica.*

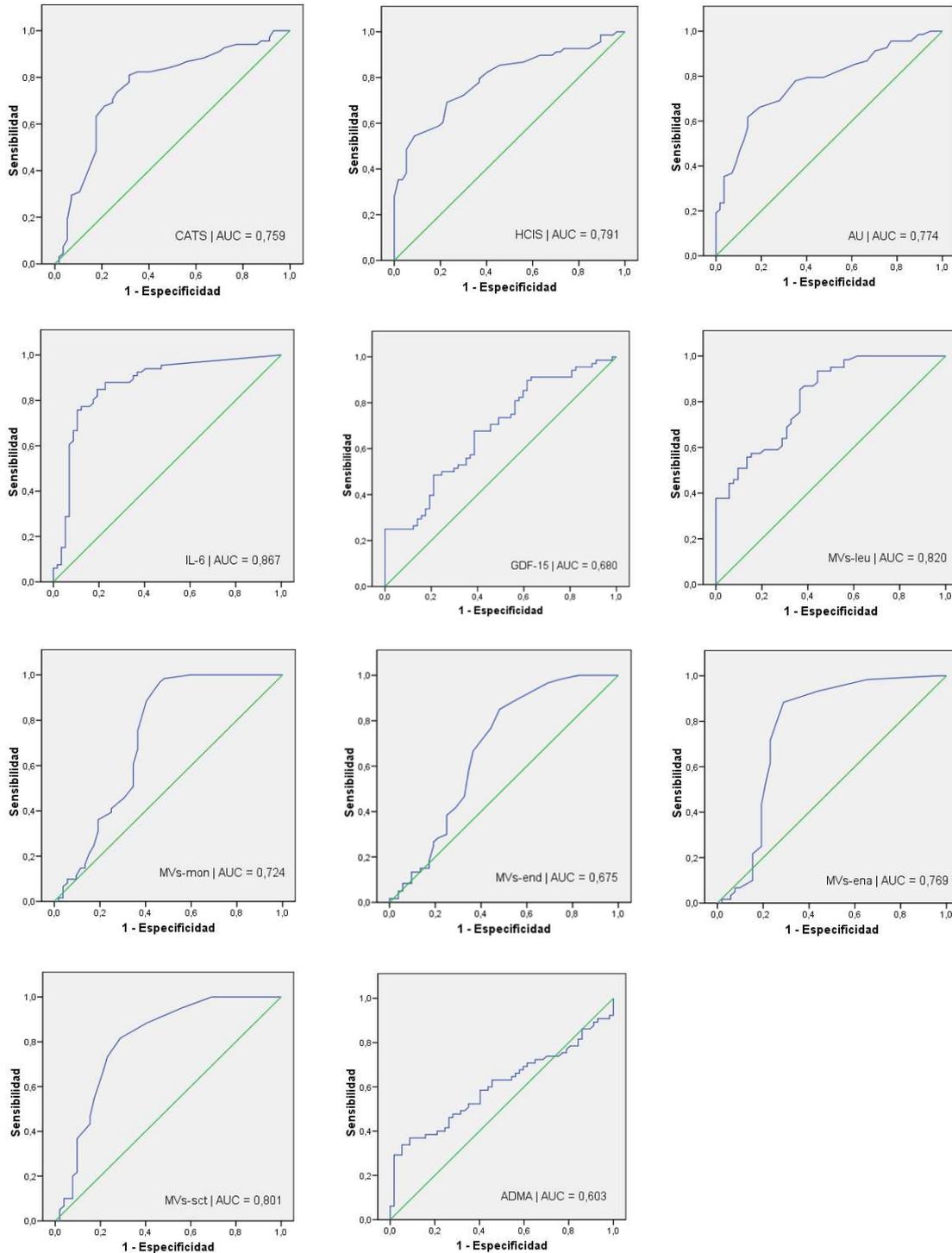
En cuanto al valor predictivo positivo, que es la probabilidad de estar realmente en riesgo condicionado a tener una prueba positiva, encontramos el mejor resultado para la IL-6 (32,9%), mientras que el valor predictivo negativo, que es la probabilidad de no tener riesgo condicionado a tener una prueba negativa, exhibió su mejor resultado para las MVs-ena (98,3%); como el valor predictivo de las pruebas está afectado por la prevalencia, los cálculos se hicieron teniendo en cuenta una tasa de positividad del 10% entre los embarazos cribados para determinar el riesgo de PE a término. Por otro lado, la razón de verosimilitud positiva, que informa el número de veces que es más probable que el test sea positivo en los enfermos que en los no enfermos, alcanzó su mayor valor para el ADMA (6,99), y la razón de verosimilitud negativa, que responde a las veces que es más probable que un test sea negativo en los enfermos que en los no enfermos tuvo su mínima expresión en las MVs-mon (0,06), lo que se traduce en una probabilidad 16 veces mayor ($1/0,06$) de que un resultado sea negativo entre los que no tienen riesgo que entre los que sí lo tienen.

La capacidad discriminante de los biomarcadores en relación con el riesgo de PE a término se determinó mediante curvas de rendimiento diagnóstico (Figura 4.8).

El área bajo la curva (AUC) de mayor valor fue obtenida para la IL-6 (AUC=0,867, IC95% 0,798 - 0,937), mientras que la curva con menos capacidad discriminante correspondió al ADMA (AUC=0,603, IC95% 0,501 - 0,704). El AUC de todos los biomarcadores, el nivel de significación (p) y el IC al 95% se muestran en la Tabla 4.7.

En la Tabla 4.8 se reflejan las combinaciones de AUC de las distintas variables en las que se encontraron diferencias significativas. Además de tener la mayor AUC, la IL-6 tuvo un rendimiento significativamente superior al de GDF-15 ($p=0,009$), MVs-mon ($p=0,027$), MVs-end ($p=0,003$) y ADMA ($p=0,001$). En el extremo opuesto, las menores prestaciones las mostró el ADMA, que tuvo una eficacia inferior no solo frente a la IL-6, sino también frente a CATS ($p=0,028$), HCIS ($p=0,003$), AU ($p=0,012$), MVs-leu ($p=0,002$), MVs-ena ($p=0,022$) y MVs-sct ($p=0,003$). No se encontraron diferencias significativas al comparar individualmente las curvas de la IL-6 con las curvas de CATS, HCIS, AU, MVs-ena y MVs-sct.

Figura 4.8
Curvas de rendimiento diagnóstico de los biomarcadores



Nota. AUC, área bajo la curva; CATS, capacidad antioxidante total del suero; HCIS, homocisteína; AU, ácido úrico; IL-6, Interleuquina 6; GDF-15, factor de diferenciación del crecimiento 15; MVs-leu, MVs leucocitarias; MVs-mon, MVs de monocitos; MVs-end, MVs de células endoteliales; MVs-ena, MVs de células endoteliales activadas; MVs-sct, MVs de sincitiotrofoblasto; ADMA, dimetil arginina asimétrica.

Tabla 4.7
Características de las curvas ROC de los biomarcadores

Biomarcador	AUC	p	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
CATS	0,759	<0,001	0,671	0,847
HCIS	0,791	<0,001	0,713	0,870
AU	0,774	<0,001	0,693	0,856
IL-6	0,867	<0,001	0,798	0,937
GDF-15	0,680	<0,001	0,601	0,762
MVs-leu	0,820	<0,001	0,744	0,895
MVs-mon	0,724	<0,001	0,621	0,827
MVs-end	0,675	0,001	0,570	0,780
MVs-ena	0,769	<0,001	0,669	0,869
MVs-sct	0,801	<0,001	0,715	0,888
ADMA	0,603	0,051	0,501	0,704

Nota. AUC, área bajo la curva. p, significación estadística. CATS, capacidad antioxidante total del suero; HCIS, homocisteína; AU, ácido úrico; IL-6, Interleuquina 6; GDF-15, factor de diferenciación del crecimiento 15; MVs-leu, MVs leucocitarias; MVs-mon, MVs de monocitos; MVs-end, MVs de células endoteliales; MVs-ena, MVs de células endoteliales activadas; MVs-sct, MVs de sincitiotrofoblasto; ADMA, dimetil arginina asimétrica.

Tabla 4.8
Comparación de las curvas ROC de los biomarcadores

Variables		Prueba de homogeneidad de áreas (X^2)	p
CATS	ADMA	4,859	0,028
HCIS	ADMA	9,128	0,003
AU	ADMA	6,282	0,012
IL-6	GDF-15	10,952	0,009
IL-6	MVs-mon	4,903	0,027
IL-6	MVs-end	8,935	0,003
IL-6	ADMA	17,260	0,001
GDF-15	MVs-leu	5,438	0,020
MVs-leu	MVs-end	4,775	0,029
ADMA	MVs-leu	9,707	0,002
ADMA	MVs-ena	5,276	0,022
ADMA	MVs-sct	8,648	0,003

Nota. p, significación estadística. CATS, capacidad antioxidante total del suero; HCIS, homocisteína; AU, ácido úrico; IL-6, Interleuquina 6; GDF-15, factor de diferenciación del crecimiento 15; MVs-leu, MVs leucocitarias; ADMA, dimetil arginina asimétrica.

4.1.5 Análisis de correlación de las distintas variables estudiadas

Para determinar la dirección y la intensidad de la relación lineal entre las variables clínicas y los biomarcadores se realizó un análisis de correlación bivariado. La Tabla 4.9 contiene los

coeficientes de correlación de las variables para las que se obtuvo significación estadística. Entre estos resultados destaca la buena relación lineal encontrada entre las MVs-mon con las MVs-ena ($r=0,655$), y la correlación moderada existente entre las MVs-end ($r=0,594$) y las MVs-sct ($r=0,452$); las MVs-leu tuvieron una relación lineal positiva moderada con las MVs-ena ($r=0,454$), y estas últimas con las MVs-sct ($r=0,404$); las MVs-leu aumentaron también junto con la PAM ($r=0,438$). La IL-6 tuvo una correlación amplia con biomarcadores de distintas categorías y diferente signo; su tendencia fue creciente al relacionarla con el sFlt-1 ($r=0,556$), con las MVs-leu ($r=0,554$), las MVs-ena ($r=0,547$), las MVs-end ($r=0,506$), las MVs-mon ($r=0,413$) y la PAM ($r=0,404$); mientras que su dependencia lineal con el PIGF tuvo sentido negativo ($r=-0,467$). La HCIS tuvo una relación lineal positiva y moderada con el sFlt-1 ($r=0,541$) y el AU ($r=0,405$), y de signo contrario con el PIGF ($r=-0,466$). El AU mostró una tendencia creciente junto al sFlt-1 ($r=0,528$) y el GDF-15 ($r=0,440$), y decreciente con el PIGF ($r=-0,407$). Por último, el aumento del GDF-15 se acompañó de un comportamiento al alza del sFlt-1 ($r=0,524$).

Tabla 4.9

Coefficientes de correlación de biomarcadores y variables clínicas

Var 1	Var 2	r	p	Var 1	Var 2	r	p
MVs-mon	MVs-ena	0,655	<0,001	MVs-mon	MVs-sct	0,452	<0,001
MVs-mon	MVs-end	0,594	<0,001	AU	GDF-15	0,440	<0,001
IL-6	sFLT-1	0,556	<0,001	PAM	MVs-leu	0,438	<0,001
IL-6	MVs-leu	0,554	<0,001	IL-6	MVs-mon	0,413	<0,001
IL-6	MVs-ena	0,547	<0,001	HCIS	AU	0,405	<0,001
HCIS	sFLT-1	0,541	<0,001	PAM	IL-6	0,404	<0,001
AU	sFLT-1	0,528	<0,001	MVs-ena	MVs-sct	0,404	<0,001
GDF-15	sFLT-1	0,524	<0,001	AU	PIGF	-0,407	<0,001
IL-6	MVs-end	0,506	<0,001	HCIS	PIGF	-0,466	<0,001
MVs-leu	MVs-ena	0,454	<0,001	IL-6	PIGF	-0,467	<0,001

Nota. Var, variable; r, coeficiente de correlación de Spearman; p, significación estadística. MVs-mon, MVs de monocitos; MVs-ena, MVs de células endoteliales activadas; MVs-end, MVs de células endoteliales; IL-6, Interleuquina 6; sFlt-1, forma soluble de la tirosina quinasa tipo 1 similar al FMS; MVs-leu, MVs leucocitarias; HCIS, homocisteína; AU, ácido úrico; GDF-15, factor de diferenciación del crecimiento 15; MVs-sct, MVs de sincitiotrofoblasto; PAM, presión arterial media; PIGF, factor de crecimiento placentario.

4.1.6 Influencia de las variables demográficas y clínicas sobre los biomarcadores

Para determinar la relación de las variables clínicas y demográficas sobre los biomarcadores que mostraron diferencias significativas entre los grupos con bajo y alto riesgo de PE a término se realizó una comparación de medias. En la Tabla 4.10 se informan las interacciones con significación estadística.

Tabla 4.10*Influencia de las variables demográficas y clínicas sobre los biomarcadores*

Variable demográfica o clínica: Hábito de fumar (n=125)			
Biomarcador	No (n=110)	Sí (n=15)	p
CATS (mmol/L)	1,62 [1,55 - 1,75]	1,67 [1,60 - 1,92]	0,034
MVs-sct (mvs/ μ L)	7 [4 - 14]	4 [3 - 8]	0,031
Variable demográfica o clínica: Nuliparidad (n=125)			
Biomarcador	No (n=76)	Sí (n=49)	p
HCIS (μ mol/L)	5,6 [5,05 - 6,35]	6,0 [5,3 - 6,9]	0,028
GDF-15 (μ g/mL)	79,7 [71,7 - 104,6]	111 [73,7 - 144,8]	0,005
MVs-leu (mvs/ μ L)	45 [17 - 94]	68 [36 - 120]	0,048
MVs-sct (mvs/ μ L)	5 [3 - 9]	8 [4 - 14]	0,030
Variable demográfica o clínica: Historia familiar de PE (n=125)			
Biomarcador	No (n=116)	Sí (n=9)	p
CATS (mmol/L)	1,64 [1,57 - 1,74]	1,57 [1,5 - 1,62]	0,037
MVs-leu (mvs/ μ L)	56 [25 - 104]	107 [3 - 255]	0,028
Variable demográfica o clínica: PAM (n=125)			
Biomarcador	<95 mmHg (n=87)	\geq 95 mmHg (n=38)	p
AU (mg/dL)	3,95 [3,30 - 4,7]	4,45 [4,00 - 4,97]	<0,001
HCIS (μ mol/L)	5,7 [5,20 - 6,20]	6,25 [5,40 - 7,35]	0,003
IL-6 (pg/mL)	2,25 [1,50 - 3,71]	4,29 [2,63 - 5,42]	<0,001
MVs-leu (mvs/ μ L)	42 [19 - 86]	101 [55 - 161]	<0,001
MVs-end (mvs/ μ L)	8 [5 - 14]	10 [7 - 17]	0,039
MVs-ena (mvs/ μ L)	4 [2 - 10]	7 [4 - 10]	0,011
MVs-sct (mvs/ μ L)	5 [3 - 12]	9 [6 - 11]	0,024
Variable demográfica o clínica: desarrollo de hipertensión gestacional (n=125)			
Biomarcador	No (n=114)	Sí (n=11)	p
AU (mg/dL)	4 [3,40 - 4,70]	4,4 [4,1 - 5,0]	0,002
HCIS (μ mol/L)	5,9 [5,20 - 6,40]	6,3 [5,3 - 8,3]	0,010
IL-6 (pg/mL)	2,63 [1,50 - 4,32]	4,31 [3,79 - 4,87]	0,005
GDF-15 (μ g/mL)	91,2 [72,1 - 137,6]	92,6 [82,3 - 187,6]	0,026
MVs-sct (mvs/ μ L)	6 [4 - 11]	9 [8 - 11]	0,048

Nota. CATS, capacidad antioxidante total del suero; MVs-sct, MVs de sincitiotrofoblasto; HCIS, homocisteína; GDF-15, factor de diferenciación del crecimiento 15; MVs-leu, MVs leucocitarias; PAM, presión arterial media; AU, ácido úrico; IL-6, Interleuquina 6; MVs-end, MVs de células endoteliales; MVs-ena, MVs de células endoteliales activadas. p, significación estadística.

Entre las participantes en el estudio, las que tenían hábito tabáquico mostraron una CATS mayor, 1,67 [1,60 - 1,92] mmol/L vs 1,62 [1,55 - 1,75] mmol/L, $p=0,034$; y su sincitiotrofoblasto liberó menos MVs que el de aquellas que no fumaron, 4 [3 - 8] mvs/ μ L vs 7 [4 - 14] mvs/ μ L, $p=0,031$. Por otro lado, las gestantes primíparas tuvieron niveles superiores de HCIS, 6,0 [5,3 - 6,9] μ mol/L vs 5,6 [5,05 - 6,35] μ mol/L, $p=0,028$; mayor concentración de GDF-15, 111 [73,7 - 144,8] μ g/mL vs 79,7 [71,7 - 104,6] μ g/mL, $p=0,005$; más MVs de origen leucocitario 68 [36 -

120] mvs/ μ L vs 45 [17 - 94] mvs/ μ L, $p=0,048$; y más MVs derivadas de sincitiotrofoblasto, 8 [4 - 14] mvs/ μ L vs 5 [3 - 9] mvs/ μ L, $p=0,030$. Las gestantes con historia familiar de PE tuvieron una CATS menor que las que no tenían esta relación con la enfermedad, 1,57 [1,50 - 1,62] mmol/L vs 1,64 [1,57 - 1,74] mmol/L, $p=0,037$; y niveles superiores de MVs de origen leucocitario, 107 [46 - 255] mvs/ μ L vs 56 [25 - 104] mvs/ μ L, $p=0,028$. Al analizar los biomarcadores en las gestantes en función de la PAM observamos que aquellas con $PAM \geq 95$ mmHg presentaron niveles mayores de AU en plasma que las que tuvieron $PAM < 95$ mmHg, 4,45 [4,00 - 4,97] mg/dL vs 3,95 [3,30 - 4,70] mg/dL, $p < 0,001$; más HCIS, 6,25 [5,40 - 7,35] μ mol/L vs 5,7 [5,20 - 6,20] μ mol/L, $p=0,003$; una concentración más alta de IL-6, 4,29 [2,63 - 5,42] pg/mL vs 2,25 [1,50 - 3,71] pg/mL, $p < 0,001$; y liberaron cantidades significativamente superiores de MVs leucocitarias, 101 [55 - 161] mvs/ μ L vs 42 [19 - 86] mvs/ μ L, $p < 0,001$, endoteliales, 10 [7 - 17] mvs/ μ L vs 8 [5 - 14] mvs/ μ L, $p=0,039$, endoteliales activadas, 7 [4 - 10] mvs/ μ L vs 4 [2 - 10] mvs/ μ L, $p=0,011$, y de sincitiotrofoblasto, 9 [6 - 11] mvs/ μ L vs 5 [3 - 12] mvs/ μ L, $p=0,024$. Por último, las que desarrollaron hipertensión gestacional tuvieron niveles de AU superiores, 4,4 [4,10 - 4,50] mg/dL vs 4 [3,4 - 4,7] mg/dL, $p=0,002$; mayor concentración de HCIS, 6,3 [5,3 - 8,3] μ mol/L vs 5,9 [5,2 - 6,4] μ mol/L, $p=0,010$; valores de IL-6 superiores, 4,31 [3,79 - 4,87] pg/mL vs 2,63 [1,50 - 4,32] pg/mL, $p=0,005$; concentraciones de GDF-15 más altas, 92,6 [82,3 - 187,6] μ g/mL vs 91,1 [72,1 - 137,6] μ g/mL, $p=0,026$; y más MVs-sct, 9 [8 - 11] mvs/ μ L vs 6 [4 - 11] mvs/ μ L, $p=0,048$.

4.1.7 Influencia de los biomarcadores sobre la presión arterial media

Al analizar la influencia de los biomarcadores sobre la PAM, encontramos una relación de dependencia con el AU, la HCIS y las MVs-leu (Tabla 4.11). La R^2 y la R^2 ajustada del modelo explican que aproximadamente el 25% de la variación de la PAM se debe al incremento de los niveles de AU, HCIS y MVs-leu. En el modelo, los coeficientes de regresión representan el cambio previsto en la PAM por cada cambio unitario en los niveles de AU, HCIS o MVs-leu, cuando las otras variables permanecen constantes.

Tabla 4.11*Influencia de los biomarcadores en la presión arterial media*

Modelo	Coeficiente B	IC al 95% para B		p
		Límite inferior	Límite superior	
(Constante)	71,149	62,479	79,820	0,000
AU	1,863	0,232	3,495	0,026
HCISS	1,481	0,019	2,942	0,047
MVs-leu	0,043	0,021	0,066	0,000

Nota. $R^2=0,254$, R^2 ajustado=0,233. Variable dependiente, PAM: presión arterial media; IC, intervalo de confianza; AU, ácido úrico; HCISS, homocisteína; MVs-leu, MVs leucocitarias.

4.1.8 Modelo explicativo del riesgo de preeclampsia a término a partir de los biomarcadores

Se realizó un análisis de regresión logística binaria para conocer la magnitud en que los biomarcadores estudiados podían explicar el riesgo de PE a término. Como variable dependiente se utilizó el riesgo de PE, y como covariables los biomarcadores de estrés oxidativo, inflamación y función endotelial que mostraron diferencias significativas entre los grupos con bajo y alto riesgo de PE.

En primer lugar, se hizo un análisis univariado (Tabla 4.12) que permitió eliminar las MVs-end y las MVs-ena de las variables seleccionadas inicialmente porque no mejoraban el rendimiento del modelo.

Tabla 4.12*Análisis univariado de los biomarcadores*

Variable	OR	IC 95,0%		p
		Inferior	Superior	
AU	3,53	2,04	6,08	<0,001
HCISS	3,26	2,00	5,31	<0,001
IL-6	2,83	1,93	4,14	<0,001
GDF-15	1,00	1,00	1,00	<0,001
CATS	0,00	0,00	0,02	<0,001
MVs-leu	1,03	1,02	1,04	<0,001
MVs-mon	1,04	1,00	1,08	0,047
MVs-end	1,02	0,99	1,06	0,211
MVs-ena	1,03	0,99	1,08	0,182
MVs-sct	1,11	1,03	1,19	0,006
ADMA	1,00	1,00	1,00	0,009

Nota. OR, razón de probabilidades; IC, intervalo de confianza; p, significación estadística. AU, ácido úrico; HCISS, homocisteína; IL-6, Interleuquina 6; GDF-15, factor de diferenciación del crecimiento 15; CATS, capacidad antioxidante total del suero; MVs-leu, MVs leucocitarias; MVs-mon, MVs de monocitos; MVs-end, MVs de células endoteliales; MVs-ena, MVs de células endoteliales activadas; MVs-sct, MVs de sincitiotrofoblasto; ADMA, dimetil arginina asimétrica.

Seguidamente, se hizo un análisis multivariado con los biomarcadores que tenían una $p < 0,15$ en el análisis univariado. En este paso fueron separados del modelo las variables AU, GDF-15, CATS, MVs-mon y ADMA, y se confirmó que fueron factores explicativos del riesgo de forma independiente y significativa, las variables HCIS, IL-6, MVs-leu y MVs-sct.

El modelo de regresión logística resultó estadísticamente significativo ($X^2=83,22$; $p < 0,001$). En la Tabla 4.13 están recogidos los coeficientes de determinación.

Tabla 4.13

Coefficientes de determinación del modelo de regresión logística

-2 log de la verosimilitud	R ² de Cox y Snell	R ² de Nagelkerke
68,94	0,53	0,71

El R² de Cox y Snell es un coeficiente que se utiliza para estimar la proporción de varianza de la variable dependiente explicada por las variables predictoras. Su valor fluctúa entre 0 y 1, pero en la práctica no llega a 1. El R² de Nagelkerke es una transformación del R² de Cox y Snell que sí cubre ese rango. En este caso ambos coeficientes permiten afirmar que las variables del modelo pueden explicar entre el 53 y el 71% de los cambios de la variable dependiente.

Por otro lado, el porcentaje global de clasificación correcta de las embarazadas fue del 90%. Los resultados finales del análisis de regresión logística aparecen en la Tabla 4.14.

Tabla 4.14

Variables incluidas en la ecuación del modelo de regresión logística

Variables en la ecuación	Coef. β	EE	Valor p	OR	IC 95,0%	
					Inferior	Superior
HCIS	1,377	0,381	0,000	3,962	1,876	8,365
IL-6	0,877	0,255	0,001	2,405	1,460	3,961
MVs-leu	0,020	0,007	0,007	1,020	1,005	1,035
MVs-sct	0,078	0,028	0,005	1,081	1,024	1,142
Constante	-12,556	2,718		0,000		

Nota. Coef, coeficiente; EE, error estándar; OR, razón de probabilidad; IC, intervalo de confianza. HCIS, homocisteína; IL-6, Interleuquina 6; MVs-leu, MVs leucocitarias; MVs-sct, MVs de sincitiotrofoblasto.

Una vez creado el modelo se realizó un análisis del rendimiento, determinando el grado de calibración y la capacidad de discriminación de la propuesta.

La calibración es la capacidad del modelo de producir estimaciones no sesgadas de la probabilidad del evento o variable de valoración. Para medir la calibración se utilizó la prueba de Hosmer-Lemeshow, que es un método que estudia la bondad de ajuste del modelo

comparando los valores previstos (esperados) por el modelo con los valores realmente observados. Ambas distribuciones, esperada y observada, se contrastan mediante una prueba de χ^2 . La hipótesis nula de la prueba de Hosmer-Lemeshow es que no hay diferencias entre los valores observados y los valores pronosticados, valores de p no significativos ($p > 0,05$) indican que lo esperado se ajusta suficientemente a lo observado. Según los resultados obtenidos (Tabla 4.15) nuestro modelo tiene una buena calibración.

Tabla 4.15

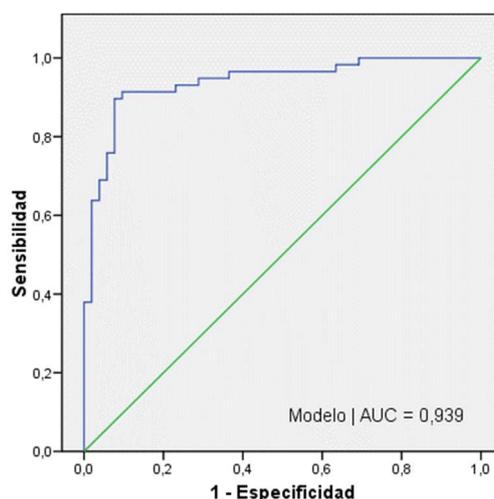
Resultado de la medida de la calibración del modelo de regresión logística

Prueba de Hosmer-Lemeshow		
Chi-cuadrado	Grados de libertad	Significación (p)
10,772	8	0,215

La discriminación es la capacidad del modelo de asignar el resultado correcto a un par de sujetos seleccionados al azar; en otras palabras, permite al modelo clasificar a los sujetos en un contexto de criterio de valoración con predicción binario. El AUC es la medida de discriminación más frecuentemente utilizada para estos modelos, y es la que calculamos en este caso (Figura 4.9). En las Tablas 4.16 y 4.17 se recoge la información sobre la capacidad discriminante del modelo, que se puede considerar correcta.

Figura 4.9

Curvas de rendimiento diagnóstico del modelo de regresión logística



Nota. AUC, área bajo la curva.

Tabla 4.16*Características de las curvas ROC del modelo de regresión logística*

Modelo	AUC	Significación (p)	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
	0,939	<0,001	0,894	0,984

Nota. AUC, área bajo la curva.

Tabla 4.17*Indicadores estadísticos básicos del modelo de regresión logística*

Modelo	IY	PC	S (%)	E (%)	IV	VPP (%)*	VPN (%)*	RV+	RV-
	0,82	0,47	91,2	84,2	84,91	39,1	98,9	5,77	0,1

Nota. IY, índice de Youden; PC, punto de corte; S, sensibilidad; E, especificidad; IV, índice de validez; VPP, valor predictivo positivo; VPN, valor predictivo negativo; RV, razón de verosimilitud. (*) Valores predictivos calculados para una prevalencia del 10%.

Finalmente, se comparó la eficacia del modelo con la de los biomarcadores propuestos para estudiar el riesgo de PE mediante el análisis de la diferencia de áreas. El resultado, que demuestra un mejor rendimiento del modelo frente a cada biomarcador por separado, se recoge en la Tabla 4.18.

Tabla 4.18*Comparación de las curvas ROC del modelo de regresión logística y de los biomarcadores*

Variables		Prueba de homogeneidad de áreas (X ²)	p
Modelo	CATS	12,69	<0,001
	HCIS	10,18	0,001
	AU	11,94	<0,001
	IL-6	2,86	0,009
	GDF-15	23,85	<0,001
	MVs-leu	8,198	0,004
	MVs-mon	13,69	0,004
	MVs-end	20,28	<0,001
	MVs-ena	9,02	0,002
	MVs-sct	7,39	0,006
	ADMA	34,39	<0,001

Nota. P, prueba. CATS, capacidad antioxidante total del suero; HCIS, homocisteína; AU, ácido úrico; IL-6, Interleuquina 6; GDF-15, factor de diferenciación del crecimiento 15; MVs-leu, MVs leucocitarias; MVs-mon, MVs de monocitos; MVs-end, MVs de células endoteliales; MVs-ena, MVs de células endoteliales activadas; MVs-sct, MVs de sincitiotrofoblasto; ADMA, dimetil arginina asimétrica.

4.2 Análisis de los resultados de los subgrupos del ensayo clínico

4.2.1 Características basales

El ensayo clínico se desarrolló en el grupo con alto riesgo de PE a término. Del total de participantes, 35 gestantes recibieron placebo (subgrupo IIa) y 33 fueron tratadas con pravastatina (subgrupo IIb). Al analizar las características demográficas y clínicas basales de ambos subgrupos (Anexo IX, Tabla A.2), no se encontraron diferencias significativas, exceptuando el hábito de fumar porque todas las gestantes consumidoras de tabaco quedaron incluidas en el subgrupo que recibió placebo. En la medición de los biomarcadores de estrés oxidativo, inflamación, angiogénesis, función endotelial y dislipemia, al inicio del estudio, (Anexo IX, Tabla A.3) tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas.

4.2.2 Efecto del tratamiento con pravastatina sobre los biomarcadores

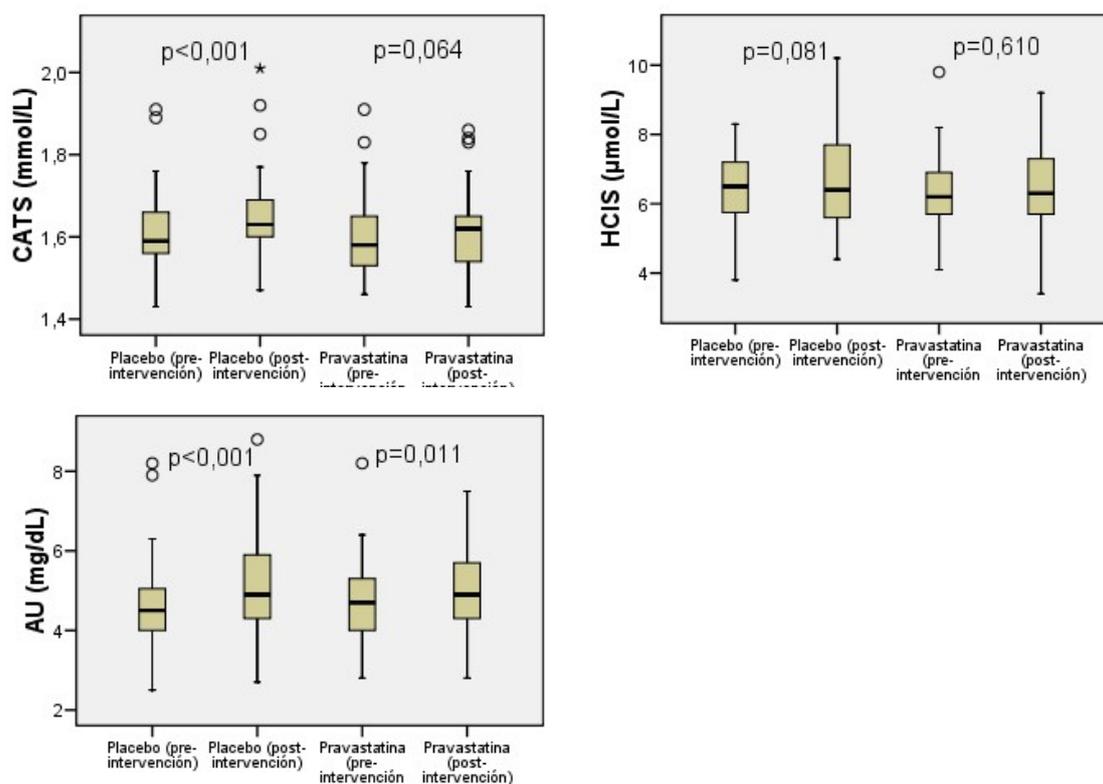
Las tablas A.4 y A.5 del Anexo IX contienen los resultados de la medición de los biomarcadores antes y después de la intervención en los dos brazos del ensayo clínico. Durante el tiempo transcurrido entre las dos determinaciones se produjeron cambios en las variables de diferentes categorías que describimos a continuación.

4.2.2.1 Biomarcadores de estrés oxidativo

Como se observa en la Figura 4.10, la CATS aumentó en los dos subgrupos, aunque el cambio solo fue significativo en el grupo tratado con placebo, al elevarse de un nivel basal de 1,59 [1,55 - 1,66] mmol/L hasta 1,63 [1,6 - 1,69] mmol/L, $p < 0,001$. Las concentraciones de HCIS no se modificaron significativamente en ninguno de los subgrupos del ensayo. Sin embargo, los niveles de AU aumentaron en las que recibieron placebo de 4,5 [4 - 5,1] mg/dL a 4,9 [4,3 - 5,9] mg/dL, $p < 0,001$, y en las tratadas con pravastatina de 4,7 [4 - 5,3] mg/dL a 4,9 [4,2 - 5,75] mg/dL, $p = 0,011$.

Figura 4.10

Biomarcadores de estrés oxidativo medidos en los subgrupos del ensayo clínico



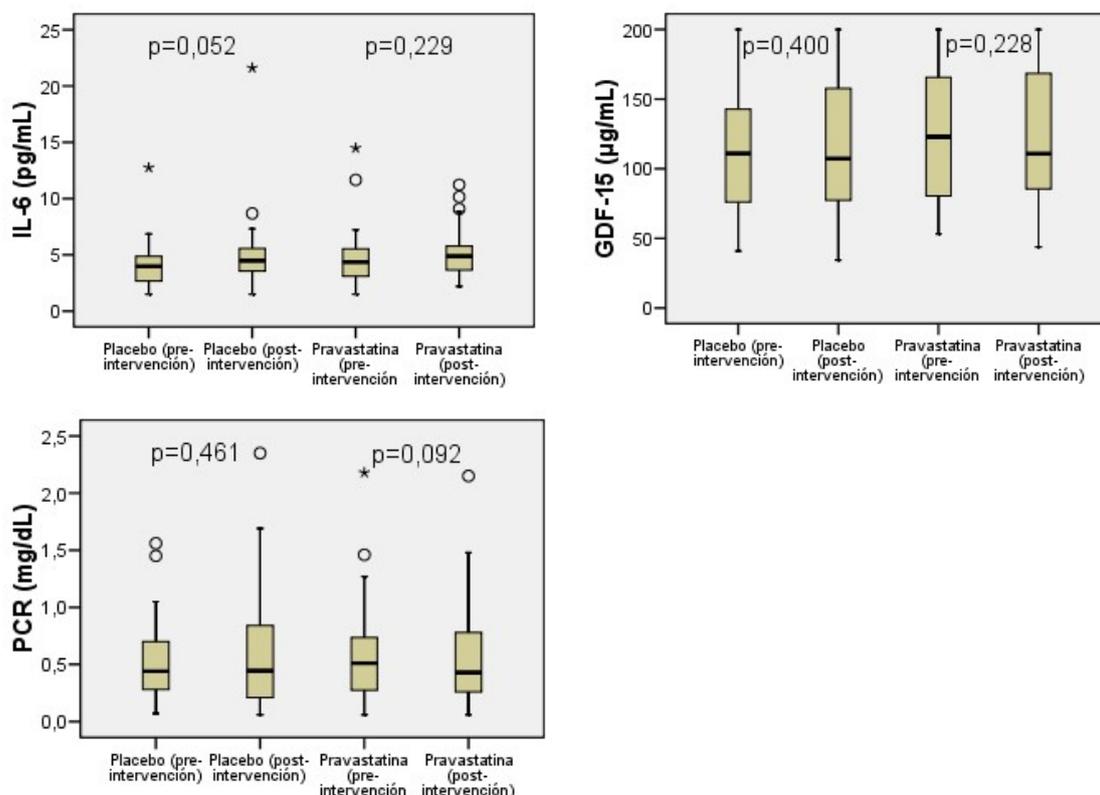
Nota. CATS, capacidad antioxidante total del suero; HCIS, homocisteína; AU, ácido úrico. Los datos se representan como se describe en el pie de la Figura 4.1.

4.2.2.2 Biomarcadores de inflamación

En la Figura 4.11 se puede apreciar que la IL-6 fue el único biomarcador de esta categoría en el que se observó una tendencia al alza durante el ensayo y lo hizo solamente en el subgrupo que recibió placebo, al partir de un nivel basal de 3,94 [2,65 - 4,85] pg/mL y alcanzar en la segunda medición los 4,47 [3,5 - 5,58] pg/mL, $p=0,052$. Sin embargo, al comparar los valores de la segunda medida, no se observaron diferencias $p=0,538$. Por su parte, los niveles de GDF-15 y de PCR no cambiaron significativamente en ninguno de los grupos de estudio.

Figura 4.11

Biomarcadores de inflamación medidos en los subgrupos del ensayo clínico



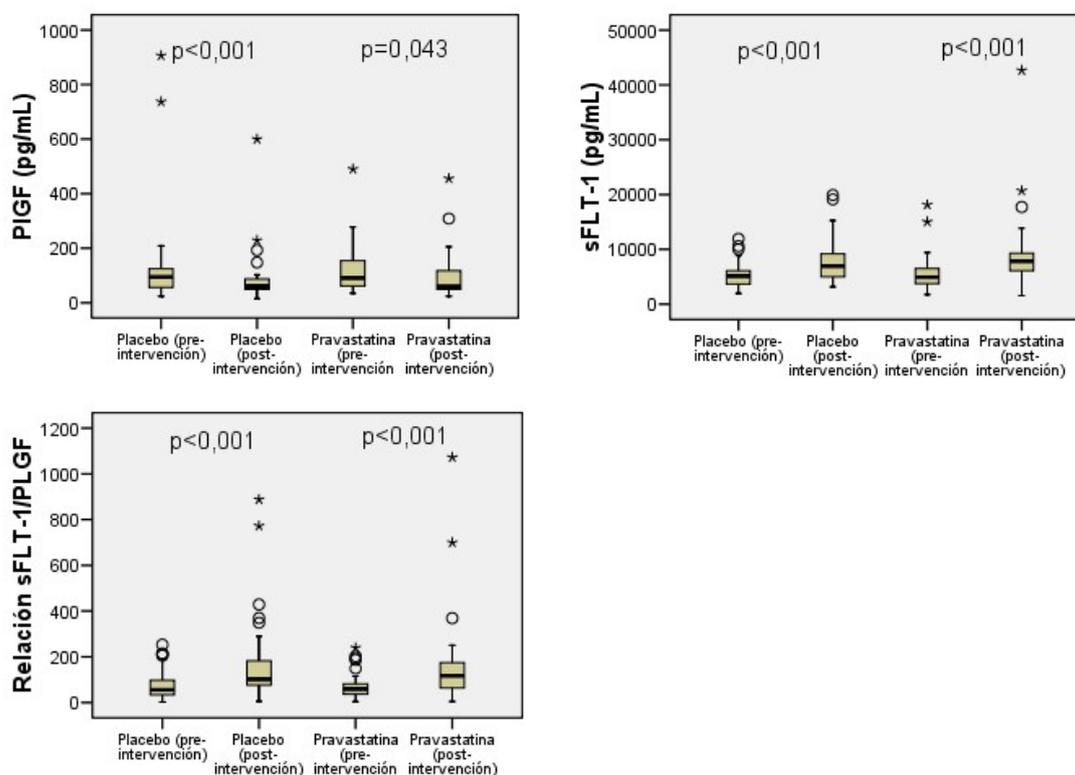
Nota. IL-6, Interleuquina 6; GDF-15, factor de diferenciación del crecimiento 15; PCR, proteína C reactiva. Los datos se representan como se describe en el pie de la Figura 4.1.

4.2.2.3 Biomarcadores angiogénicos/antiangiogénicos

Los valores de estas variables están representados en los diagramas de cajas y bigotes de la Figura 4.12. Como se ve, el nivel de PIGF disminuyó de forma significativa tanto en el subgrupo que recibió placebo, al hacerlo desde 94,7 [55,9 - 125,7] pg/mL hasta 60,28 [48,35 - 88,7] pg/mL, $p < 0,001$, como en el que recibió pravastatina, al cambiar de 91 [61,2 - 155,7] pg/mL a 59,8 [46,97 - 123,4] pg/mL vs, $p = 0,043$. Por el contrario, los niveles de sFlt-1 se incrementaron en los dos brazos del ensayo, con valores en el subgrupo control que subieron de 5119 [3541,7 - 6027,5] pg/mL a 6934 [4849 - 9249] pg/mL, $p < 0,001$, y en el subgrupo tratado con la estatina de 4899 [3693,5 - 6516,5] pg/mL a 7830 [5930 - 9289] pg/mL, $p < 0,001$. En la ventana de tiempo evaluada la relación sFlt-1/PIGF se modificó en el mismo sentido tanto para los embarazos controles como para los tratados con el fármaco, al aumentar en el subgrupo que recibió placebo de 55,5 [31,87 - 95,37] a 102,2 [74 - 188,1], $p < 0,001$, y en el tratado con pravastatina de 59 [33,9 - 81,15] a 116,5 [62,6 - 180,5], $p < 0,001$.

Figura 4.12

Biomarcadores de angiogénesis medidos en los subgrupos del ensayo clínico



Nota. PIGF, factor de crecimiento placentario; sFlt-1, forma soluble de la tirosina quinasa tipo 1 similar al FMS. Los datos se representan como se describe en el pie de la Figura 4.1.

La variación en los MoM de estos biomarcadores casi alcanzó la significación para el PIGF del grupo control (Anexo IX, Tablas A.4 y A.5), al cambiar de 0,35 [0,23 - 0,52] a 0,36 [0,19 - 0,56], con un valor $p=0,050$; ni los MoM del PIGF del subgrupo tratado con pravastatina, ni los MoM del sFlt-1 de ninguno de los subgrupos cambiaron de forma significativa.

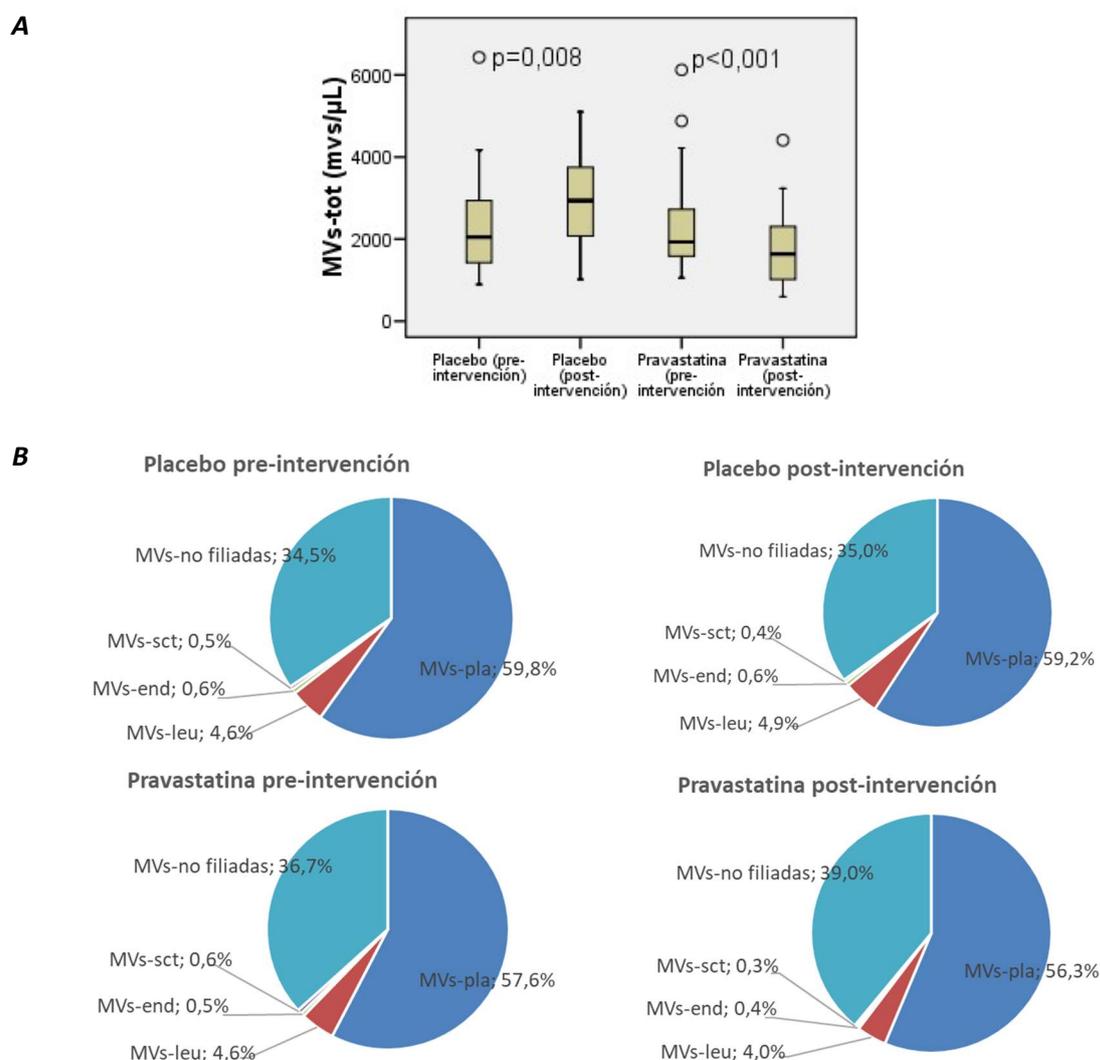
4.2.2.4 Biomarcadores de función endotelial

Las MVs sufrieron cambios estadísticamente significativos y contrapuestos en los dos subgrupos del ensayo clínico. Como se recoge en el Anexo IX, Tablas A.4 y A.5, la concentración de MVs-tot en las gestantes que recibieron placebo subió de 2048 [1425 - 3022] mvs/ μ L a 2931 [2076 - 3749] mvs/ μ L, $p=0,008$, mientras que en las tratadas con pravastatina la concentración descendió de 2153 [1586 - 3649] mvs/ μ L a un valor menor, 1637 [1010 - 2290] mvs/ μ L, $p < 0,001$. En la Figura 4.13-A se puede observar este comportamiento.

Los diagramas de sectores de la Figura 4.13-B representan la distribución porcentual de los distintos tipos de MVs en los dos brazos del ensayo clínico. Como se puede observar, las MVs anexina V+ más abundantes en todos los casos se originaron a partir de las plaquetas, mientras que las detectadas en menor concentración fueron liberadas por el endotelio y el sincitiotrofoblasto. En el subgrupo que recibió placebo los porcentajes de todas las poblaciones investigadas antes y después de la intervención fueron similares. En el grupo que recibió pravastatina se observó tras el tratamiento una ligera disminución en el porcentaje de MVs-leu (de 4,6% a 4,0%) y de MVs-sct (de 0,6% a 0,3%), junto a un aumento de las MVs-no filiadas (de 36,7% a un 39%).

Figura 4.13

Comparación de la concentración total de MVs y la distribución de las diferentes poblaciones en los subgrupos del ensayo clínico

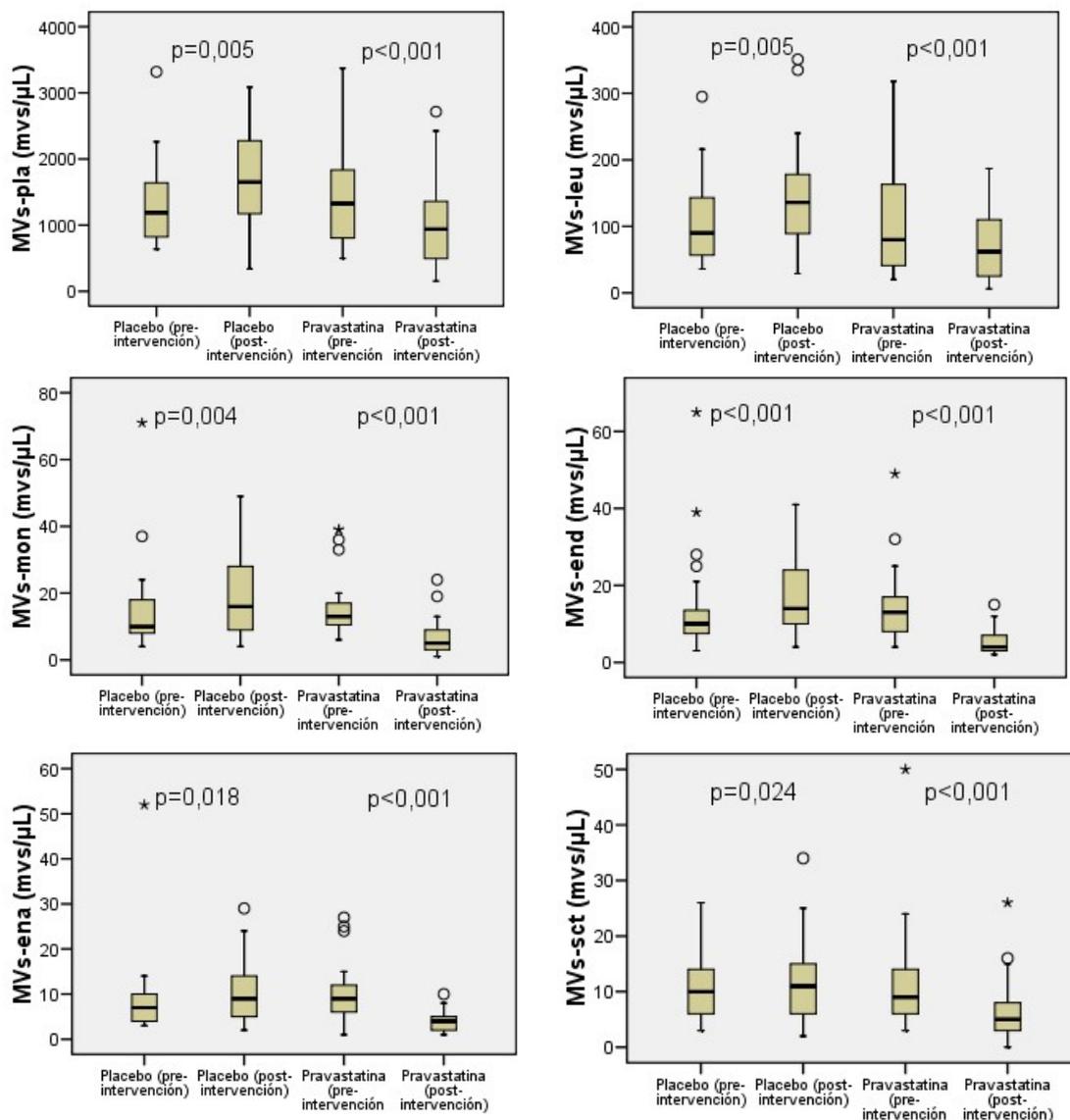


Nota. A: MVs totales en los subgrupos del ensayo clínico; MVs-tot, total de MVs anexina V+. Los datos se representan como se describe en el pie de la Figura 4.1. B: Distribución de las MVs en el plasma de las gestantes con alto riesgo de PE a término antes y después de la intervención; MVs-pla, MVs de plaquetas; MVs-leu, MVs leucocitarias; MVs-end, MVs de células endoteliales; MVs-sct, MVs de sincitiotrofoblasto.

El resultado de la medición de las distintas poblaciones de MVs durante el ensayo clínico se ha representado en diagramas de cajas y bigotes en la Figura 4.14.

Figura 4.14

Concentración de diferentes poblaciones de MVs en los subgrupos del ensayo clínico



Nota. MVs-pla, MVs de plaquetas; MVs-leu, MVs leucocitarias; MVs-mon, MVs de monocitos; MVs-end, MVs de células endoteliales; MVs-ena, MVs de células endoteliales activadas; MVs-sct, MVs de sincitiotrofoblasto. Los datos se representan como se describe en el pie de la Figura 4.1.

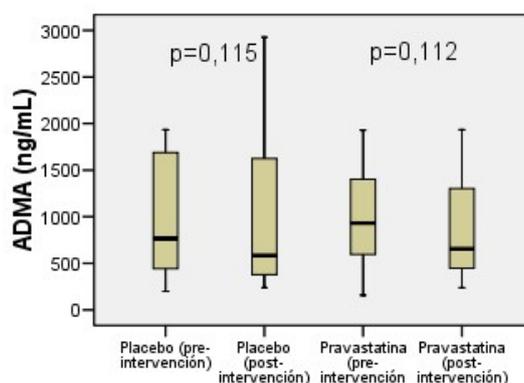
En el subgrupo que recibió placebo se produjo un incremento significativo de cada una de las poblaciones de MVs investigadas: las MVs derivadas de plaquetas lo hicieron aproximadamente un 34%, p=0,005; las liberadas por leucocitos un 33%, p=0,005; las producidas por monocitos un 60%, p=0,004, las de origen endotelial un 40%, p<0,001; las de endotelio activado un 28%, p=0,018; y las de sincitiotrofoblasto lo hicieron un 22%, p=0,024. Por el contrario, en el subgrupo

tratado con pravastatina se produjo una disminución significativa de todos los tipos de MVs medidos: las MVs derivadas de plaquetas se redujeron aproximadamente un 42%, $p < 0,001$; las liberadas por leucocitos mermaron un 25%, $p < 0,001$; las producidas por monocitos cayeron un 61%, $p < 0,001$; las de origen endotelial un 69%, $p < 0,001$; las de endotelio activado un 55%, $p < 0,001$; y las de sincitiotrofoblasto lo hicieron un 44%, $p < 0,001$.

Como se ve en la Figura 4.15, los niveles de ADMA no experimentaron cambios significativos en el placebo y tampoco en el subgrupo intervenido con pravastatina durante el ensayo, observando valores similares después del tratamiento en los dos grupos de estudio $p = 0,460$.

Figura 4.15

Concentración de ADMA medida en los subgrupos del ensayo clínico

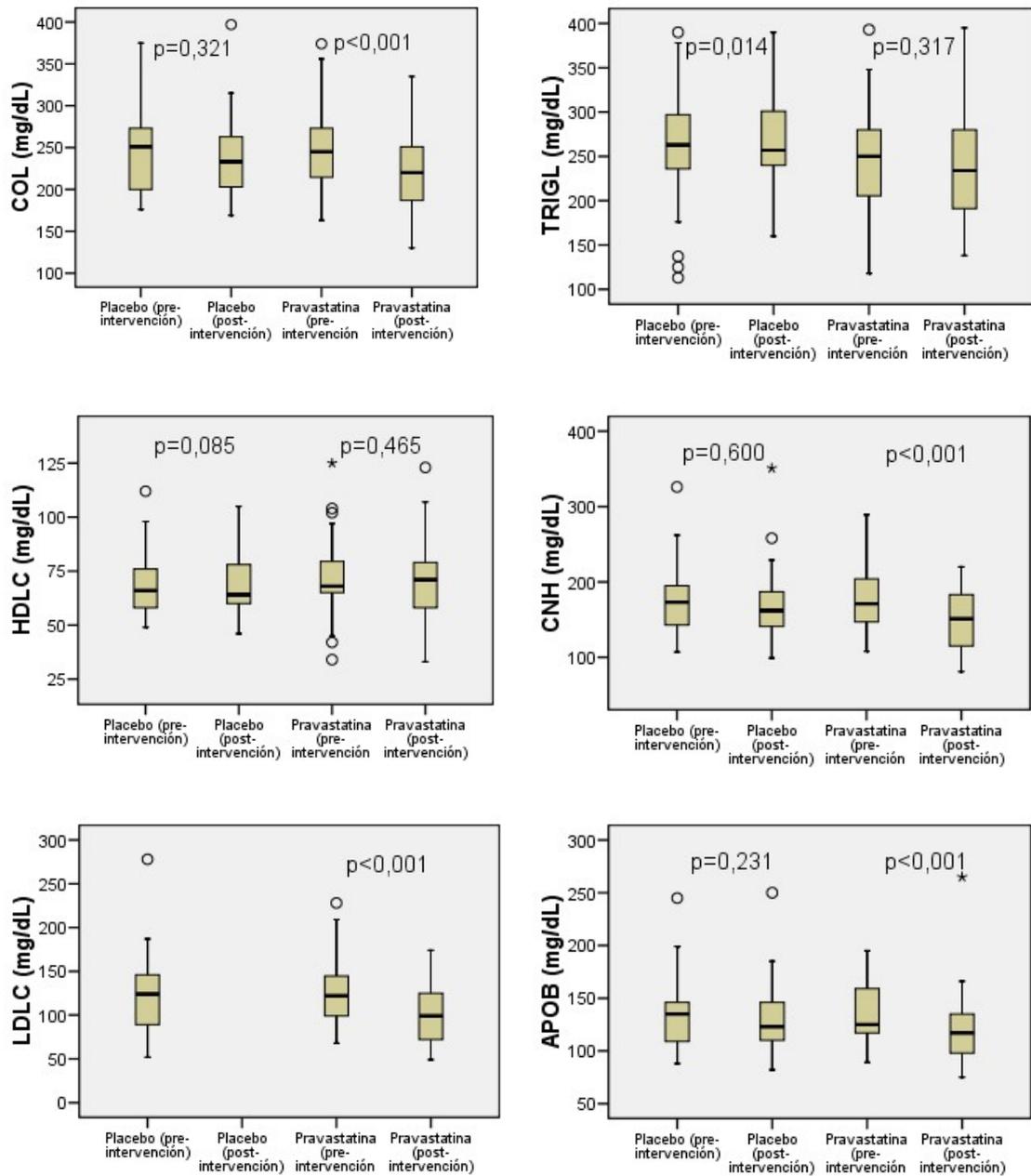


Nota. ADMA, dimetil arginina asimétrica. Los datos se representan como se describe en el pie de la Figura 4.1.

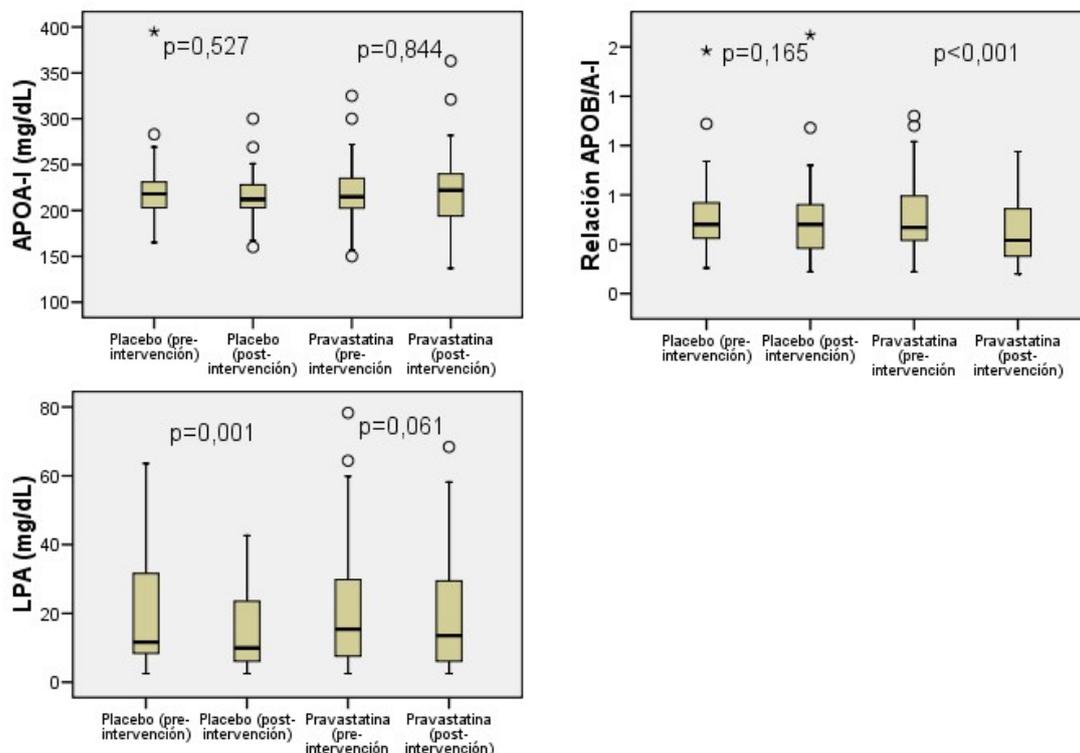
4.2.2.5 Marcadores de dislipemia

En la Figura 4.16 se encuentran los diagramas de cajas y bigotes de los biomarcadores de esta categoría. Como se puede apreciar, en el subgrupo que recibió placebo se produjo un aumento en la concentración de triglicéridos, de 268 [234 - 320,2] mg/dL a 290 [242 - 355] mg/dL, $p = 0,014$, y una disminución de los niveles de LpA, de 10,5 [7,4 - 31,6] mg/dL a 9,9 [5,6 - 24,9] mg/dL, $p < 0,001$. En este mismo subgrupo, la concentración de colesterol-LDL tras la intervención no pudo ser calculada debido a los elevados niveles de triglicéridos de varias gestantes, que impidieron la utilización de la ecuación de Friedewald. Por otro lado, en el subgrupo intervenido con pravastatina se produjeron disminuciones significativas en los niveles de colesterol total, de 245 [214 - 278] mg/dL a 220 [187 - 251] mg/dL, $p < 0,001$; de colesterol-no-HDL, de 172 [147 - 209] mg/dL a 151 [115 - 184,5] mg/dL, $p < 0,001$; de colesterol-LDL, de 122 [97 - 148] mg/dL a 99 [71 - 126,5] mg/dL, $p < 0,001$; de ApoB, de 125 [117 - 162] mg/dL a 117 [95,5 - 135,5] mg/dL, $p < 0,001$; y en la relación ApoB/ApoA1, de 0,59 [0,52 - 0,76] a 0,52 [0,43 - 0,68], $p < 0,001$. El resto de los biomarcadores de dislipemia no experimentó cambios relevantes.

Figura 4.16
Biomarcadores de dislipemia medidos en los subgrupos del ensayo clínico



(Continúa en la página siguiente)

Figura 4.16*(Continuación de la página anterior)*

Nota. COL, Colesterol total; TRIGL, Triglicéridos; HDLC, Colesterol-HDL; CNH, Colesterol-no-HDL; LDLC, Colesterol-LDL; APOB, Apolipoproteína B; APOA-I, Apolipoproteína AI; LPA, Lipoproteína A. Los datos se representan como se describe en el pie de la Figura 4.1.

4.2.2.6 Influencia de la duración del tratamiento sobre los biomarcadores

Como las participantes en el estudio fueron evaluadas en diferentes momentos dentro de las ventanas temporales establecidas en el protocolo del ensayo (Figura 3.1), el tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento hasta la toma de las muestras no fue el mismo para todas; aprovechando esta circunstancia, analizamos la influencia de esta variable (tiempo de tratamiento) sobre los biomarcadores.

En la Tabla 4.19 se recogen los biomarcadores que cambiaron significativamente en menos de dos semanas y en 14 días o más de tratamiento con pravastatina. El 41% de los embarazos fue monitorizado antes de los 14 días de tratamiento (n=14), mientras que el 59% restante (n=19) fue evaluado después de consumir pravastatina por un espacio de tiempo mayor.

Tabla 4.19

Efecto de la duración del tratamiento con pravastatina sobre los biomarcadores

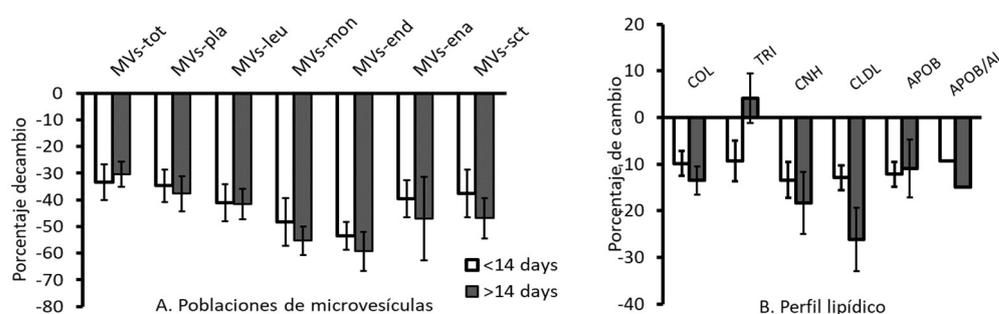
Biomarcador	Días de intervención, <14 días (n=14)				Días de intervención, ≥14 días (n=19)			
	Valor pre-intervención	Valor post-intervención	p	Cambio (%)	Valor pre-intervención	Valor post-intervención	p	Cambio (%)
CATS (mmol/L)	1,58 [1,55 - 1,64]	1,63 [1,56 - 1,71]	0,665	0,3	1,53 [1,45 - 1,65]	1,63 [1,53 - 1,67]	0,047	2,0
AU (mg/dL)	4,7 [4 - 5]	4,9 [3,8 - 6]	0,637	1,3	4,2 [3,7 - 5,25]	4,9 [4,35 - 5,75]	0,017	11,6
PIGF (pg/mL)	94,5 [62,3 - 158,7]	79,6 [49 - 150,3]	0,638	-7,7	77,7 [52,6 - 157,2]	56,7 [40,2 - 91,2]	0,024	-20,2
sFLT-1 (pg/mL)	4760 [3772,7 - 6415,7]	7082 [4115,5 - 8745,5]	0,013	31,8	4899 [3571 - 7684]	8556 [6654 - 1030]	<0,001	80,3
MVs-tot (mvs/μL)	2197 [1908 - 2633]	2002 [1224 - 2182]	0,002	-33,4	1763 [1411 - 3734]	1235 [863 - 2358]	0,001	-30,3
MVs-pla (mvs/μL)	1418 [1262 - 1844]	1299 [592 - 1511]	0,002	-34,7	1131 [767 - 1878]	690 [414 - 1122]	<0,001	-37,7
MVs-leu (mvs/μL)	136 [83 - 215]	101 [52 - 120]	0,002	-41,1	45 [32 - 143]	42 [14 - 71]	<0,001	-41,6
MVs-mon (mvs/μL)	13 [8 - 17]	6 [4 - 9]	0,003	-48,2	15 [10 - 18]	4 [3 - 9]	<0,001	-55,3
MVs-end (mvs/μL)	13 [10 - 17]	7 [4 - 8]	0,005	-53,5	11 [7 - 18]	4 [3 - 5]	<0,001	-59,3
MVs-ena (mvs/μL)	10 [8 - 12]	5 [4 - 7]	0,011	-39,6	7 [3 - 12]	2 [2 - 4]	0,001	-47,1
MVs-sct (mvs/μL)	9 [8 - 11]	7 [3 - 8]	0,021	-37,6	10 [6 - 17]	5 [3 - 6]	<0,001	-46,9
Colesterol total (mg/dL)	250 [216 - 288]	222,5 [191,5 - 254,5]	0,006	-9,9	245 [221 - 264]	216 [185 - 252]	0,001	-13,5
Triglicéridos (mg/dL)	255 [196 - 309]	195,5 [161,2 - 240]	0,047	-9,4	254 [218 - 280]	263 [229 - 307]	0,732	4,1
Colesterol-no-HDL (mg/dL)	179 [130 - 208]	151,5 [117,2 - 168,2]	0,006	-13,4	172 [155 - 220]	139 [115 - 186]	<0,001	-18,3
Colesterol-LDL (mg/dL)	127 [91 - 138]	102 [81,5 - 130,5]	0,013	-12,9	121 [108 - 159]	89 [69 - 125]	<0,001	-26,2
ApoB (mg/dL)	125 [107 - 169]	114 [90,5 - 131]	0,012	-12,2	126 [121,5 - 162]	117 [100,5 - 140]	0,006	-11,0
Relación ApoB/ApoAI	0,54 [0,46 - 0,58]	0,52 [0,42 - 0,58]	0,015	-9,4	0,6 [0,54 - 0,81]	0,53 [0,44 - 0,73]	0,001	-15,0
LpA (mg/dL)	20,3 [9,9 - 38,8]	18,8 [8 - 27,8]	0,600	14,5	13,9 [3,9 - 31,25]	11,1 [4,4 - 34,45]	0,039	-14,1

Nota. Los datos están expresados como mediana [rango intercuartílico]. CATS, capacidad antioxidante total del suero; AU, ácido úrico; PIGF, factor de crecimiento placentario; sFLT-1, forma soluble de la tirosina quinasa tipo 1 similar al FMS; MVs-tot, total de MVs anexina V+; MVs-pla, MVs de plaquetas; MVs-leu, MVs leucocitarias; MVs-mon, MVs de monocitos; MVs-end, MVs de células endoteliales; MVs-ena, MVs de células endoteliales activadas; MVs-sct, MVs de sincitiotrofoblasto; ApoB, apolipoproteína B; ApoAI, apolipoproteína AI; LpA, lipoproteína A.

Como se observa, el AU y la CATS se elevaron de forma significativa solo cuando el tratamiento se extendió más allá de dos semanas; en el primer caso el aumento fue de 0,3% vs 2%, y en el segundo de 1,3% vs 11,6%, para antes de los 14 días y después, respectivamente. Por otro lado, no se detectó un efecto positivo de la pravastatina sobre los biomarcadores de angiogénesis; los niveles de PIGF se redujeron significativamente en ambos periodos, 7,7% para menos de dos semanas y 20,2% para más de dos, mientras que los de sFlt-1 tuvieron un comportamiento contrario, aumentaron un 31,8% antes de los 14 días y llegaron hasta un 80,3% de incremento cuando se midieron después. Al analizar la liberación de MVs encontramos una reducción significativa de la mayoría de las poblaciones investigadas, con una tendencia a disminuir más cuando el tiempo de tratamiento sobrepasó los 14 días. Así, para menos de dos semanas y más de 14 días, la reducción de MVs-pla fue de 34,7% vs 37,7%, la de MVs-leu de 41,1% vs 41,6%, la de MVs-mon de 48,2% vs 55,3%, la de MVs-end de 53,5% vs 59,3%, la de MVs-ena de 39,6% vs 47,1%, y la de MVs-sct de 37,6% vs 49,6%, respectivamente. Sobre el perfil lipídico también se registraron cambios, casi todos en la dirección esperada; por ejemplo, para menos de dos semanas y más de 14 días, los niveles de colesterol total se redujeron un 9,9% vs 13,5%, los de CNH un 13,4% vs 18,3%, los de colesterol-LDL un 12,9% vs 26,2% y la relación ApoB/ApoA1 un 9,4% vs 15,0%. En cambio, los triglicéridos solo disminuyeron cuando se midieron antes de los 14 días, la ApoB disminuyó más con menos tiempo y la LpA tuvo un comportamiento diferente al esperado porque aumentó en las gestantes tratadas durante más días. En la Figura 4.17 está representado mediante un diagrama de barras el porcentaje de cambio que se produjo en las distintas poblaciones de MVs y en algunas variables del perfil lipídico para los dos tiempos de tratamiento con pravastatina analizados.

Figura 4.17

Porcentaje de cambio en el valor de las microvesículas y en el perfil lipídico en función del tiempo de tratamiento con pravastatina



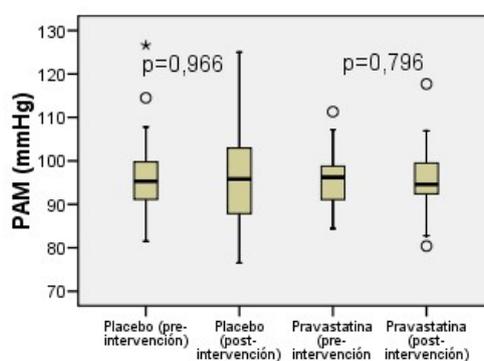
Nota. MVs-tot, total de MVs anexina V+; MVs-pla, MVs de plaquetas; MVs-leu, MVs leucocitarias; MVs-mon, MVs de monocitos; MVs-end, MVs de células endoteliales; MVs-ena, MVs de endotelio activado; MVs-sct, MVs de sincitiotrofoblasto; COL, colesterol total; TRI, triglicéridos; CNH, colesterol-no-HDL; LDL, colesterol-LDL; APOB, apolipoproteína B; APOB/AI, relación APOB/APOAI.

4.2.2.7 Influencia de la pravastatina sobre la presión arterial media

La PAM de las gestantes del grupo de alto riesgo no experimentó cambios significativos durante el ensayo clínico. En las que recibieron placebo, la PAM al inicio de la intervención fue de 95,3 [91 - 100,7] mmHg, un valor similar al medido posteriormente, 95,8 [87,3 - 103,3] mmHg, $p=0,966$. Las participantes a las que se administró pravastatina comenzaron con una PAM de 96,2 [91,1 - 99,8] mmHg, que se redujo a 94,6 [91,7 - 100,1] mmHg después del tratamiento, aunque este cambio no fue significativo estadísticamente, $p=0,796$. En la Figura 4.18 están representados los valores de esta variable en los dos brazos del ensayo.

Figura 4.18

Presión arterial media medida en los subgrupos del ensayo clínico



Nota. PAM, presión arterial media. Los datos se representan como se describe en el pie de la Figura 4.1.

5 Discusión

En la PE ocurre una placentación defectuosa que produce la liberación de factores anti-angiogénicos, junto a un aumento del estrés oxidativo y la inflamación, que conducen a una disfunción endotelial sistémica y a las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

La medición de biomarcadores circulantes en sangre periférica involucrados en la fisiopatología de la disfunción endotelial puede ofrecer una valiosa información sobre el estado de los mecanismos y factores implicados en el desarrollo de la PE y ser de gran ayuda en la valoración del impacto de diferentes abordajes de la enfermedad.

En este estudio, a través de distintos biomarcadores, se evalúa la función endotelial vascular en embarazadas con bajo y alto riesgo de PE a término, así como el efecto de la pravastatina sobre la función endotelial vascular en embarazadas con alto riesgo de PE, tratadas desde las semanas 35-37 de gestación hasta el parto.

5.1 Análisis de los grupos de estudio

5.1.1 Características demográficas y clínicas

La determinación del riesgo de PE a término se puede realizar de forma efectiva mediante el análisis de factores maternos y biomarcadores a las 35-37 semanas de gestación. Esta combinación de variables permite predecir hasta el 70% de los embarazos que posteriormente desarrollarán PE con una tasa de falsos positivos inferior al 10% (Panaitescu et al., 2018). Las características demográficas y clínicas de las embarazadas de forma aislada permiten identificar el 28% de los casos, un hecho que refleja la importante contribución de los factores maternos al desarrollo de la PE y justifica la necesidad de incluirlos y analizarlos en este estudio.

5.1.1.1 Edad materna

La edad materna avanzada es un factor de riesgo para el desarrollo de PE. Las mujeres con más de 35 años tienen 4,5 veces más riesgo de padecerla que las de menor edad (Dianing et al., 2019). En nuestra muestra, la edad media de las participantes (Tabla 4.1) fue similar a la publicada dentro de los indicadores de fecundidad del Instituto Nacional de Estadística (INE), que la fijó en 32,3 años en 2019, un valor que no ha parado de aumentar desde 1975, año en que comenzaron a recogerse estos datos, cuando las mujeres tenían sus hijos con una media 28,8 años. De igual forma, el porcentaje de embarazadas que superó los 35 años (Tabla 4.2) fue

parecido al recogido por el INE, que reportó un 40,1% para este indicador en 2019. En la muestra analizada no se encontraron diferencias significativas ni en la edad materna ni en la proporción de embarazos con más de 35 años entre los grupos con bajo y alto riesgo de PE a término, por lo que no se puede analizar la influencia de esta variable en los resultados obtenidos.

5.1.1.2 Peso, estatura e índice de masa corporal

Un alto IMC es otro factor de riesgo importante tanto para la PE como para la ECV (Bodnar et al., 2007; Spradley et al., 2015). La estatura materna baja y el IMC alto aumentan el riesgo de PE. La asociación entre estas variables y la enfermedad parece especialmente fuerte, sobre todo entre la estatura baja y los tipos graves de PE, y el IMC alto y los tipos leves de PE (Bodnar et al., 2005; Sohlberg et al., 2012).

La importancia del IMC como predictor de la PE se debe a su relación casi lineal sobre la incidencia de la enfermedad. Se ha demostrado que la incidencia es del 7% en las embarazadas con obesidad de clase I (IMC: 30-34,9 kg/m²), del 9% con clase II (IMC 35-39,9 kg/m²), del 11% con clase III (IMC 40-49,9 kg/m²), del 13% en mujeres súper obesas (IMC>50 kg/m²), mientras que las embarazadas con peso normal (IMC 18,5-24,9 kg/m²) tienen un 3% de probabilidad de desarrollar PE (Mbah et al., 2010).

En nuestro estudio, las gestantes con alto riesgo tuvieron una talla más baja (Tabla 4.1) y la cantidad de mujeres obesas duplicó porcentualmente a las del grupo control (Tabla 4.3). También, el número de mujeres con obesidad de grados I, II y III fue mayor entre los casos con riesgo alto de PE. Además, aunque la diferencia no fue significativa estadísticamente, entre las gestantes que desarrollaron PE posteriormente se encontró un IMC todavía más alto (Tabla 4.4). Estos resultados son coherentes con lo publicado sobre la influencia de estos factores en el desarrollo de PE (Bodnar et al., 2005; Mbah et al., 2010; Spradley et al., 2015).

Por otro lado, se sabe que la obesidad aumenta el riesgo de desarrollo de la PE de inicio temprano y de inicio tardío (Mbah et al., 2010). Se ha propuesto que la etiología de la PE temprana y tardía es diferente, estando la placentación anormal implicada en el desarrollo de la PE de inicio temprano, mientras que un medio metabólico materno anormal en la concepción es lo que se relaciona con la PE de inicio tardío (Raymond & Peterson, 2011).

Según Spradley *et al*, es probable que un ambiente metabólico anormal esté relacionado con una mayor secreción de factores por parte del tejido adiposo, que no solo es un depósito de triglicéridos, sino un órgano endocrino que sintetiza y secreta varias hormonas y factores inflamatorios. Debido a que el aumento de la grasa corporal se asocia con niveles elevados de

citoquinas circulantes, las mujeres obesas tienen más probabilidades que las mujeres con peso normal de comenzar el embarazo en un estado inflamatorio subclínico. Además de esto, Spradley y su grupo también señalaron una relación positiva entre el IMC y la activación de las vías inflamatorias dentro de la placenta, lo que sugiere que los factores metabólicos exageran la liberación de factores inflamatorios inducidos por la isquemia placentaria. Por lo tanto, es muy probable que un estado proinflamatorio nocivo antes del embarazo se acompañe de una disfunción vascular inicial que dé como resultado un umbral más bajo y una mayor sensibilidad a la capacidad combinada de los factores metabólicos relacionados con la obesidad y los factores inflamatorios isquémicos placentarios solubles para provocar disfunción endotelial materna e hipertensión (Spradley et al., 2015). Esto representa un mecanismo potencial por el cual la obesidad aumenta el riesgo de desarrollar PE de inicio tardío que también podemos contrastar en este estudio; como se verá más adelante, en el grupo con alto riesgo de PE a término, donde el IMC y la cantidad de obesas fue superior que en el grupo control, los niveles de dos biomarcadores de inflamación, IL-6 y GDF-15 (Anexo IX, Tabla A.1), fueron mayores, al igual que la PAM (Tabla 4.1). Además, entre las gestantes con riesgo, 7 desarrollaron PE a término (Tabla 4.1) y ninguna lo hizo en el grupo control.

En el presente estudio, se exploraron las relaciones de dependencia entre el IMC y los biomarcadores, no encontrando correlaciones estadísticamente significativas. Además, investigamos el comportamiento de los biomarcadores estratificando las gestantes utilizando el IMC y tampoco detectamos cambios entre los grupos I y II. El mismo resultado obtuvimos al comparar los embarazos que desarrollaron PE con el resto de las gestaciones del grupo de alto riesgo. Es probable que la *n* del estudio, y en consecuencia el escaso número de embarazos afectados por esta situación haya impedido evidenciar estas interacciones.

5.1.1.3 Raza

Casi todas las mujeres embarazadas incluidas en el estudio fueron de raza blanca (Tabla 4.1). Dentro de los criterios de elegibilidad para el cribado, no hablar con fluidez el idioma local y no contar con un intérprete fue motivo de exclusión, un hecho que puede haber influido en el bajo porcentaje de pacientes de otras razas de la muestra. Se conoce la influencia de la etnia y la raza en el riesgo de PE, siendo más alto entre las mujeres de origen africano (J. Johnson & Louis, 2022). Según datos del INE, en el año 2019 el 15% de las madres que dieron a luz en la Región de Murcia provenían de países africanos, un dato que se aleja del porcentaje registrado en esta muestra y que no permite valorar el impacto de esta variable en los resultados.

5.1.1.4 Hábito de fumar, consumo de alcohol o drogas

En la muestra estudiada no encontramos mujeres que consumieran alcohol o drogas, y aunque el hábito tabáquico fue mayor en el grupo control, este comportamiento no alcanzó significación estadística (Tabla 4.1). Se sabe que fumar durante el embarazo puede provocar muchos efectos adversos, como la restricción del crecimiento fetal, el desprendimiento de la placenta, la muerte fetal y el trabajo de parto prematuro, pero fumar es la única exposición ambiental conocida que reduce de manera consistente el riesgo de PE y de hipertensión gestacional (England & Zhang, 2007). Un gran paso adelante en la comprensión de este efecto protector fue la publicación de un estudio epidemiológico por Wikström *et al* en 2010, usando datos del Registro Médico Sueco de Nacimientos de más de 600 000 mujeres nórdicas (Wikström *et al.*, 2010), en el que concluyeron que son los productos de la combustión del tabaco, como el monóxido de carbono, los que protegen contra la PE, pero que los componentes del tabaco, como la nicotina, no.

Al estudiar la influencia del hábito de fumar sobre los biomarcadores propuestos, encontramos que las medianas calculadas entre fumadoras y no fumadoras para la CATS y las MVs-sct diferían significativamente (Tabla 4.10). Las fumadoras tuvieron mayor CATS y una menor cantidad de MVs-sct en la circulación materna, permitiendo sugerir que asociados a este factor los embarazos transcurren con menores niveles de estrés oxidativo y que el aporte de factores placentarios que producen disfunción endotelial, como las MVs-sct, es significativamente menor.

5.1.1.5 Nuliparidad

La PE también se ha definido como una enfermedad de primeros embarazos (Luo *et al.*, 2007). Sin embargo, los efectos y mecanismos de la asociación de la primiparidad con la PE no han sido claramente establecidos. En este sentido, se ha propuesto que la PE es la consecuencia de una reacción inmunitaria materna contra los antígenos paternos expresados en la placenta y que esta reacción podría provocar una invasión trofoblástica defectuosa y la subsiguiente disfunción placentaria. El menor riesgo de PE entre mujeres multíparas también se ha atribuido a un proceso de desensibilización que produce la exposición a antígenos paternos en la placenta durante embarazos anteriores. Además, el menor riesgo se ha vinculado a una invasión trofoblástica más suave después de la modificación de las arterias espirales maternas durante un primer embarazo (Hernández-Díaz *et al.*, 2009). Por otro lado, se ha defendido que el riesgo de PE en mujeres nulíparas puede deberse a un estado antiangiogénico, caracterizado por niveles circulantes de sFlt-1 y relaciones sFlt-1/PlGF más altos que los de embarazos de

múltiparas (Bdolah et al., 2014), sugiriendo una asociación entre el desequilibrio angiogénico y la condición nulípara.

En nuestra muestra observamos un porcentaje significativamente mayor de mujeres nulíparas en el grupo con alto riesgo de PE a término (Tabla 4.1), un dato que coincide con el comportamiento que se atribuye de forma generalizada a este factor ante el riesgo de PE.

Al explorar la relación entre la nuliparidad con los biomarcadores de este estudio, encontramos diferencias significativas en los niveles de HCIS, GDF-15, MVs-leu y MVs-sct entre las gestantes nulíparas y múltiparas (Tabla 4.10). Este resultado permite sugerir que la ausencia de embarazos previos aumenta la probabilidad de encontrar niveles superiores de estrés oxidativo, un estatus proinflamatorio exacerbado y una elevación de biomarcadores de disfunción endotelial en las gestantes nulíparas en el último trimestre de gestación, un hallazgo que puede ayudar a explicar el mayor riesgo de PE asociado a esta condición. No obstante, para establecer una relación fisiopatológica definitiva entre la nuliparidad, estos biomarcadores y la PE, serán necesarios estudios de mayor alcance.

5.1.1.6 Historia familiar de preeclampsia

Se estima que la heredabilidad de la PE es del 30% (Nilsson et al., 2004) y que su etiología involucra contribuciones genéticas maternas y paternas en múltiples *loci* y un componente ambiental sustancial (Redman & Sargent, 2005). Boyd *et al* publicaron una investigación sobre la asociación de los antecedentes personales y familiares de PE con el riesgo de PE de inicio temprano, intermedio y tardío (Boyd et al., 2013) donde plantearon que la ocurrencia de PE en la familia de una mujer está asociada a un aumento del 24-163% en el riesgo de PE, con una asociación más fuerte para la PE de inicio temprano e intermedio cuando el antecedente proviene de la familia materna. La PE en la familia paterna no afectó el riesgo de PE de inicio temprano y solo se asoció débilmente con el riesgo de PE de inicio intermedio y tardío. Según estos autores, la PE de inicio temprano parece tener un mayor componente genético, mientras que los factores ambientales probablemente contribuyan más a la PE de aparición tardía. El papel de los genes paternos en la etiología de la PE parece ser limitado.

En este trabajo, en sintonía con la evidencia disponible sobre la historia familiar de PE y el riesgo de PE, se constataron diferencias significativas entre grupos los grupos I y II, al encontrar un número significativamente mayor de mujeres en el grupo con alto riesgo de PE que tenían familiares diagnosticados con la enfermedad (Tabla 4.1). Al estudiar la relación de la historia familiar de PE de las participantes con los biomarcadores propuestos, encontramos diferencias

estadísticamente significativas en los niveles de CATS y MVs-leu (Tabla 4.10); estas gestantes, con una capacidad de defensa antioxidante disminuida, y un número más elevado de MVs-leu en el compartimiento vascular, junto al antecedente familiar de PE, podrían estar en una situación de mayor vulnerabilidad para el desarrollo de la enfermedad, aunque para confirmar estas asociaciones y sus consecuencias serán precisos estudios más completos, con un diseño diferente.

5.1.1.7 Comorbilidades

En los antecedentes médicos de hipertensión crónica, diabetes mellitus, lupus eritematoso sistémico o síndrome antifosfolípido no se encontraron diferencias significativas, aunque el grupo con alto riesgo tuvo el doble de pacientes con alguna de estas enfermedades que las reportadas en el grupo control (Tabla 4.1). Nosotros atribuimos este resultado a la reducida n del estudio, ya que estas enfermedades son factores de riesgo bien documentados para el desarrollo de PE a término (Andrietti et al., 2016).

5.1.1.8 Técnicas de reproducción asistida

Varios estudios señalan que el riesgo de PE es más alto entre las mujeres que conciben con técnicas de reproducción asistida (Omani-Samani et al., 2020). En esta investigación casi 1/5 de los embarazos en el grupo de alto riesgo fue obtenido con estas técnicas, mientras que en el grupo control solo 1/10 se consiguió así (Tabla 4.1). Aunque fueron más los embarazos en los que se utilizaron técnicas de reproducción asistida en el grupo con alto riesgo, no se alcanzó la significación estadística, probablemente por el reducido número de gestantes estudiadas.

5.1.1.9 Presión arterial media

La PAM es un marcador biofísico de gran utilidad en el cribado de la PE. Como esta variable depende del peso materno y de la hipertensión arterial crónica sus niveles se suelen estandarizar en MoM para aumentar su eficacia (Wright et al., 2015). En la muestra analizada en este trabajo se registraron PAM más elevadas en el grupo de alto riesgo (Tabla 4.1); los MoM de esta variable se comportaron de igual forma y también alcanzaron la significación estadística. Además, en las pacientes que tuvieron PE la PAM fue significativamente mayor a las 35 semanas que en aquellas con riesgo que no desarrollaron la enfermedad (Tabla 4.5).

La PAM fue la variable clínica que tuvo la asociación más extensa con los biomarcadores del estudio, observándose diferencias significativas, utilizando un punto de corte de 95 mmHg,

entre las medianas de dos biomarcadores de estrés oxidativo (AU y HCIS), un biomarcador de inflamación (IL-6), y 4 biomarcadores relacionados con la función endotelial (MVs-leu, MVs-end, MVS-ena y MVs-sct). El hecho de que las gestantes con PAM superiores a los 95 mmHg tuvieran niveles de estrés oxidativo superiores, un estatus proinflamatorio incrementado y una función endotelial vascular más comprometida (Tabla 4.10), es altamente compatible con la naturaleza multifactorial de la fisiopatología de la PE y extensible a la situación de riesgo incrementado en que se encontraban las pacientes del grupo II de este trabajo.

Por otro lado, también encontramos una relación de dependencia de la PAM con el AU, la HCIS y las MVs-leu. En la Tabla 4.11 se recogen los coeficientes de regresión de estas tres variables, que representan el cambio medio en la PAM, para una unidad de cambio en la variable predictora mientras se mantienen constantes el resto de las variables presentes en el modelo. El control estadístico que ofrece la regresión es importante, porque aísla el rol de una variable del resto de las variables incluidas en el modelo. Este análisis no solo establece una relación estadística entre los 3 biomarcadores y la variable dependiente, sino que apoya la hipótesis de que en el tercer trimestre del embarazo, el incremento de los niveles de AU, HCIS y MVs-leu puede provocar disfunción endotelial, que se manifiesta a nivel fisiológico como un incremento de la PAM, conduciendo presumiblemente, junto a otros factores, a un aumento del riesgo de sufrir PE o al desarrollo de la enfermedad.

5.1.1.10 Consumo de aspirina en dosis bajas

El hallazgo de un mayor número de embarazos tratados con aspirina en el grupo con alto riesgo de PE se justifica por el diseño del estudio (Tabla 4.1); en primer lugar, hay que tener en cuenta que existen factores de riesgo comunes para la PE temprana y la tardía y que las pacientes con cribado positivo para la PE pretérmino tenían más probabilidad de tener cribados positivos para la PE a término. En segundo lugar, como el tratamiento con aspirina se ha universalizado, todas las pacientes con screening positivo de PE pretérmino fueron tratadas y por esta razón en el grupo con alto riesgo encontramos más gestantes que la recibieron. Por otro lado, el consumo de aspirina no afecta el riesgo de PE a término. Nicolaides y su grupo demostraron hace algunos años (Rolnik et al., 2017b) que el tratamiento con aspirina no disminuye el riesgo de PE a término. Igualmente, en una amplia revisión sistemática y metaanálisis realizado por Roberge *et al* en 2018 sobre el tratamiento con aspirina para la reducción de la PE (Roberge et al., 2018) se llegó a la conclusión de que la aspirina reduce el riesgo de PE pretérmino, pero no el de PE a término, y sólo lo hace cuando se inicia a las 16 semanas de gestación y a una dosis diaria de 100 mg.

5.1.1.11 Índice de pulsatilidad de la arteria uterina

La ecografía doppler es un método confiable y no invasivo para examinar la perfusión uteroplacentaria. El Doppler de la arteria uterina a las 11-14 semanas de gestación identifica una alta proporción de mujeres que desarrollan PE severa y/o restricción del crecimiento fetal (Martin et al., 2001). Varios estudios con ecografía doppler han informado que en embarazos que desarrollan PE, especialmente en aquellos que requieren un parto prematuro, el UtA-PI está aumentado en el primer, segundo y tercer trimestre del embarazo. Sin embargo, la UtA-PI depende de algunas características maternas y del historial médico de las gestantes y para su uso efectivo en la evaluación y detección de riesgos estas covariables deben tenerse en cuenta. Esto se consigue estandarizando los niveles de UtA-PI en MoM (Tayyar et al., 2016). Nicolaidis *et al* incluyeron este parámetro en su modelo de cálculo del riesgo de la PE pretérmino (O’Gorman et al., 2016); sin embargo, no mejoraba su modelo cuando utilizaban este marcador en la predicción de la PE a término (Panaitescu et al., 2018). En consonancia con estos resultados, nosotros tampoco encontramos diferencias significativas entre las UtA-PI de los dos grupos estudiados, donde las gestantes tenían de 35-37 semanas de embarazo (Tabla 4.1).

5.1.1.12 Diabetes gestacional

La DMG se define como la intolerancia a la glucosa diagnosticada por primera vez durante el embarazo (Metzger et al., 2007). La DMG y la PE son complicaciones comunes en el embarazo con factores de riesgo similares, como la obesidad y la edad avanzada, entre otros. Tanto en la DMG como en la PE, los procesos fisiopatológicos que tienen lugar implican estrés oxidativo, liberación de factores proinflamatorios y disfunción endotelial vascular (Yang & Wu, 2022), todo lo cual aumenta el riesgo futuro de diabetes materna y de ECV. La DMG aumenta el riesgo de PE independientemente de otros factores (Östlund et al., 2004). Como era de esperar, una cantidad significativamente superior de gestantes del grupo con alto riesgo de PE a término desarrolló DMG (Tabla 4.1).

En este trabajo casi el 12% de los embarazos con riesgo desarrolló diabetes durante la gestación, mientras que solo uno del grupo control tuvo esta patología.

5.1.1.13 Preeclampsia

La PE es un trastorno médico complejo que cada año es responsable de más de 500 000 muertes fetales y neonatales y de más de 70 000 muertes maternas a nivel global. Se diagnostica por la presencia de hipertensión *de novo* después de las 20 semanas de gestación, acompañada de proteinuria y/o evidencia de lesión renal aguda materna, disfunción hepática, trastornos neurológicos, hemólisis o trombocitopenia, o restricción del crecimiento fetal (Brown et al., 2018). Aunque en su fisiopatología intervienen diversos factores, el más importante es la instauración de una insuficiencia placentaria, que induce un estado antiangiogénico en la gestante y el desarrollo de una disfunción endotelial en diversos órganos, desencadenando las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

El cribado eficaz de la PE pretérmino con un parto de <37 semanas de gestación puede realizarse a las 11-13 semanas mediante el análisis de una combinación de características demográficas maternas e historia clínica, con mediciones de la PAM, el UtA-PI y el PIGF, con una tasa de detección del 75% y una proporción de cribados positivos del 10% (O’Gorman et al., 2016). El cribado mediante factores maternos y biomarcadores a las 35-37 semanas de gestación puede identificar también una alta proporción de embarazos que desarrollan PE tardía (Panaitescu et al., 2018). En este caso puede predecir el 70% de los embarazos que posteriormente desarrollan PE, con una tasa de cribados positivos del 10%, un rendimiento que se logra con la inclusión de la PAM, el PIGF y el sFlt-1 en el cálculo del riesgo, sin evidencia de mejora con la adición del UtA-PI.

En este trabajo el riesgo de PE fue determinado a las 35 semanas de gestación. De las 125 pacientes incluidas en la muestra 57 pacientes se asignaron al grupo control debido al bajo riesgo estimado y 65 fueron identificadas como gestantes con riesgo alto de PE a término (Tabla 4.1). Ninguna gestante del grupo control tuvo PE a término. Sin embargo, en el grupo de alto riesgo, 7 (10,3%) mujeres la desarrollaron. Salvando la reducida n del estudio, la valoración del riesgo en esta muestra fue adecuada: todos los casos que tuvieron PE fueron clasificados previamente como de alto riesgo; y, por otro lado, ningún embarazo de bajo riesgo desarrolló la enfermedad. Además, en el subgrupo identificado como de alto riesgo, el porcentaje de embarazos que finalmente desarrolló la enfermedad coincide con el reportado en estudios de mayor alcance (Andrietti et al., 2016).

5.1.1.14 Hipertensión inducida por el embarazo

La hipertensión inducida por el embarazo, también llamada hipertensión gestacional, es la que surge *de novo* después de las 20 semanas de gestación en ausencia de proteinuria y sin anomalías bioquímicas o hematológicas. El riesgo de complicaciones depende del momento en que se presenta y es una entidad clínica importante, en primer lugar, porque un 25% de estas mujeres puede desarrollar PE (siendo esta tasa mayor cuanto más temprana es su aparición) y, en segundo lugar, porque la hipertensión gestacional, al igual que la PE, también se asocia con la ECV a largo plazo (Brown et al., 2018). En nuestra muestra 11 gestantes del grupo de alto riesgo de PE presentaron este trastorno hipertensivo del embarazo (Tabla 4.1) y una de ellas desarrolló PE (Tabla 4.5). Además, pudo constatarse la relación entre la hipertensión inducida por el embarazo y varios de los biomarcadores estudiados (Tabla 4.10), al encontrar diferencias significativas en los niveles de AU, HCIS, IL-6, GDF-15 y MVs-sct entre las gestantes que sufrieron hipertensión y las que no la tuvieron, lo que permite sugerir que en las embarazadas hipertensas existen niveles más elevados de estrés oxidativo, un estatus proinflamatorio incrementado y un endotelio sobre el que influyen factores que lo predisponen a la disfunción.

5.1.1.15 Resultados del embarazo

La PE se ha asociado extensamente a un aumento de la morbilidad y mortalidad materna y neonatal, así como a una mayor presencia de complicaciones perinatales (Hutcheon et al., 2011; Nirupama et al., 2021). El riesgo de PE, sin embargo, implica una condición que está determinada por características maternas y por el comportamiento de determinados biomarcadores que, en general, suponen cierta vulnerabilidad y una posibilidad incrementada del desarrollo de eventos adversos en el embarazo que transcurre en esta situación. En línea con este planteamiento, en el grupo de alto riesgo estudiado encontramos una mayor frecuencia de partos inducidos que en el grupo de bajo riesgo y un porcentaje de partos vaginales menor (Tabla 4.1). Estos datos empeoran si analizamos solamente las gestantes que desarrollaron PE en el grupo de alto riesgo, donde tuvieron que ser inducidos 6/7 partos y solo 2/7 partos fueron vaginales (Tabla 4.4), probablemente a consecuencia del manejo obstétrico de la enfermedad. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ni en la edad gestacional en el momento del parto ni en el peso de los recién nacidos entre los grupos de bajo y alto riesgo. Tampoco encontramos cambios en estas dos variables cuando se analizaron por separado los embarazos que desarrollaron PE, entre los que no se reportaron pesos al nacer por debajo de los 2500 g.

5.1.2 Análisis de los biomarcadores en los grupos de estudio

Los mecanismos fisiopatológicos moleculares responsables de la PE todavía se encuentran en un amplio proceso de debate y estudio. Actualmente se piensa que la PE está causada por la interacción o combinación de factores de origen materno y placentario. La contribución variable de los mecanismos fisiopatológicos subyacentes en los que participan estos factores es lo que da como resultado los distintos fenotipos clínicos observados en la PE. En la PE que ocurre tardíamente en la gestación, denominada PE materna, se produce una disfunción vascular materna previa, estrés oxidativo, y anormalidades metabólicas, secundarias a diabetes, obesidad, y a otros factores como la edad y las alteraciones inmunes, que son exacerbadas por la gestación. Por ello el estudio de los biomarcadores circulantes asociados a la fisiopatología de la PE ofrece una oportunidad para examinar su comportamiento en gestantes diagnosticadas de alto riesgo de PE tardía con respecto a las gestaciones de bajo riesgo.

5.1.2.1 Biomarcadores de estrés oxidativo

Durante la última década se ha logrado un progreso sustancial en la comprensión del papel del estrés oxidativo como determinante molecular fundamental de la PE. En este sentido, se plantea que la implantación inadecuada de la placenta (PE precoz) o la mala perfusión placentaria subsecuente a la inadecuada adaptación hemodinámica materna (PE tardía) conduce a una disminución de la irrigación placentaria que crea un entorno favorable para el desarrollo de este estrés. A su vez, el daño oxidativo en la placenta produce inflamación, apoptosis y la liberación de detritos celulares en la circulación materna, junto a factores anti-angiogénicos, citoquinas y oxidantes, que actúan sobre el endotelio vascular materno induciendo y/o empeorando el estrés oxidativo y estimulando la producción y secreción de citoquinas proinflamatorias, así como de compuestos vasoactivos que dan como resultado una disfunción endotelial sistémica. De hecho, el estrés oxidativo parece ser el componente central de la disfunción placentaria y de la disfunción endotelial, la etiología de la PE (Aouahe et al., 2018).

Se conoce que el equilibrio antioxidante está alterado en los embarazos con PE. En nuestro estudio observamos una CATS más baja en el grupo con riesgo que en los embarazos normales (Figura 4.1). La CATS en los fluidos corporales está directamente relacionada con la concentración de antioxidantes y la producción de radicales libres. La disminución observada en el grupo con riesgo podría explicarse por un agotamiento del sistema antioxidante, debido al aumento del estrés oxidativo producido en las pacientes con riesgo. Estos resultados son

coherentes con los obtenidos por otros grupos (Karacay et al., 2010; Kaur et al., 2008), que han reportado una merma del estatus antioxidante total en los embarazos con PE.

Altos niveles de HCIS son un factor de riesgo comprobado para la enfermedad vascular (Peng et al., 2015). Su incremento puede dañar las células endoteliales y causar disfunción endotelial, que es una característica de la PE. Se sabe que en el embarazo la HCIS alta es un factor de riesgo para la PE (Dodds et al., 2008), y que en gestaciones con PE los niveles comienzan a aumentar desde el principio del embarazo y se mantienen altos hasta el parto (Wadhvani et al., 2016). Pertegal y colaboradores encontraron niveles significativamente altos de HCIS en el suero de mujeres con PE (Pertegal et al., 2016). También se ha reportado que cuando la PE es severa los niveles de HCIS son significativamente más altos que en las formas moderadas de la enfermedad (Baksu et al., 2006; Dai et al., 2021). Estos datos son coherentes con los resultados de esta investigación, donde aparecen concentraciones más altas de HCIS sérica en las embarazadas con alto riesgo de PE a término comparadas con las de gestantes con bajo riesgo (Figura 4.1); además, entre las 7 mujeres que tuvieron PE los valores tendieron a ser más elevados (Tabla 4.5), aunque el cambio observado no alcanzó significación estadística, posiblemente por el escaso número de mujeres que desarrolló PE en el estudio.

Trabajos anteriores sugieren que la hiperhomocisteinemia puede contribuir al desarrollo de PE por la acumulación de ADMA y conducir de esta forma a la disfunción endotelial (Dymara-Konopka & Laskowska, 2019; Mao et al., 2010). Coincidentemente, nosotros hemos encontrado que los embarazos con riesgo tienen niveles de ADMA aumentados (Fig. 4.6) y que las dos variables guardan una correlación moderada positiva y estadísticamente significativa ante el riesgo de PE (Tabla 4.9). Es conocido que la HCIS puede inhibir la actividad de la dimetil arginina dimetil aminohidrolasa endotelial, la enzima que hidroliza el ADMA a L-citrulina y dimetilamina, provocando su acumulación (Stühlinger et al., 2001). El ADMA es un inhibidor endógeno de la enzima eNOS, que en consecuencia provoca una disminución del NO disponible, un potente vasodilatador endógeno que juega un papel importante en la regulación del flujo sanguíneo y la presión arterial durante el embarazo; es probable que la menor producción de NO por el incremento de ADMA fuera un factor importante en la elevación de la PAM que se produjo en los pacientes con riesgo de PE a término.

En los últimos años, la acumulación de evidencia acerca de los efectos del AU sobre el estrés oxidativo, la inflamación y el endotelio, y su probable papel en la fisiopatología de la PE, ha renovado el interés por este biomarcador. Gran cantidad de investigaciones dan cuenta de su aumento en la PE, particularmente en su gravedad (Khaliq et al., 2018; Ugwuanyi et al., 2021),

aunque en ocasiones se han publicado resultados contradictorios (Cnossen et al., 2006; Williams & Galerneau, 2002).

En este trabajo, encontramos que el AU es más alto en el grupo de pacientes con riesgo de PE a término (Figura 4.1), resultado comparable al de Corominas *et al*, que informaron en varias cohortes un incremento del AU a partir de la semana 20 de gestación en todas las presentaciones de PE estudiadas (Corominas et al., 2022). El AU es un biomarcador conocido de isquemia placentaria, estrés oxidativo y daño renal, características que se dan en la PE (Damiano et al., 2014) que activan la enzima xantina oxidasa provocando hiperuricemia.

En la muestra estudiada existe una correlación positiva moderada entre el AU y el sFlt-1 y negativa moderada entre AU y PIGF (Tabla 4.9), un comportamiento que va en la dirección esperada para estos biomarcadores, porque en la PE, y por extensión ante un riesgo elevado de PE, existen alteraciones en la angiogénesis, un menor desarrollo de la vasculatura fetoplacentaria y un aumento de la formación de ERO (Damiano et al., 2014) que aceleran el recambio de tejido trofoblástico, con el consiguiente aumento de la producción de AU por la activación de la xantina oxidasa.

En los embarazos estudiados también se comprobó un incremento correlativo moderado de los niveles de AU y GDF-15 (Tabla 4.9). El GDF-15 es una molécula inducida por el estrés, regulada al alza en respuesta a la lesión celular y la inflamación, que se ha encontrado elevada entre mujeres que más tarde desarrollan PE y en aquellas con la enfermedad ya establecida (Cruikshank et al., 2021). Nuestro resultado está en línea con el planteamiento anterior y respalda la hipótesis de que el aumento del AU está relacionado con la disfunción endotelial materna y la respuesta inflamatoria sistémica exacerbada que se presenta ante el riesgo alto de PE y en la PE establecida; una sugerencia ya hecha por otros grupos (Mulla et al., 2011; Redman et al., 2022), que abre una ventana a su determinación junto a otros biomarcadores para mejorar el diagnóstico y la monitorización de la PE. Además, debido a esta interacción del AU con citoquinas proinflamatorias como el GDF-15, puede sugerirse que el aumento de los niveles de AU en el plasma de las pacientes con riesgo de PE representa una contribución directa a la fisiopatología de la PE por su capacidad de promover la inflamación.

Por otro lado, también se ha reportado que el GDF-15 es un biomarcador potencial para el estudio de ECV, incluyendo la enfermedad de las arterias coronarias, la insuficiencia cardíaca y la hipertensión pulmonar (Wollert et al., 2017), una característica que podría ser de utilidad en el seguimiento a largo plazo de la salud cardiovascular de las embarazadas con riesgo, que desarrollen o no PE.

5.1.2.2 Biomarcadores de inflamación

Cada vez hay más pruebas de la importancia que tienen los mecanismos inmunitarios en la patogenia de la PE, en la que se produce un desequilibrio entre las citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias que constituye un vínculo clave entre la isquemia placentaria y la disfunción endotelial. En este contexto se elevan marcadores séricos de inflamación con potencial para evaluar la función endotelial, así como para la predicción, el diagnóstico y el pronóstico de la PE. Esto nos llevó a medir la IL-6, el GDF-15 y la PCR en las mujeres embarazadas del estudio, bajo la hipótesis de que en las gestantes con riesgo el desbalance de los sistemas de regulación inmunológicos daría lugar a cambios significativos en los niveles de estos biomarcadores de inflamación.

La IL-6 es una citoquina con actividad principalmente proinflamatoria, secretada por leucocitos, células endoteliales y fibroblastos, que se expresa también en el aparato reproductor femenino y en los tejidos gestacionales. Su aumento contribuye al daño endotelial que se produce en la PE, pues no solo está involucrada en el proceso inflamatorio local de la placenta, sino que puede trasladar este estatus a lechos vasculares distantes y convertir en sistémica la activación del endotelio que caracteriza a la PE. Nuestros resultados muestran un incremento estadísticamente significativo de la IL-6 en el grupo de alto riesgo de PE (Figura 4.2), que es congruente con el planteamiento anterior y coincide con el reportado en varias fuentes (Greer et al., 1994; Ma et al., 2019; Vince et al., 1995; Xiao et al., 2012). Además, dentro de las variables del estudio la IL-6 tiene una buena correlación positiva con el sFlt-1 y una correlación negativa moderada con el PIGF (Tabla 4.9), dos resultados que conectan el proceso proinflamatorio y el desbalance angiogénico al aumento del riesgo de PE a término. También hemos encontrado correlaciones positivas moderadas entre la IL-6 y la concentración de MVs leucocitarias, endoteliales, endoteliales activadas y monocíticas (Tabla 4.9), un grupo de asociaciones que confirman la coexistencia de un estatus proinflamatorio y de activación del endotelio en los embarazos con riesgo de PE. Por otro lado, aunque no se consiguió significación estadística, quizás por lo reducido de la subpoblación ($n=7$), al analizar por separado a las pacientes que desarrollaron PE, los valores de IL-6 se incrementaron aproximadamente un 18% (Tabla 4.5), apuntando a una posible relación entre la concentración de IL-6 y la severidad del proceso proinflamatorio, que podría conducir junto a otros factores, al desencadenamiento del síndrome clínico de la PE. Otros grupos han publicado resultados que apoyan este planteamiento; por ejemplo, Xiao *et al* estudiaron el incremento de IL-6 en el embarazo y su asociación con el inicio y la severidad de la PE (Xiao et al., 2012), donde establecieron una relación entre los niveles de

IL-6 y el momento de aparición de la PE y demostraron la existencia de valores más elevados de IL-6 en los casos severos de PE al compararlos con los moderados.

El GDF-15 es secretado por varios tipos celulares en cantidades apenas detectables en condiciones fisiológicas, pero aumenta dramáticamente en respuesta al estrés oxidativo y a la inflamación. Esta citoquina es abundante en la placenta y sus niveles se incrementan a medida que transcurre el embarazo. Cruickshank *et al*, que investigaron el potencial del GDF-15 circulante como proteína de respuesta al estrés para predecir el riesgo de PE en dos cohortes de pacientes (Cruickshank *et al.*, 2021), llegaron a la conclusión de que estaba elevado entre las mujeres con más probabilidad de desarrollar PE y en las diagnosticadas con la afección y que podía tener utilidad como biomarcador clínico. En consonancia con estos resultados, nosotros también registramos mayores concentraciones de GDF-15 en las pacientes con alto riesgo de PE a término que en las del grupo control (Figura 4.2), un hallazgo verosímil porque en estas circunstancias aumenta el estrés oxidativo, se produce una activación de diferentes mecanismos inflamatorios y se deteriora la función endotelial.

Por otro lado, en nuestro trabajo el GDF-15 mostró una correlación positiva significativa con el sFlt-1 (Tabla 4.9). El aumento paralelo de ambos marcadores ya fue constatado por otros, atribuyéndole al GDF-15 capacidad para mejorar la sensibilidad de la relación sFlt-1/PlGF en la predicción de la PE (Cruickshank *et al.*, 2021), dejando sobre la mesa la posibilidad de utilizar el GDF-15 junto a marcadores de PE conocidos en futuros estudios de validación. Este hallazgo, además, sugiere una conexión entre el desequilibrio angiogénico y la reacción inflamatoria que se produce en las gestantes con riesgo, con potencial para ser utilizada en la evaluación de la posibilidad de progresión de la situación de riesgo de PE a la PE establecida.

La evidencia acumulada hasta el momento demuestra que los niveles altos de GDF-15 circulante están fuertemente asociados con el empeoramiento del pronóstico cardiovascular (Wollert *et al.*, 2017). El GDF-15 se incrementa en la PE, pero puede permanecer a concentraciones anormalmente altas tanto en la madre como en el hijo después del parto, pudiendo ser de utilidad en el pronóstico de la ECV a largo plazo (Sugulle *et al.*, 2009). En este trabajo detectamos niveles superiores de GDF-15 circulante en las pacientes con alto riesgo de PE, un hecho que puede llevarnos al planteamiento de que aún sin desarrollar PE estas mujeres y sus hijos podrían tener un riesgo incrementado de desarrollo de ECV futura, siendo candidatos a un seguimiento posterior.

La diabetes mellitus también comparte factores de riesgo con la PE y la ECV. Las mujeres con DM pregestacional o gestacional tienen un riesgo de 2 a 4 veces mayor de desarrollar PE, y al

mismo tiempo la diabetes gestacional es un factor de riesgo importante para el desarrollo posterior de Diabetes y el desarrollo futuro de ECV (Östlund et al., 2004). Se ha planteado que tanto en los embarazos que desarrollan PE como en aquellos complicados con diabetes mellitus la expresión del GDF-15 está desregulada (Sugulle et al., 2009). En nuestro estudio 8 embarazos del grupo de alto riesgo y solo uno del grupo control desarrolló diabetes gestacional, un comportamiento que dirige la atención hacia el papel que podría jugar el GDF-15 no solo en el pronóstico a largo plazo de complicaciones cardiovasculares sino también en el seguimiento de pacientes más predispuestas por la coexistencia de varios factores de riesgo en el embarazo que conduzcan al desarrollo de ECV. Las implicaciones diagnósticas del GDF-15 en la valoración de estos pacientes a largo plazo deben ser investigadas con más profundidad.

En este trabajo no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de PCR del grupo control y los del grupo con alto riesgo de PE (Figura 4.2), un resultado similar al publicado por varios grupos de investigación a lo largo de las últimas décadas (Savidou et al., 2002; Serrano et al., 2020; Teran et al., 2005), pero contrario al recogido en una revisión sistemática realizada recientemente por Hamadeh *et al* (Hamadeh et al., 2021). La PCR aumenta no solo durante los procesos inflamatorios, sino también en la enfermedad infecciosa y ante el daño tisular, por lo que se considera un marcador no específico que debe interpretarse teniendo en cuenta la historia y el contexto clínico en que se determina. Nosotros hemos comparado nuestros resultados con los valores de PCR obtenidos por Teran *et al* en gestaciones normales y preeclámpticas medidos en momentos similares del embarazo (Teran et al., 2005). Ellos encontraron en embarazos normales de 32 semanas valores de PCR de $0,32 \pm 0,02$ mg/dL, que subieron hasta 0,43 mg/dL en el momento del parto; mientras que en embarazos que desarrollaron PE tuvieron niveles de PCR en la semana 32 de $0,51 \pm 0,03$ mg/dL, que ascendieron hasta $0,59 \pm 0,02$ mg/dL al final del embarazo. Nosotros medimos en nuestros dos grupos de bajo y alto riesgo valores comparables a los del grupo control de Teran, 0,47 [0,25 - 0,76] mg/dL y 0,48 [0,27 - 0,70] mg/dL, respectivamente (Anexo IX, Tabla A.1). Además, al analizar por separado los embarazos que desarrollaron PE, la PCR ascendió a 0,57 [0,26 - 0,77] mg/dL (Tabla 4.5), un valor que coincide con el reportado por ellos en las gestantes preeclámpticas. A la vista de estos datos, y salvando los controvertidos resultados publicados por varios grupos de investigación en relación con la PCR y la PE, podríamos plantear que la PCR no es un biomarcador adecuado para analizar el estatus inflamatorio ante el riesgo de PE a término en el tercer trimestre de embarazo; sin embargo, esto no le resta utilidad en la valoración de las embarazadas que desarrollan la enfermedad.

El equilibrio inmunitario está regulado por citoquinas que juegan un papel crucial en la activación, proliferación y diferenciación de diversos tipos de células inflamatorias. En la patogenia de la PE se produce un desbalance entre estas citoquinas que conduce a un estado inflamatorio exacerbado. Los incrementos significativos de IL-6 y GDF-15 en las gestantes con riesgo recogidos en este estudio, y su conexión con biomarcadores de estrés oxidativo, angiogénicos y de función endotelial, están en sintonía con este planteamiento, apoyando su utilidad en la valoración del riesgo de PE a término, y en especial de los mecanismos inflamatorios, dejando una ventana abierta para explorar el riesgo cardiovascular a largo plazo de estas embarazadas.

5.1.2.3 Biomarcadores angiogénicos

Los marcadores angiogénicos PIGF y sFlt-1, producidos mayoritariamente por la placenta, son marcadores no invasivos de la salud placentaria sobre los que se ha demostrado una relación específica con el pronóstico, el inicio y la gravedad de la PE.

El PIGF está notablemente elevado en el embarazo normal, donde promueve el desarrollo y la maduración del sistema vascular placentario, por lo que se define como un factor proangiogénico (de Falco, 2012). En condiciones normales aumenta desde el inicio del embarazo hasta la semana 30, después de lo cual disminuye. En los embarazos que desarrollan PE, mucho antes del inicio de los síntomas y en el momento del diagnóstico de PE los niveles de PIGF sérico están disminuidos (Levine et al., 2004). Este comportamiento se reproduce en la muestra estudiada en este trabajo, donde los valores de PIGF del grupo control triplicaron los de las gestantes con alto riesgo de PE en la semana 35 de gestación (Anexo IX, Tabla A.1). Las concentraciones de PIGF circulante más bajas en las pacientes con riesgo pudieron ser, como plantea Chau *et al*, una consecuencia de eventos tempranos anormales en la placentación y un factor contribuyente al crecimiento anormal continuo de la placenta durante la segunda mitad del embarazo (Chau et al., 2017).

Por otro lado, se sabe que el sFlt-1, cuya expresión se estimula en condiciones hipóxicas, se une a los factores proangiogénicos VEGF y PIGF, reduciendo la formación y crecimiento de los vasos sanguíneos, por lo que se le considera una proteína antiangiogénica (Heydarian et al., 2009; Kendall et al., 1996). En embarazos normales, se incrementa hasta 20 veces (Shibata et al., 2005) pero aumenta todavía más en la PE, donde la poca perfusión uterina conduce a una hipoxia local más grave (Wikström et al., 2007). En nuestro grupo con alto riesgo de PE a término los niveles de sFlt-1 fueron significativamente más altos que los del grupo control (Anexo IX, Tabla A.1), un resultado que apunta en la misma dirección del planteamiento anterior y que podría ser

indicativo de una invasión vascular insuficiente, con reducción en la perfusión placentaria, que desencadena un estado de hipoxia crónica, que induce el aumento de los niveles de sFlt-1.

Dado que la patogenia de la enfermedad implica un desequilibrio en los factores angiogénicos, la relación sFlt-1/PIGF en los embarazos con riesgo de PE aumenta de forma notable (Verlohren et al., 2022). Como era de esperar, en el grupo con alto riesgo de PE la ratio de estos dos biomarcadores aumentó considerablemente, mientras que en el grupo control la mediana de la distribución de la variable tuvo un valor 10 veces menor (Anexo IX, Tabla A.1).

Llama la atención, al comparar las gestantes que desarrollaron PE con aquellas de alto riesgo que no enfermaron, la falta de significación estadística en la medición de los biomarcadores angiogénicos y en la ratio sFlt-1/PIGF (Tabla 4.5). Varios factores pueden estar detrás de este resultado, entre los que se puede considerar la semana del embarazo en que realiza la medición, todavía distante del momento en que aparece la PE, y el reducido número de gestantes con PE que se compara con las que tienen riesgo. De cualquier forma, tanto las mujeres con alto riesgo que no sufrieron PE como las que desarrollaron la enfermedad, tienen un perfil angiogénico alterado.

5.1.2.4 Biomarcadores de función endotelial

Aunque los factores causales y los mecanismos fisiopatológicos de la PE no están completamente definidos, la disfunción endotelial es una de sus principales características. La disfunción endotelial engloba el cambio de un endotelio normal y sano a un endotelio estresado y dañado, con un fenotipo vasoconstrictor, procoagulante y proinflamatorio (Flammer & Lüscher, 2010). La función endotelial suele evaluarse examinando la vasodilatación dependiente del endotelio, para lo cual existen varios métodos con sus retos y limitaciones técnicas, especialmente en lo que respecta a su naturaleza invasiva y a su estandarización (Deanfield et al., 2005). En este contexto se han abierto paso los biomarcadores circulantes de función endotelial, que proporcionan información relevante sobre la salud del endotelio y los mecanismos fisiopatológicos que producen disfunción, al tiempo que son mínimamente invasivos y tienen potencial para ser utilizados en la clínica rutinaria. Dentro de los biomarcadores circulantes de función endotelial reconocidos, nosotros medimos la concentración de diferentes poblaciones de MVs, así como los niveles de ADMA en el plasma de las gestantes de este estudio.

Las MVs son un grupo heterogéneo de elementos subcelulares, recubiertos de membrana, que se liberan por la activación o apoptosis de diferentes tipos de células. Transportan carga activa

desde la célula parental hasta otras células, vecinas o distantes, y alteran sus funciones con su entrega. Las MVs participan en la señalización e intercomunicación celular de diferentes procesos como la inflamación, la angiogénesis, la coagulación, la diferenciación y el funcionamiento del endotelio. En el embarazo desempeñan un papel dinámico en la comunicación entre las células vasculares de la madre y la placenta, contribuyendo a su desarrollo normal. Los cambios en las concentraciones de distintos tipos de MVs pueden contribuir a la fisiopatología de la PE al acentuar el estado proinflamatorio, procoagulante y la disfunción endotelial que ocurren en el embarazo.

En este trabajo no encontramos diferencias significativas en el número total de MVs entre las gestantes con bajo y alto riesgo de PE a término (Figura 4.4-A), un resultado que coincide con el publicado por Lok *et al*, que tampoco observaron un aumento de la cantidad de MVs en mujeres preeclámpticas en comparación con los de embarazadas normotensas (Lok et al., 2008), aunque hay que destacar que una mayoría de publicaciones reporta una elevación del total de MVs en la PE (Redman & Sargent, 2008). La discrepancia en este resultado, entre diferentes trabajos recogidos en la literatura científica, puede estar determinada por varios factores: en primer lugar, es posible que existan variaciones en las características de las pacientes seleccionadas, en el diseño de los estudios y en el tipo de procedimiento utilizado para la separación, cuantificación y caracterización de las MVs, un elemento de extrema importancia debido a la falta de estandarización en los métodos desarrollados para el análisis de MVs; en segundo lugar, hay que tener en cuenta que son las plaquetas las que aportan el mayor porcentaje de MVs circulantes, y en las pacientes con riesgo es común la trombopenia, por lo que el aumento de otras poblaciones de MVs puede quedar enmascarado en el recuento total por la disminución del tipo de MVs predominante; en último lugar, debe considerarse el momento del embarazo en el que se realiza la determinación de MVs. Nuestro estudio se ha realizado en mujeres que tienen embarazos con riesgo (no con PE establecida), una situación en la que tal vez el aumento de determinadas poblaciones de MVs no cambie lo suficiente como para producir diferencias significativas en el recuento de MVs-tot entre los grupos sin riesgo de PE y con él.

De forma similar a otros autores (Alijotas-Reig et al., 2011; Lok et al., 2011; Zhang et al., 2018), al estudiar la distribución de las diferentes poblaciones de MVs encontramos que el tipo predominante en los dos grupos se originó a partir de las plaquetas (Figura 4.4-B). También comprobamos que las MVs de origen leucocitario, endotelial y de sincitiotrofoblasto estuvieron más representadas en el grupo con riesgo, resultados similares a los publicados en otros trabajos (González-Quintero et al., 2004; Mikhailova et al., 2014; Tannetta et al., 2017; Zhang et al., 2018), lo que puede atribuirse a una mayor activación o apoptosis de sus células parentales,

posiblemente por el incremento del estrés oxidativo, a un estado proinflamatorio y procoagulante exacerbados y al deterioro de la función endotelial. Además, detectamos que el porcentaje de MVs no filiaadas fue mayor en el grupo con riesgo de PE que en grupo control, un hecho que atribuimos a dos factores: en primer lugar, a una menor contribución porcentual de las MVs-pla, que son las mayoritarias y están disminuidas en este grupo; y, en segundo lugar, al aumento de otras poblaciones de MVs no estudiadas, como podrían ser las producidas por los eritrocitos, que se incrementan en la PE y en las condiciones preclínicas del síndrome. Según varios autores (Gilani et al., 2016; Marques et al., 2012), es posible que esto ocurra por la hemólisis que se observa habitualmente en las pacientes con riesgo de PE y con PE, donde se produce una activación eritrocitaria por el aumento de la demanda de oxígeno o debido a su estimulación por parte de otras MVs circulantes. También se maneja la hipótesis de que el choque de los eritrocitos con los coágulos de fibrina que se depositan en la microvasculatura de las mujeres con riesgo de PE o con PE puede provocar su lisis y aumentar la liberación de MVs eritrocitarias. Otro factor puede ser el hecho de que del 10-20% de las mujeres con PE desarrollan el síndrome HELLP, que se caracteriza por alteración eritrocitaria (Brown et al., 2018). La hemólisis, además, puede ser el resultado de una reacción autoinmune a la deposición de vesículas derivadas de sincitiotrofoblasto sobre los eritrocitos que podría explicar el aumento de las concentraciones de MVs eritrocitarias en la PE (Gilani et al., 2016).

Dragovic *et al*, entre otros grupos, han reportado que las gestantes tienen menores concentraciones de MVs-pla que las mujeres no embarazadas y que este comportamiento se acentúa en la PE (Dragovic et al., 2013). Se han propuesto tres teorías diferentes para explicar las menores concentraciones de MVs-pla en la PE: (a) un menor recuento de plaquetas que ocurre con frecuencia en la PE puede generar menores concentraciones de MVs-pla; (b) una menor concentración de MVs-pla circulantes puede deberse en parte a un mayor atrapamiento o participación de las MVs-pla en la generación de trombina y en la formación de coágulos de fibrina; y (c) la interacción y unión de las MVs-pla con los leucocitos puede dar lugar a menores cantidades detectables en el compartimento vascular (Gilani et al., 2016). En nuestro grupo de pacientes con alto riesgo de PE (Figura 4.5), las MVs-pla tendieron a disminuir sus niveles con respecto al grupo control, coincidiendo con la mayoría de los resultados descritos en la literatura.

Por otro lado, en mujeres con factores de riesgo asociados a la PE se recomienda el uso de aspirina en dosis bajas. Sus efectos beneficiosos pueden explicarse por el efecto de la aspirina sobre la actividad plaquetaria. Al inhibir la síntesis de tromboxano A2, la aspirina disminuye la activación de las plaquetas y, a su vez, probablemente afecte la producción de MVs-pla (Gilani

et al., 2016). En el grupo de alto riesgo el 30,9% de las pacientes fue tratada con aspirina, mientras que en el grupo sin riesgo solo se le administró a un 5,3% (Tabla 4.1), un factor adicional que puede explicar la menor cantidad de MVs-pla medidas en las gestantes del grupo con alto riesgo de PE.

Numerosos estudios hacen referencia a que un mayor recuento de leucocitos y un estado inflamatorio agravado en la PE activan determinadas poblaciones de glóbulos blancos que liberan mayores cantidades de MVs circulantes (Lok et al., 2009; Mikhailova et al., 2014). Nosotros hemos encontrado más MVs leucocitarias y de monocitos en el grupo con riesgo que en el grupo control (Figura 4.5), un resultado que puede reflejar la inflamación sistémica subyacente en estas embarazadas. Previamente, en este mismo trabajo, demostramos la existencia de marcadores inflamatorios elevados de forma significativa (IL-6 y GDF-15) en el grupo de alto riesgo (Figura 4.2), un hallazgo que se puede relacionar con la activación leucocitaria y el aumento de la producción de MVs, que de forma conjunta apoyan la existencia de un estatus proinflamatorio más elevado en las pacientes con riesgo.

Se sabe que las MVs leucocitarias pueden inducir la activación de las células endoteliales y de genes codificadores de citoquinas, lo que podría constituir un mecanismo de amplificación de la concentración local de citoquinas quimiotácticas e inflamatorias y la inducción de la expresión de moléculas de adhesión facilitadoras de la comunicación intercelular y de señalización cruzada entre leucocitos y células endoteliales (Gilani et al., 2016). Las MVs derivadas de leucocitos pueden causar activación y daño endotelial, una propiedad que podría explicar la correlación positiva y moderada entre los niveles de MVs leucocitarias y sincitiotrofoblásticas con el incremento de MVs de células endoteliales (totales o activadas) encontradas en este trabajo (Tabla 4.9).

Además de encontrar más MVs-leu en el grupo con riesgo, también registramos un aumento significativo de esta población entre las pacientes que desarrollaron PE posteriormente (Tabla 4.5). Varios reportes dan cuenta del aumento de los niveles de MVs-leu en la PE y de la utilidad que podría tener la medición de esta población de MVs en la predicción de la enfermedad. En este trabajo el aumento de la concentración de MVs-leu entre las pacientes que desarrollaron PE pudo ser indicativo de un estado de activación que podría ser útil conocer para la valoración del riesgo de PE a término y su pronóstico.

En una amplia variedad de estudios se ha reportado que la concentración de MVs-end en la PE es mayor, indicando activación endotelial (González-Quintero et al., 2003; Granger et al., 2018; Hromada et al., 2017; Possomato-Vieira & Khalil, 2016). También se ha planteado que existe una

asociación entre el aumento de estas MVs y la disfunción vascular (Petrozella et al., 2012). Por otro lado, es conocido que las MVs-end presentan fenotipos diferentes según el estímulo de señalización y los procesos o condiciones trombóticos e inflamatorios que inducen su liberación (Jiménez et al., 2003). En este trabajo no solo hemos detectado mayores concentraciones de MVs de origen endotelial en el grupo con alto riesgo de PE, sino que además entre estas embarazadas las MVs producidas por células endoteliales activadas también están presentes en cantidades significativamente mayores en el compartimiento vascular (Figura 4.5). Estas MVs-ena son producidas por las células endoteliales en respuesta a estímulos o estados proinflamatorios existentes y pueden ser un reflejo de la disfunción endotelial que tienen las gestantes del grupo con riesgo, que a su vez puede convertirse en un elemento facilitador o desencadenante de las condiciones fisiopatológicas que conducen a la PE. Gilani *et al* han sugerido que estas MVs-end proinflamatorias pueden contribuir al aumento de la cantidad y a la activación de neutrófilos y monocitos de la sangre periférica en las gestantes con PE (Gilani et al., 2016). Esta hipótesis es coherente con nuestros resultados, que muestran una buena correlación positiva entre las MVs-ena y las MVs-mon (Tabla 4.9), y refuerzan el planteamiento de la existencia de un estatus proinflamatorio exacerbado y de una disfunción del endotelio en las pacientes con riesgo de PE a término.

En un artículo publicado hace algunos años, Luppi & DeLoia planteaban que el aumento de los niveles de IL-6 podía contribuir al daño endotelial que ocurre en la PE y que estos niveles más altos podían deberse, en parte, a una mayor síntesis de esta citocina por monocitos circulantes (Luppi & DeLoia, 2006). En esta misma línea Chen *et al* concluyeron que la IL-6 podían influir también en la progresión de la PE a través de la activación vascular de las células endoteliales (Chen et al., 2009). Por otro lado, la producción alterada de IL-6 se ha asociado con la expresión de ICAM-1 y VCAM-1, proporcionando un fenotipo adhesivo al endotelio que conduce a la disfunción (Pober & Sessa, 2007). A partir de toda esta evidencia nosotros podemos especular que en nuestro grupo con riesgo, niveles más altos de IL-6 provocaron una mayor activación endotelial, que dio lugar a cantidades superiores de MVs-ena detectables en el compartimiento vascular, que fueron un reflejo del fenotipo adhesivo que tuvo el endotelio por la expresión de moléculas CD54 (ICAM-1) implicadas en la adhesión de monocitos, linfocitos y neutrófilos al endotelio. Como ya se mencionó al estudiar los marcadores inflamatorios, en este trabajo encontramos una correlación positiva moderada entre la IL-6 y las MVs-ena (Tabla 4.9) que refuerza lo planteado anteriormente.

Por otra parte, la activación de las células endoteliales puede contribuir a la respuesta inflamatoria y producir vasoconstricción. En este trabajo se ha registrado un incremento

significativo del número de MVs-end en el grupo con riesgo, donde los niveles de PAM son también significativamente mayores que en grupo control. En dicho grupo de alto riesgo se observó un valor significativamente mayor de MVs-end y MVs-ena en aquellas gestantes con niveles de PAM por encima de 95 mmHg (Tabla 4.10). Un resultado similar fue reportado por Gonzalez-Quintero *et al* cuando estudiaron la liberación de MVs-end en la hipertensión gestacional y la PE (González-Quintero et al., 2004), donde observaron una correlación positiva significativa entre las MVs-end, la PAM y la proteinuria de 24h, concluyendo que los niveles de MVs-end eran más elevados en las mujeres con PE que en las mujeres con hipertensión gestacional y en los embarazos de control, y que su medición podía ser útil como herramienta diagnóstica de la PE en mujeres embarazadas.

Las MVs-end no sólo se han postulado como marcadores de disfunción vascular, sino que también se han asociado a la predicción de resultados cardiovasculares a largo plazo. De hecho, estas MVs modulan la inflamación, la coagulación, la adhesión y el reclutamiento de leucocitos, contribuyendo potencialmente a la formación de la placa aterosclerótica y a otros eventos cardiovasculares adversos (Fonseca & Izar, 2018). El aumento de las MVs-end durante el embarazo con riesgo, con PE o no, y su persistencia más allá del parto, es una cuestión que está siendo investigada activamente, y tiene gran importancia por su potencial en la predicción de ECV futuras en este tipo de pacientes.

En el compartimiento vascular de las pacientes del grupo de alto riesgo de PE a término investigadas en este trabajo, nosotros detectamos aproximadamente el doble de MVs-sct que en el grupo control (Anexo IX, Tabla A.1), un hallazgo que sintoniza con una amplia variedad de publicaciones que demuestran que en la PE, y por extensión en los embarazos con alto riesgo, se liberan más MVs de este tipo que en un embarazo normal. En un trabajo firmado por Tannetta *et al* sobre la salud de la placenta y la liberación de VE se revisaron varios estudios que demostraban la actividad proinflamatoria, antiangiogénica y procoagulante de las MVs-sct, implicándolas en la inflamación sistémica materna, en la disfunción endotelial y en la activación del sistema de la coagulación que ocurren en este trastorno (Tannetta et al., 2017). En línea con las conclusiones de esa revisión podríamos plantear que en nuestro caso la placenta de las pacientes con riesgo liberó mayores cantidades de estas MVs, que contribuyeron a exagerar aún más la respuesta inflamatoria materna, la disfunción vascular y la coagulación, y que esta situación pudo llevarlas a cambiar, en determinadas condiciones, la respuesta fisiológica de un embarazo normal a un estado patológico de PE.

Aunque la determinación de MVs tiene cada vez más reconocimiento en clínica e investigación, no existen procedimientos estandarizados para su medida. Se han publicado numerosos trabajos con diversos métodos, técnicas y protocolos para el aislamiento, la separación, la cuantificación, la caracterización y la conservación de muestras que contienen MVs, con rendimientos distintos y resultados heterogéneos, que complican su integración y extensión a la práctica clínica. Ya en 2018, la ISEV daba instrucciones claras sobre la información que estos estudios con MVs debían aportar para garantizar unos niveles mínimos de calidad que permitieran su reproducción y el mejor aprovechamiento posible de los resultados (Théry et al., 2018). En nuestro caso hemos separado y concentrado las MVs por centrifugación y se han cuantificado y caracterizado por citometría de flujo utilizando marcadores específicos para identificar las poblaciones de interés. Aunque la variabilidad entre los estudios publicados es muy grande, una revisión de trabajos similares que aparecen en la literatura científica nos ha permitido establecer un paralelismo razonable entre nuestros datos y los de otros grupos que, con estrategias similares y anticuerpos dirigidos hacia las mismas dianas moleculares, han obtenido resultados comparables a los nuestros. En la Tabla 5.1 se recogen parte de los datos publicados por Alijotas *et al* sobre la determinación de MVs circulantes en embarazos normales y con PE, así como por VanWijk *et al* en una investigación sobre subpoblaciones de MVs que aumentan en la PE y su posible implicación en la disfunción endotelial.

Tabla 5.1

Resultados publicados sobre el estudio de microvesículas utilizando protocolos de separación y medición similares a los de este trabajo

Publicación	Tipo de MVs	Embarazos normales (mvs/ μ L)	Embarazos con PE (mvs/ μ L)
(Alijotas-Reig et al., 2012)	MVs-tot (AV+)	1104 (683 - 1525)	1101 (231 - 1762)
	MVs-pla (CD41)	1020 (601 - 1438)	917 (616 - 1218)
	MVs-leu (CD45)	8 (5 - 10)	13 (5 - 21)
	MVs-end (CD31/CD41-)	11 (7 - 15)	20 (13 - 28)
(VanWijk et al., 2002)	MVs-tot (AV+)	1960 (410-3714)	2256 (994-3839)
	MVs-pla (CD61)	1618 (117-3450)	1818 (638-3561)
	MVs-end (CD62e/CD144)	11 (0-75)	23 (0-122)
	MVs-sct (PLAP)	2 (0-95)	23 (0-122)

Nota. MVs-tot, total de MVs anexina V+; MVs-pla, MVs de plaquetas; MVs-leu, MVs leucocitarias; MVs-end, MVs de células endoteliales; MVs-sct, MVs de sincitiotrofoblasto.

El ADMA es un inhibidor endógeno de la eNOS que se ha asociado con el deterioro de la función endotelial y con las alteraciones vasculares características de la PE. En embarazos complicados con PE la concentración de ADMA es significativamente más alta que en los embarazos normales (Holden et al., 1998; Laskowska et al., 2012; López et al., 2015) y sus niveles se relacionan con la gravedad de la PE (Tashie et al., 2020). Coincidentemente, las embarazadas del grupo de alto

riesgo de este estudio tuvieron valores significativamente más elevados de ADMA que las del grupo con bajo riesgo de PE (Figura 4.6), y en los embarazos con PE se observaron niveles superiores de ADMA (Tabla 4.5) aunque no alcanzaron la significación estadística. Anteriormente mencionamos la relación ya descrita entre la hiperhomocisteinemia y el ADMA (Dymara-Konopka & Laskowska, 2019; Mao et al., 2010), que conduce a la disfunción endotelial; en este sentido, nuestros resultados muestran un aumento de los niveles plasmáticos de HCIS y ADMA en el grupo de alto riesgo (Anexo IX. Tabla A.1), y, además, entre los embarazos que desarrollaron PE se observó también una tendencia al alza en ambos parámetros, sobre todo en la concentración de ADMA (Tabla 4.5).

La evidencia acumulada relaciona el ADMA con los trastornos vasculares y sugiere que su elevación crónica puede promover directamente la enfermedad vascular. Altas concentraciones de ADMA se han identificado como un factor de riesgo independiente para la progresión de la aterosclerosis, la muerte por ECV y la mortalidad por cualquier causa (Baksu et al., 2006; Blacher et al., 2002; Peng et al., 2015; Sibal et al., 2010). Debido a esto, el seguimiento de gestantes con alto riesgo de PE a término que tienen niveles elevados de ADMA puede ser de utilidad para la instauración de medidas encaminadas a mejorar la función endotelial y prevenir la ocurrencia de eventos cardiovasculares tardíos. Por ejemplo, se ha demostrado que intervenciones como el tratamiento con L-arginina pueden revertir la disfunción endotelial asociada con factores de riesgo vascular, incluyendo hipercolesterolemia, hipertensión, diabetes y resistencia a la insulina. Además, la L-arginina mejora el resultado clínico en pacientes con trastornos cardiovasculares como la enfermedad arterial coronaria, la enfermedad arterial periférica y la insuficiencia cardíaca (Gambardella et al., 2020).

5.1.3 Análisis del rendimiento de los biomarcadores

Muy pocas pruebas utilizadas para el diagnóstico, la valoración o el pronóstico de una enfermedad definen con certeza la situación investigada. La validez de una prueba depende de su capacidad para cumplir este cometido y se expresa matemáticamente con varios índices: sensibilidad y especificidad, valores predictivos, razones de verosimilitud y curvas ROC, entre otros.

Para evaluar la validez de una prueba se requiere un patrón de referencia o “patrón oro” (gold standard) que refleje fielmente la característica a medir. En ocasiones no se dispone de ninguna prueba de referencia, por la naturaleza del concepto a medir o por la ausencia de conocimiento suficiente. En estas situaciones resulta útil recurrir a criterios diagnósticos diseñados por

expertos o al resultado de un conjunto de pruebas agrupadas (Sangrador & Orejas, 1999), como ocurre en este trabajo, donde utilizamos el resultado del cribado de PE a término para evaluar el rendimiento de biomarcadores circulantes relacionados con la función endotelial.

Como los biomarcadores son variables continuas fue necesario establecer puntos de corte que permitieran definir los resultados positivos y los negativos. El punto de corte determina el comportamiento de la variable, define su sensibilidad y especificidad, así como los valores predictivos; en nuestro caso los puntos de corte fueron definidos para que tanto la sensibilidad como la especificidad tuvieran el mejor comportamiento posible (Tabla 4.6), que se corresponde con el valor que presenta el mayor índice de Youden, calculado según la fórmula (sensibilidad + especificidad - 1). Para algunos de los biomarcadores propuestos en este trabajo (CATS, HCIS, AU, IL-6) los puntos de corte se encontraron dentro de rangos de normalidad establecidos para la edad gestacional en que se hizo el estudio (Anexo VII), en otros el punto de corte se situó por encima del valor inferior de su rango patológico (GDF-15), y en algunos, como en el caso de las MVs, el punto de corte no se pudo contrastar con ningún valor de referencia porque hasta la fecha no se han establecido. Los puntos de corte dentro y fuera de los rangos de normalidad establecidos incrementa la utilidad y el espectro de situaciones clínicas en los que se puede utilizar el biomarcador.

La sensibilidad es la capacidad de una prueba para identificar correctamente los pacientes que tienen la enfermedad, es también la probabilidad de que en un individuo enfermo la prueba resulte positiva. La especificidad es la capacidad de una prueba para identificar aquellos que no tienen la enfermedad, que es igual a la probabilidad de que en un individuo que no esté enfermo la prueba resulte negativa. La sensibilidad y la especificidad son características intrínsecas de una prueba, y son interdependientes ya que un aumento de la sensibilidad está acompañado por una reducción de la especificidad y viceversa, un enunciado válido para las pruebas con escalas continuas, como ocurre con los biomarcadores, donde el nivel de corte para un resultado positivo puede variar. Para evaluar la sensibilidad y especificidad de una prueba hay que conocer previamente qué pacientes cumplen la condición que se quiere investigar y cuales no; en este trabajo obtuvimos esa información a partir del cribado de PE a término que se hizo a las gestantes; con esta información fue posible comprobar en qué medida los biomarcadores clasificaron de forma sensible y específica a las mujeres ante la situación de riesgo de PE (Tabla 4.6), permitiendo conectar ésta capacidad con la información que aporta cada uno de los biomarcadores sobre las distintas vías y mecanismos fisiopatológicos que conducen a la disfunción endotelial que se produce en las pacientes con riesgo de PE, y con PE.

La seguridad de una prueba está determinada por los valores predictivos positivo y negativo, que son índices importantes para valorar su utilidad clínica. El VPP es la probabilidad que tiene un individuo de estar enfermo cuando el resultado de la prueba es positivo, mientras que el VPN es la probabilidad de que un individuo no esté enfermo con un resultado negativo. Otra característica de los valores predictivos es que dependen de la prevalencia de la enfermedad en la población. Una prueba con una sensibilidad y una especificidad dada puede tener diferentes valores predictivos en diferentes poblaciones de pacientes con diferente prevalencia de la enfermedad. Si una prueba es utilizada en una población con una alta prevalencia de la enfermedad, la prueba en evaluación tendrá un alto VPP, por otro lado, esta misma prueba, con la misma sensibilidad y especificidad, tendrá un VPP bajo cuando es utilizada en una población con una baja prevalencia de la enfermedad. Para los biomarcadores investigados en esta tesis los cálculos se hicieron teniendo en cuenta una tasa de positividad del cribado de PE a término del 10%, situando, en general, los VPP entre el 15% y el 40%, mientras que los VPN se mantuvieron por encima del 90% (Tabla 4.6).

La razón de verosimilitud es otra manera o método de valorar la exactitud de una prueba. Tiene como ventaja sobre los indicadores anteriores la independencia de la prevalencia de la enfermedad en una población. Cada prueba diagnóstica está caracterizada por dos razones de verosimilitud: la razón de verosimilitud positiva, que se calcula dividiendo la probabilidad de un resultado positivo en los pacientes enfermos entre la probabilidad de un resultado positivo en los sanos, y la razón de verosimilitud negativa, que se calcula dividiendo la probabilidad de un resultado negativo en presencia de la enfermedad entre la probabilidad de un resultado negativo en ausencia de esta. Dicho de otra manera, estas dos medidas indican la razón entre la probabilidad de un resultado en presencia de enfermedad y la probabilidad de un resultado en ausencia de la enfermedad. En la medida en que el valor de la razón de verosimilitud positiva se aleja de 1 hacia el infinito, o hacia 0 en la razón de verosimilitud negativa, mejor será el cociente y la información que aporte a la prueba. En la Tabla 4.6 se puede comprobar que la razón de verosimilitud positiva de todos los biomarcadores supera la unidad en diferentes cuantías, mientras que la razón de verosimilitud negativa es inferior a la unidad, o sea, que ambas van en la dirección correcta, aunque no en todos se consigue la misma eficiencia.

El AUC representa la validez global de la prueba. Cuanto más se aproxima la curva ROC a la esquina superior-izquierda del gráfico, mayor será su área (más próxima a 1) y mayor la validez de la prueba diagnóstica. Una prueba sin discriminación, con igual distribución de resultados en los dos subgrupos, daría lugar a una línea diagonal de 45°, desde la esquina inferior izquierda hasta la superior derecha, con un área de 0,5. La mayoría de las curvas ROC caen entre estos dos

extremos. En la Tabla 4.7 se recogen las AUC de las curvas ROC de los biomarcadores del estudio, entre los cuales la IL-6, la HCIS, las MVs-leu y MVS-sct tienen el mejor rendimiento. Las curvas ROC también nos permiten contrastar la capacidad diagnóstica de dos o más pruebas, comparando las áreas bajo las curvas de cada una de ellas, como ha sido recogido en la Tabla 4.8.

5.1.4 Análisis del modelo explicativo del riesgo de preeclampsia a término con biomarcadores relacionados con la función endotelial

La regresión logística binaria se utiliza cuando se desea conocer la relación entre una variable dependiente cualitativa dicotómica y una o más variables independientes o explicativas, con el objetivo de obtener una estimación ajustada de la probabilidad de ocurrencia de un evento a partir de una o más variables. Los modelos de regresión pueden ser creados con diferentes finalidades, aunque en general se desarrollan para la predicción (modelos pronósticos) o la estimación del efecto observado (modelos explicativos).

En nuestro caso el modelo se desarrolló con el propósito de conocer el tamaño y la significación estadística del efecto en cuestión (riesgo de PE en la semana 35 de gestación), expresado a través de las variables estudiadas (biomarcadores circulantes relacionados con la función endotelial), para lo cual se incluyeron en el análisis todas las variables que mostraron diferencias significativas entre los grupos con bajo y alto riesgo de PE. Después de una valoración inicial fueron separados del modelo todos los biomarcadores que no mejoraban su rendimiento y finalmente se dejaron como factores explicativos del riesgo de PE de forma independiente y significativa a las variables HCIS, IL-6, MVs-leu y MVs-sct (Tabla 4.14). En el modelo, que resultó estadísticamente significativo, los biomarcadores seleccionados permitieron explicar entre el 53 y el 71% de los cambios de la variable dependiente, con una clasificación correcta del 90% de los casos, entre los que quedaron incluidos todas las gestantes que desarrollaron PE posteriormente. Para validar la propuesta se analizaron la calibración y la capacidad discriminante del modelo, que fueron consideradas correctas (Tablas 4.15 y 4.16).

Entre los indicadores básicos del modelo destaca un IY cercano a la unidad y un punto de corte que permite conseguir valores altos de sensibilidad y especificidad (Tabla 4.17). Como se hizo al analizar por separado los biomarcadores, los valores predictivos se calcularon teniendo en cuenta una tasa de cribados positivos del 10%; la probabilidad condicional de que los individuos con una prueba positiva tuvieran realmente riesgo fue del 39,1%, mientras que la de individuos con una prueba negativa de no tener realmente riesgo fue del 98,3%. También hay que destacar que con este modelo es 5,77 veces más probable obtener resultados positivos entre las

gestantes que tienen alto riesgo que entre aquellas que no lo tienen, y que es 10 veces más probable que un resultado sea negativo entre las mujeres que tienen bajo riesgo que entre las que lo tienen alto.

Finalmente, mediante el análisis de la diferencia de áreas se comparó la eficacia del modelo con la de cada uno de los biomarcadores por separado, demostrando un mejor rendimiento del primero (Tabla 4.18).

A pesar de no encontrar modelos similares en la revisión bibliográfica realizada para este estudio, consideramos que explicar el riesgo de PE a término a partir de biomarcadores relacionados con la función endotelial es importante. Estudiar con estas variables un estado preclínico como el riesgo de PE a término, donde pueden estar activados diferentes vías y mecanismos fisiopatológicos relacionados con la disfunción endotelial, ofrece una información más completa de la gestación en las mujeres que tienen embarazos con riesgo y de su predisposición al desarrollo de PE. Este enfoque, además de valorar el riesgo de una forma diferente a la tradicional, con una base fisiopatológica más amplia, puede ser una herramienta útil en la evaluación de abordajes profilácticos y terapéuticos de la enfermedad, sobre todo cuando el objetivo de tal proceder sea incidir de forma directa o indirecta sobre la función endotelial.

5.2 Riesgo de preeclampsia y de desarrollo de enfermedad cardiovascular

En los últimos años se ha acumulado evidencia de que padecer PE predispone a un mayor riesgo cardiovascular a largo plazo en la vida (Khosla et al., 2021), incluido el riesgo de hipertensión, enfermedad arterial periférica, enfermedad arterial coronaria y enfermedad cerebrovascular (Jim & Karumanchi, 2017). La relación entre la ECV y la PE radica en la disfunción endotelial, sobre la que muchos estudios sugieren que es su persistencia posparto la que contribuye a la aparición de enfermedades como la diabetes, la hipertensión y el aumento del riesgo de ECV (Moe et al., 2020). La PE y la ECV comparten factores de riesgo como la obesidad, la ECV familiar prematura, la hipertensión arterial, el estrés oxidativo y la inflamación, teniendo como base común la presencia de esta disfunción endotelial (Perry et al., 2018).

Por otro lado, se han desarrollado varios estudios centrados en la evaluación prospectiva de biomarcadores de inflamación y disfunción endotelial en mujeres con PE para averiguar si son capaces de distinguir a las mujeres que posteriormente desarrollan o no hipertensión y ECV, entre los cuales el sFlt-1, el PIGF, la IL-6, la relación IL-6/IL-10, la troponina I cardíaca de alta sensibilidad, la activina A, el antígeno leucocitario humano-G soluble, la proteína plasmática A

asociada al embarazo y la norepinefrina han mostrado potencial y son biomarcadores candidatos interesantes para llevar a cabo exploraciones más profundas (Bovee et al., 2021).

Muchas mujeres embarazadas clasificadas como de alto riesgo de PE sobre la base de factores obstétricos y maternos finalmente no desarrollan la enfermedad. Esto plantea la posibilidad de la existencia de una predisposición a la disfunción vascular que es evidente en embarazos con alto riesgo de PE, que también puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de ECV más tarde en la vida, independientemente de su asociación con el desarrollo de PE. Además, estas mujeres están actualmente fuera del alcance de la mayoría de los programas preventivos debido a su edad relativamente joven, pero tienen factores de riesgo modificables importantes para las ECV.

En este estudio se han analizado diferentes marcadores de estrés oxidativo, inflamación, angiogénesis y disfunción endotelial que están involucrados en la fisiopatología de la PE y de la ECV en mujeres con alto riesgo de PE a término, encontrando una elevación significativa de sus niveles en los embarazos de alto riesgo al compararlos con los de bajo riesgo de PE a término (Anexo IX, Tabla A.1). Además, estas mujeres con alto riesgo de PE que no desarrollaron la enfermedad tenían niveles similares de estos biomarcadores estudiados a los niveles de aquellas que sí desarrollaron PE (Tabla 4.5). También, las mujeres con alto riesgo de PE tuvieron PAM más altas que aquellas con bajo riesgo (Tabla 4.1). Tomando todos los resultados anteriores juntos, podría sugerirse que en las mujeres con alto riesgo de PE a término existe una disfunción vascular que las predispone a un mayor riesgo cardiovascular a lo largo de la vida. La identificación de biomarcadores circulantes en este estudio, que también son relevantes en la evaluación de la función cardiovascular, como el AU, la HCIS, la IL-6, el GDF-15, distintas poblaciones de MVs y el ADMA, apunta en esta dirección y podrían tener un valor adicional para determinar qué mujeres corren mayor riesgo de tener ECV, y para comprender mejor el mecanismo fisiopatológico que lleva a estas mujeres jóvenes a desarrollarla más tarde en la vida. Queda la pregunta de si existe una oportunidad de intervención en estas mujeres asintomáticas con antecedentes de alto riesgo de PE a término. Estos biomarcadores podrían ser potencialmente elegibles para la estratificación del riesgo cardiovascular ante el riesgo de PE a término y contribuir al desarrollo de estrategias adecuadas para la prevención y el seguimiento de la hipertensión y de eventos cardiovasculares adversos en esta población.

5.3 Análisis pareado de los biomarcadores en los subgrupos del ensayo clínico

La PE puede provocar consecuencias graves y en algunos casos fatales a corto y a largo plazo que afectan tanto a la madre como al feto. Aunque se han propuesto muchos abordajes

terapéuticos, las tasas de mortalidad y morbilidad siguen siendo considerables. La PE comparte varios mecanismos fisiopatológicos con las ECV y por ello en los últimos años se ha investigado el posible papel de las estatinas en su tratamiento temprano y prevención. Se ha reportado en varios ensayos preclínicos y clínicos que la pravastatina previene las lesiones oxidativas e inflamatorias, revierte el desequilibrio angiogénico específico del embarazo asociado a la PE y restablece la salud endotelial, propiedades que la convierten en una terapia potencial en el tratamiento y prevención de la PE.

En 2016 Costantine *et al* realizaron un estudio piloto aleatorizado sobre el tratamiento con 10 mg de pravastatina de gestantes con alto riesgo de PE (Costantine et al., 2016) en el que no se produjeron efectos adversos y se consiguieron resultados promisorios para reducir la incidencia de esta enfermedad. Este trabajo justificó la evaluación de la pravastatina en un estudio más amplio con un aumento de dosis, por lo que posteriormente se desarrolló un ensayo clínico multicéntrico, doble ciego y controlado con placebo para determinar el efecto de 20 mg de pravastatina sobre gestaciones con alto riesgo de PE a término (Dobert et al., 2021); durante su realización se consideró conveniente investigar el efecto de la pravastatina sobre la función endotelial vascular de un grupo de gestantes participantes en el estudio, mediante la medición de biomarcadores circulantes, siendo este el objetivo central de la presente tesis doctoral.

En el ensayo clínico, el grupo con riesgo de PE a término recibió placebo o pravastatina según el protocolo de aleatorización establecido, dando lugar a los dos brazos o subgrupos del ensayo. Como se comentó anteriormente, la medición en condiciones basales de los biomarcadores de estrés oxidativo, inflamación, angiogénesis, función endotelial y dislipemia (Anexo IX, Tabla A.3) no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los subgrupos, por lo que todas las participantes comenzaron el estudio en condiciones similares en cuanto a las variables bajo investigación. Los resultados de la medición de estos biomarcadores después de la intervención los discutimos a continuación.

5.3.1 Biomarcadores de estrés oxidativo

Las ERO y las ERN contribuyen de forma importante al estrés oxidativo, a la inflamación y a la disfunción endotelial que subyacen en la enfermedad vascular. Se ha demostrado que las estatinas ejercen efectos antioxidantes al aumentar la actividad de la eNOS y disminuir la producción de ERO (Laufs et al., 1998). En concreto, las estatinas evitan la oxidación de los lípidos y disminuyen la generación de ERO dependiente del receptor de la angiotensina II (Wassmann

et al., 2001). Dado que el NO es eliminado por las ERO, al inhibir la producción de estos últimos, las estatinas aumentan la biodisponibilidad de NO en el compartimiento vascular (Girardi, 2014).

Para evaluar el efecto de la pravastatina sobre el estrés oxidativo determinamos en primer lugar la CATS, observándose su elevación en el tiempo en las gestantes tratadas con pravastatina, así como en el placebo (Figura 4.10). En los fluidos corporales la CATS refleja la capacidad de absorción de radicales de oxígeno o de inhibir una reacción oxidativa. La tendencia al aumento de la variable en el grupo que recibió el fármaco sugiere que el sistema de defensa pudo estar funcionando con niveles antioxidantes más altos, pero el comportamiento no pudo atribuirse a la pravastatina porque la CATS apareció significativamente más alta en los embarazos a los que se les dio placebo. Es posible que durante la etapa final del embarazo los niveles circulantes de AU aumenten como parte de una respuesta adaptativa dirigida a proteger al organismo de los efectos perjudiciales del exceso de radicales libres y el estrés oxidativo, lo que podría ayudar, en parte, a explicar estos resultados. El AU es uno de los principales antioxidantes circulantes de naturaleza no enzimática del organismo, proporciona aproximadamente el 60% de la capacidad de captación de radicales libres (Fabbrini et al., 2014) y su incremento puede provocar un aumento sensible de la CATS.

A continuación, fue medida la HCIS, que no cambió significativamente después de la intervención en ninguno de los brazos del ensayo clínico (Figura 4.10).

El AU es un biomarcador de isquemia placentaria, estrés oxidativo y daño renal. En el ensayo clínico aumentó de forma significativa en los dos subgrupos (Figura 4.10). En el que recibió placebo, el aumento pudo deberse a que la gestación continuó su curso con un deterioro del estatus antioxidante que se refleja en la acumulación del biomarcador. En el subgrupo que recibió pravastatina la acumulación de AU es controvertida, pero es posible que una parte de este efecto esté producido por una particularidad que se da con el fármaco empleado, porque se ha reportado que la pravastatina, a diferencia de otras estatinas, no reduce los niveles de AU. En un metaanálisis realizado en 2016 sobre el impacto de las estatinas en los niveles de AU se demostró su reducción significativa tras el tratamiento con atorvastatina y simvastatina, pero no con pravastatina ni con rosuvastatina (Derosa et al., 2016); esto podría explicar que continuara acumulándose en el subgrupo IIb durante el tratamiento.

Con la información obtenida mediante las variables de esta categoría podemos plantear que el tratamiento con pravastatina, en la dosis utilizada y durante el tiempo en el que se administró el tratamiento, no produjo un cambio significativo sobre los niveles de estrés oxidativo de las

gestantes con alto riesgo de PE a término, al menos cuando se valora a través de los biomarcadores anteriormente mencionados.

5.3.2 Biomarcadores de inflamación

Se sabe que la terapia con estatinas reduce los niveles de algunos marcadores inflamatorios, sin embargo, los mecanismos por los que esto ocurre no son comprendidos en su totalidad.

Existen pruebas de que las estatinas inhiben directamente la expresión de moléculas MHC-II mediada por el interferón, lo que conduce a una disminución de la activación de las células T (Kwak et al., 2000) y de la presencia de células inflamatorias inmunes liberadoras de citoquinas (monocitos, macrófagos, linfocitos) en el endotelio (Smith & Costantine, 2020).

En este trabajo los niveles de IL-6 se mantuvieron sin cambios en los embarazos tratados con pravastatina (Figura 4.11), probablemente porque la dosis administrada y la duración del tratamiento no fueron suficientes para producir una disminución apreciable del biomarcador. Hace dos años se publicaron los resultados de un estudio multicéntrico, aleatorizado y abierto desarrollado en Indonesia (Akbar et al., 2021) sobre el tratamiento con 40 mg de pravastatina para la prevención de la PE en pacientes consideradas de alto riesgo, desde la semanas 14 - 20 hasta el parto, en el que sí se produjo una mejora de los niveles de NO y una disminución de los niveles de IL-6 y endotelina (ET-1); en ese trabajo, duplicando la dosis y con un tiempo de tratamiento 3-4 veces mayor, el cambio sobre los niveles de IL-6 apuntó a un efecto beneficioso potencial de la pravastatina en la prevención de la PE. Por otro lado, en nuestra investigación, en el subgrupo que recibió placebo los niveles de IL-6 continuaron al alza, una situación que coincidió con el avance del estatus proinflamatorio que existía en los embarazos con riesgo, agravado presumiblemente a medida que avanzó la gestación.

En ninguno de los brazos del estudio se produjeron cambios en los niveles de GDF-15 (Figura 4.11). Aunque existe poca información sobre el comportamiento de este biomarcador en pacientes tratados con estatinas, nuestros datos coinciden con la ausencia de cambios en los niveles de GDF-15 medidos tras un tratamiento de 8 semanas con atorvastatina en pacientes con diabetes tipo 2 (Kim et al., 2016).

Las estatinas reducen los niveles de PCR hasta en el 60% de los pacientes con independencia de los niveles de lípidos (Asher & Houston, 2007), pero en el embarazo este es un biomarcador del estatus inflamatorio controvertido (Savidou et al., 2002; Teran et al., 2005). Previamente informamos que no hubo diferencias significativas en los niveles de PCR entre los pacientes con bajo y alto riesgo de PE a término. En los subgrupos del ensayo clínico tampoco se registraron

cambios significativos en la PCR (Figura 4.11), aunque pudo apreciarse una tendencia a disminuir en el grupo tratado con pravastatina (Anexo IX, Tabla A.5).

En resumen, sobre los marcadores de la categoría inflamatoria tampoco se produjeron cambios significativos por el efecto del tratamiento con pravastatina. En las pacientes con riesgo de PE a término a las que se administró placebo se registró un incremento de la IL-6, un deterioro del estatus proinflamatorio que no se produjo en las gestantes intervenidas con el fármaco en investigación.

5.3.3 Biomarcadores angiogénicos

En los últimos años ha ido creciendo el interés sobre el uso de las estatinas para prevenir complicaciones del embarazo (Brownfoot et al., 2015; Kumasawa et al., 2020). Por su seguridad y farmacocinética adecuada se ha propuesto la pravastatina como el tratamiento de elección para reducir la PE asociada a la disfunción endotelial (Costantine et al., 2016; de Alwis et al., 2020). El fundamento de la administración de estatinas es revertir el desequilibrio angiogénico o antiangiogénico que se detecta antes del reconocimiento clínico de la PE (Voto & Zeitune, 2022). En este trabajo nosotros no detectamos efecto alguno del tratamiento con pravastatina sobre el PIGF o el sFlt-1 a partir de las 35 semanas de gestación, al comportarse ambos biomarcadores de forma similar en los dos subgrupos de gestantes a los que se suministró placebo o los 20 mg de pravastatina (Anexo IX, Tablas A.4 y A.5). Es posible que este resultado, como explicamos razonadamente más adelante (Epígrafe 5.4), se deba a que la estatina se administró en un momento de la gestación muy avanzado y a una dosis insuficiente.

5.3.4 Biomarcadores de función endotelial

Se plantea que las estatinas disminuyen la producción de MVs porque afectan la síntesis de colesterol, que es un componente esencial de las células de los mamíferos. La concentración de colesterol en las membranas plasmáticas es mucho mayor que en otros compartimentos celulares. Dado que las estatinas inhiben directamente la síntesis y la captación de colesterol, pueden también inhibir intrínsecamente la síntesis de membranas y posteriormente la liberación de MVs por la célula debido a la inadecuación de las membranas para su ensamblaje y liberación. Además, las estatinas participan en la modificación de la proteína G, lo que influye negativamente en el autoensamblaje de los componentes del citoesqueleto y en el transporte de lipoproteínas, afectando la generación de MVs a través de un mecanismo independiente de la vía lipídica (Chen et al., 2022). Este planteamiento respalda la tendencia seguida por las MVs

en el brazo del ensayo clínico al que se administró pravastatina, donde se produjo una disminución significativa de la cantidad de MVs en plasma, mientras que en el subgrupo que recibió placebo la tendencia fue a aumentar (Figura 4.13-A).

En este trabajo, en las mujeres del subgrupo que recibió placebo se mantuvo la distribución porcentual de todos los tipos de MVs estudiados (Figura 4.13-B), observándose un aumento significativo de los niveles plasmáticos de las MVs totales, de las procedentes de plaquetas, de leucocitos, de monocitos, de células endoteliales y de sincitiotrofoblasto (Figura 4.14). Este incremento en la liberación de MVs pudo ser un reflejo del aumento del estrés oxidativo, de la activación de células inflamatorias y vasculares, así como de la activación y apoptosis del sincitiotrofoblasto placentario, un estatus que presumiblemente ya existía en el momento en que comenzó el ensayo y que evolucionó durante las semanas que duró la intervención, contribuyendo al deterioro de la función endotelial. Además, al analizar el fenotipo de las MVs-end mediante el marcador CD54 (MVs-ena), se registraron valores al alza, indicando la presencia de un endotelio activado, con características más adhesivas, que probablemente lo hicieron más disfuncional. Varios grupos que han investigado en este campo han publicado resultados similares (Dragovic et al., 2013; González-Quintero et al., 2003; Granger et al., 2018; Lalic-Cosic et al., 2021; Mikhailova et al., 2014; Tannetta et al., 2017).

En relación con la distribución de las MVs en el subgrupo que recibió pravastatina observamos una reducción en el porcentaje de todas las MVs estudiadas, al tiempo que aumentó la contribución de las MVs-no filiadas (Figura 4.13-B), un resultado que se explica por la depleción del tipo mayoritario, las MVs-pla, junto al menor aporte del resto de MVs investigadas. En la Figura 4.14 también se puede comprobar que en el subgrupo que recibió el fármaco se produjo una reducción significativa de las MVs plasmáticas totales, de las derivadas de plaquetas, de leucocitos, de monocitos, de células endoteliales, de células endoteliales activadas y de sincitiotrofoblasto. Estos resultados indican que la pravastatina disminuyó los niveles de MVs derivadas de células endoteliales vasculares, de la sangre y del sincitiotrofoblasto placentario en las mujeres con alto riesgo de PE a término, permitiendo sugerir que tuvo un efecto beneficioso sobre las gestantes, al reducir los estados proinflamatorio y procoagulante, así como la disfunción endotelial característicos de la situación de riesgo incrementado de PE en que se encontraban. Aunque en las bases de datos bibliográficas consultadas no hemos encontrado información específica acerca del efecto del tratamiento con pravastatina sobre las MVs en el embarazo, si existe evidencia del efecto de las estatinas sobre la liberación de MVs en estudios que comparten semejanzas con el nuestro. Por ejemplo, Oggero *et al* publicaron un trabajo en el que demuestran la reducción de los niveles de MVs-end en pacientes con riesgo

cardiovascular tratados con atorvastatina (Oggero et al., 2022); Badimon *et al* reportaron que el tratamiento hipolipemiante con estatinas en pacientes de un programa de prevención primaria de aterosclerosis redujo la liberación de MVs del endotelio, de plaquetas y de células inflamatorias, así como de subtipos de estas MVs portadoras de marcadores de activación celular (Suades et al., 2013); Chen *et al* han publicado recientemente un trabajo pionero en el que analizaron directamente el efecto de las estatinas sobre la producción de MVs y su composición lipídica en pacientes oncológicos que recibían quimioterapia, concluyendo que la administración de estatinas disminuyó la liberación de MVs al mismo tiempo que potenció su liberación enriquecidas de colesterol (Chen et al., 2022).

Además, al estudiar la influencia del tiempo de tratamiento con pravastatina sobre los diferentes tipos de MVs (Figura 4.17) encontramos que estratificando las gestantes en dos grupos, tomando como punto de corte 14 días de intervención, en las mujeres tratadas durante más tiempo la reducción en los niveles de MVs tendió a ser mayor en todos los tipos investigados, lo que permite suponer que con tiempos de administración más prolongados el efecto de la pravastatina en la disminución de los niveles de MVs podría ser significativamente mayor. Estudios realizados sobre el efecto de las estatinas sobre la liberación de MVs apuntan a tratamientos más prolongados para producir cambios estadísticamente significativos (Suades et al., 2013), una variable sobre la que se podría incidir en futuros estudios para mejorar los resultados de este tipo de intervención.

El ADMA es un importante inhibidor de la eNOS que se ha asociado con el deterioro de la función endotelial y con las alteraciones vasculares características de la PE. Serban *et al* realizaron un metaanálisis sobre el efecto de las estatinas en las concentraciones de ADMA y concluyeron que el tratamiento con estatinas hidrofílicas, como la pravastatina, reduce de forma significativa su concentración (Serban et al., 2015), cuando se realiza a dosis más altas (40 mg) y durante más tiempo (desde 8 semanas hasta varios meses). En nuestro caso, no observamos diferencias estadísticamente significativas en los niveles de ADMA en el subgrupo tratado con pravastatina, un hecho atribuimos a la baja dosis administrada (20 mg) y a la brevedad del tratamiento (de 2 a 4 semanas).

5.3.5 Biomarcadores de dislipemia

La principal utilidad de las estatinas es la reducción de la concentración de colesterol, un efecto que se consigue con diferente intensidad en función del tipo de estatina administrada, la dosis utilizada y la duración del tratamiento. A través de varios estudios publicados en las últimas

décadas se conoce la expectativa de reducción de colesterol de cada tipo de esquema (Smith & Costantine, 2020). Como puede deducirse del análisis de los resultados recogidos en las Tablas A.4 y A.5 del Anexo IX, mientras que entre las mujeres que recibieron placebo en este estudio el perfil lipídico solo cambió por el aumento en la concentración de triglicéridos (8%, $p < 0,050$), el tratamiento con pravastatina disminuyó significativamente los valores de colesterol total (10%, $p < 0,001$), colesterol-no-HDL (12%, $p < 0,001$), colesterol-LDL (19%, $p < 0,001$), ApoB (7%, $p < 0,001$) y la relación ApoB/ApoA1 (12%, $p < 0,001$). En este caso se consiguió una reducción del nivel de colesterol coherente con el tratamiento de baja intensidad utilizado en el ensayo clínico. También resultó lógico encontrar entre los embarazos tratados durante más de 14 días una discreta mejoría en la mayoría de los marcadores de dislipemia analizados (Tabla 4.19).

5.4 Resultados del ensayo clínico, implicaciones en la función endotelial

Meses después de concluida la parte experimental de esta tesis doctoral el grupo de Nicolaides publicó los resultados del ensayo clínico (Dobert et al., 2021) del que partió nuestra investigación, donde participaron mujeres con embarazos únicos que fueron identificadas mediante cribado entre las semanas 35 y 37 de gestación como de alto riesgo de PE a término, a las que se administró pravastatina a una dosis de 20 mg/día desde la semana 35-37 de gestación hasta el parto, sin que se redujera la incidencia de parto con PE en comparación con el placebo (14,6% frente a 13,6%). No hubo evidencia de interacción entre el efecto de la pravastatina, el riesgo estimado de PE, los antecedentes de embarazo, la adherencia ni el consumo de aspirina. Tampoco se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos en cuanto a la incidencia de complicaciones del embarazo o de resultados adversos fetales o neonatales.

La dosis de 20 mg de pravastatina/día se seleccionó sobre la base de los resultados obtenidos en un ensayo abierto con mujeres embarazadas con síndrome antifosfolípido que desarrollaron PE o restricción del crecimiento fetal entre las semanas 21 y 30 de gestación (Lefkou et al., 2016); y a partir de estudios realizados con animales, donde se sugirió que la pravastatina prevenía la PE mediante la inducción del PIGF (Kumasawa et al., 2011) y la disminución de los niveles circulantes de sFlt-1 (Bergmann et al., 2010). El grupo de Nicolaides no solo comprobó que los 20 mg de pravastatina diarios administrados a partir de la semana 35 en el ensayo clínico no reducían la incidencia de parto con PE, sino que tampoco tuvieron efecto alguno sobre el PIGF o el sFlt-1.

En general, los resultados negativos del ensayo clínico fueron atribuidos al diseño del estudio, a la fisiopatología de la PE a término y a los mecanismos de acción de las estatinas. Según expertos en el tema (Costantine et al., 2022) no sería esperable que una intervención iniciada al final del embarazo y que durara sólo unas semanas mostrara beneficios, porque en los trabajos practicados con murinos y en estudios preclínicos realizados previamente la pravastatina se administró al principio del embarazo y se mantuvo hasta el parto.

En un documento firmado por Voto & Zeitune titulado “Estatinas para prevenir o tratar la PE, algunas veces es demasiado tarde” se explica que la razón de ser de la administración de estatinas es revertir el desequilibrio angiogénico o antiangiogénico que se detecta antes del reconocimiento clínico de la PE y otros grandes síndromes obstétricos; que éstas pueden mejorar el perfil angiogénico o antiangiogénico cuando se administran de forma temprana y que para probar su eficacia el tratamiento debía comenzar tan pronto como se detectara un perfil angiogénico o antiangiogénico anormal (Voto & Zeitune, 2022), concluyendo que la falta de eficacia de la pravastatina para prevenir la PE de inicio tardío cuando su administración se inicia a las 36 semanas de gestación podía reflejar que la medicación se administró demasiado tarde en el embarazo y que además algunas pacientes con PE a término podrían no tener un perfil angiogénico o antiangiogénico anormal sobre el que actuar.

En la misma línea, Wei *et al* plantearon que los niveles séricos de sFlt-1/PIGF comienzan a cambiar en la semana 24 de gestación en algunas mujeres que posteriormente desarrollan PE a término, por lo que tratar con pravastatina 20 mg a las 35 semanas de embarazo para reducir el resultado de la PE a término en un plazo de 4 a 6 semanas podía ser muy poca estatina administrada demasiado tarde en el proceso de la enfermedad (Wei et al., 2021). Ellos también señalaron que los ensayos clínicos sobre ECV suelen demostrar beneficios después de más de 4 meses de tratamiento con estatinas, y que resultados a más corto plazo se observan normalmente con estatinas más potentes que la pravastatina y a dosis más altas. Así, la menor potencia y la dosis de estatina utilizada pueden haber contribuido a la falta de beneficios en el estudio de Nicolaides. Además, mencionan que el uso de una estatina hidrofílica como la pravastatina, que tiene una menor permeabilidad en la pared vascular que la de estatinas lipofílicas, puede ser mucho menos eficaz para prevenir los efectos perjudiciales de las citoquinas proinflamatorias de la PE. Por último, plantearon que el escaso uso de la aspirina en este estudio, en comparación con el uso habitual junto a las estatinas en los ensayos de ECV, también puede haber sido un factor.

En la reducida muestra del ensayo clínico que evaluamos en esta tesis doctoral, tampoco se confirma ese objetivo primario, al no haber diferencias estadísticamente significativas en la incidencia de PE entre los subgrupos evaluados (11,4% vs 9,1%; $p > 0,050$). Tampoco pudimos relacionar la intervención con los marcadores angiogénicos, ni encontramos ninguna asociación con el resto de las variables secundarias exploradas en el estudio multicéntrico. Resulta interesante que, a pesar de la dosis de pravastatina empleada, su baja potencia y el corto periodo de administración, pudo demostrarse una disminución de la liberación de MVs por la placenta y por células del sistema vascular materno, que reflejan una reducción del estrés oxidativo, una mejoría del estatus proinflamatorio y procoagulante, así como de la función endotelial en las mujeres con alto riesgo de PE a término. También pudo constatararse una mejora del perfil lipídico. Es probable que con dosis más altas de pravastatina y administradas más tempranamente, se pueda aprovechar el potencial pleiotrópico de las estatinas en un momento de la gestación que permita intervenir también sobre el desequilibrio angiogénico, junto al resto de los mecanismos fisiopatológicos que conducen al desarrollo de la enfermedad.

5.5 Limitaciones

La principal limitación de esta investigación fue no poder continuar el estudio de los biomarcadores propuestos durante el desarrollo del ensayo clínico en el grupo de mujeres con bajo riesgo de PE a término. La gestación se acompaña de importantes cambios fisiológicos que se producen para garantizar las demandas del feto y de la madre, lo que provoca variaciones significativas en algunos biomarcadores, entre los que se encuentran los de naturaleza cardiovascular. En este ensayo, donde se estudia el efecto del tratamiento con pravastatina sobre la función endotelial vascular, disponer de un grupo de gestantes sin riesgo para hacer un seguimiento paralelo de la dinámica de los biomarcadores propuestos en las últimas semanas del embarazo permitiría, no solo obtener más información sobre la capacidad de la pravastatina para mejorar la función endotelial vascular en las gestantes tratadas, sino que aportaría una referencia para comprender mejor el deterioro de la función endotelial en los embarazos con riesgo no tratados. Esta necesidad, aunque conocida al inicio del estudio, no se pudo satisfacer debido a las características organizativas del ensayo clínico multicéntrico y a la imposibilidad de modificar el calendario de seguimiento de las gestantes sin riesgo, que fueron reclutadas puntualmente en el momento en que se realizó el cribado.

Tampoco pudieron hacerse cambios sustanciales en el tipo de muestras que se recogieron para el ensayo clínico ni en las condiciones de extracción. Haber recogido muestras de orina en cada

visita de seguimiento hubiese aportado más información sobre el estado de las gestantes, porque conocer la proteinuria en el embarazo con riesgo de PE es un dato valioso. Haber tenido un hemograma, que informara sobre el estado de las diferentes poblaciones celulares de la sangre (hematíes, leucocitos y plaquetas) hubiese sido útil para normalizar la liberación de las MVs producidas por estas células y comprender mejor su influencia en la modificación de la función endotelial. Trabajar con otros anticoagulantes, como la heparina de sodio, habría simplificado la determinación de MVs y mejorado los niveles de recuperación.

5.6 Perspectivas

La disfunción endotelial representa la pérdida de la capacidad del endotelio para mantener la homeostasis vascular. Constituye un factor clave en la fisiopatología de la PE y contribuye al desarrollo de la ECV. La disfunción endotelial puede evaluarse mediante técnicas invasivas y no invasivas. Entre los métodos más populares se encuentra la vasodilatación mediada por flujo, que solo mide la función dependiente del NO y todavía presenta dificultades para su aplicación en la práctica clínica habitual. Otra forma de evaluar el funcionamiento del endotelio es mediante biomarcadores circulantes, que pueden aportar información sobre el estado funcional del endotelio y de los mecanismos subyacentes a la disfunción endotelial. Muchos de estos biomarcadores muestran una baja especificidad y un escaso valor predictivo cuando se utilizan aisladamente, pero al incluirlos en estrategias que combinan múltiples biomarcadores permiten diagnosticar la disfunción endotelial, estratificar adecuadamente el riesgo y realizar una evaluación integral de los tratamientos dirigidos al endotelio.

En la actualidad se están produciendo avances significativos en relación con el conocimiento de los mecanismos moleculares relacionados con la disfunción endotelial y se están describiendo continuamente nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas que pueden atenuarlos. La investigación en este campo es todavía joven, y por ello son necesarios más estudios para determinar la relación existente entre cada biomarcador con la función endotelial, cuáles reflejan mejor el estado de los componentes bioquímicos, celulares y funcionales del endotelio y qué combinaciones son las más adecuadas para cada enfermedad y aplicación.

Actualmente se investiga activamente el papel de las estatinas en la prevención de la PE. Las estatinas actúan en la reversión de varios mecanismos de disfunción endotelial, por lo que parece lógico que en la determinación del efecto de estos fármacos se realice un análisis exhaustivo de biomarcadores circulantes que aporten información sobre diversos aspectos del estatus endotelial. En este contexto, mejorar el conocimiento sobre el comportamiento de cada

variable en los diferentes momentos del embarazo y determinar que combinaciones son las más adecuadas para evaluar el tratamiento, es fundamental, y constituye una dirección en la que se realizarán más esfuerzos en los próximos años.

Está demostrado que las mujeres con PE tienen un mayor riesgo de padecer ECV en etapas posteriores de su vida. Varios biomarcadores que aparecen alterados en la PE continúan fuera de la normalidad después del parto y pueden ser utilizados para el pronóstico a largo plazo de la ECV. Por esta razón, la identificación de biomarcadores cardiovasculares no tradicionales prometedores es un área donde se continuará trabajando en los próximos años. Las investigaciones futuras deberían centrarse en la evaluación prospectiva de estos biomarcadores en mujeres con riesgo de PE y con PE, e investigar si estos marcadores son capaces de distinguir a las mujeres que posteriormente desarrollan ECV de las que no lo hacen. La ventana temporal que se abre entre el embarazo con riesgo de PE, o con PE, y la aparición de la ECV ofrece una oportunidad única para su prevención oportuna. La salud materna posparto después de la PE es un área de investigación en gran medida desatendida, pero tiene potencial porque es una etapa de la vida donde estas mujeres pueden beneficiarse del cribado y de un seguimiento orientado a la prevención de la ECV.

6 Conclusiones

- Los embarazos con alto riesgo de preeclampsia a término muestran signos de disfunción endotelial vascular determinada por los cambios observados, con respecto a los embarazos de bajo riesgo, en biomarcadores circulantes de:
 - o Estrés oxidativo (capacidad antioxidante total del suero, homocisteína y ácido úrico).
 - o Inflamación (Interleuquina 6 y factor de diferenciación del crecimiento 15).
 - o Función endotelial (microvesículas extracelulares y dimetil arginina asimétrica).
- La combinación de biomarcadores relacionados con la función endotelial que mejor explica el riesgo de preeclampsia a término incluye los niveles de homocisteína, Interleuquina 6 y la concentración de microvesículas derivadas de los leucocitos y de la placenta, lo que muestra que el estrés oxidativo, la inflamación y la disfunción endotelial son características de los embarazos con alto riesgo de preeclampsia tardía.
- La relación de dependencia de la presión arterial media con los niveles de ácido úrico, homocisteína y microvesículas derivadas de los leucocitos sugiere que los valores mayores de presión arterial media observados en las mujeres con alto riesgo de preeclampsia a término pueden ser debidos, al menos en parte, a una alteración en la función endotelial.
- La administración diaria de una dosis baja de pravastatina a mujeres con alto riesgo de preeclampsia a término reduce la concentración de microvesículas derivadas de la placenta y del sistema vascular materno, lo cual demuestra su potencial efecto beneficioso sobre el endotelio vascular.
- La administración de 20 mg de pravastatina diarios a gestantes con alto riesgo de preeclampsia a término mejora su perfil lipídico, a pesar de la baja dosis utilizada en el ensayo clínico, su potencia limitada y la corta duración del tratamiento.
- El patrón de alteración de los diferentes biomarcadores de estrés oxidativo, inflamación y disfunción endotelial que aparecen en los embarazos con alto riesgo de preeclampsia a término es similar al observado en la enfermedad cardiovascular, lo que puede indicar que estas mujeres tengan un incremento adicional del riesgo de desarrollo de eventos cardiovasculares adversos a largo plazo, y podrían beneficiarse de un seguimiento e intervención oportunos.

7 Bibliografía

- Abbassi-Ghanavati, M., Greer, L. G., & Cunningham, F. G. (2009). Pregnancy and laboratory studies: A reference table for clinicians. In *Obstetrics and Gynecology* (Vol. 114, Issue 6, pp. 1326–1331). <https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e3181c2bde8>
- Adela, R., & Banerjee, S. (2015). GDF-15 as a Target and Biomarker for Diabetes and Cardiovascular Diseases: A Translational Prospective. *Journal of Diabetes Research*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/490842>
- Akbar, M., Yosediputra, A., Pratama, R., Fadhilah, N., Sulistyowati, S., Amani, F., Dachlan, E., Dikman-Angsar, M., & Dekker, G. (2021). Pravastatin suppresses inflammatory cytokines and endothelial activation in patients at risk of developing preeclampsia: INOVASIA study. <https://doi.org/10.1080/14767058.2021.1879785>
- Akolekar, R., Syngelaki, A., Poon, L., Wright, D., & Nicolaides, K. (2013). Competing risks model in early screening for preeclampsia by biophysical and biochemical markers. *Fetal Diagnosis and Therapy*, 33(1), 8-15. <https://doi.org/10.1159/000341264>
- Al-Gubory, K., Fowler, P., & Garrel, C. (2010). The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(10), 1634-1650. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2010.06.001>
- Alijotas-Reig, J., Palacio-Garcia, C., Farran-Codina, I., Ruiz-Romance, M., Llurba, E., & Vilardell-Tarres, M. (2012). Circulating Cell-Derived Microparticles in Severe Preeclampsia and in Fetal Growth Restriction. *American Journal of Reproductive Immunology*, 67(2), 140-151. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0897.2011.01072.X>
- Alijotas-Reig, J., Palacio-Garcia, C., Farran-Codina, I., Zarzoso, C., Cabero-Roura, L., & Vilardell-Tarres, M. (2011). Circulating cell-derived microparticles in women with pregnancy loss. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)*, 66(3), 199-208. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0897.2010.00972.X>
- Alijotas-Reig, J., Palacio-Garcia, C., Llurba, E., & Vilardell-Tarres, M. (2013). Cell-derived microparticles and vascular pregnancy complications: a systematic and comprehensive review. *Fertility and Sterility*, 99(2), 441-449. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.10.009>
- Álvarez-Fernández, I., Prieto, B., & Álvarez, F. (2016). Preeclampsia. *Revista Del Laboratorio Clínico*, 9(2), 81-89. <https://doi.org/10.1016/j.labcli.2016.04.002>
- Amaral, L., Wallace, K., Owens, M., & LaMarca, B. (2017). Pathophysiology and Current Clinical Management of Preeclampsia. *Current Hypertension Reports*, 19(8), 61. <https://doi.org/10.1007/S11906-017-0757-7>
- Andrietti, S., Silva, M., Wright, A., Wright, D., & Nicolaides, K. H. (2016). Competing-risks model in screening for pre-eclampsia by maternal factors and biomarkers at 35-37 weeks' gestation. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 48(1), 72-79. <https://doi.org/10.1002/uog.15812>

- Aouahe, R., Biquard, L., Vaiman, D., & Miralles, F. (2018). Oxidative stress in preeclampsia and placental diseases. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19051496>
- Arrebola-Moreno, A., Laclaustra, M., & Kaski, J. (2012). Evaluación no invasiva de la función endotelial en la práctica clínica. *Revista Española de Cardiología*, *65*(1), 80-90. <https://doi.org/10.1016/j.recesp.2011.09.012>
- Asher, J., & Houston, M. (2007). Statins and C-reactive protein levels. *Journal of Clinical Hypertension (Greenwich, Conn.)*, *9*(8), 622-628. <https://doi.org/10.1111/J.1524-6175.2007.06639.X>
- Badimon, L., Suades, R., Arderiu, G., Peña, E., Chiva-Blanch, G., & Padró, T. (2017). Microvesicles in Atherosclerosis and Angiogenesis: From Bench to Bedside and Reverse. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, *4*. <https://doi.org/10.3389/FCVM.2017.00077>
- Baksu, A., Taskin, M., Goker, N., Baksu, B., & Uluocak, A. (2006). Plasma homocysteine in late pregnancies complicated with preeclampsia and in newborns. *American Journal of Perinatology*, *23*(1), 31-35. <https://doi.org/10.1055/S-2005-918889>
- Bdolah, Y., Elchalal, U., Natanson-Yaron, S., Yechiam, H., Bdolah-Abram, T., Greenfield, C., Goldman-Wohl, D., Milwidsky, A., Rana, S., Karumanchi, S., Yagel, S., & Hochner-Celnikier, D. (2014). Relationship between nulliparity and preeclampsia may be explained by altered circulating soluble fms-like tyrosine kinase 1. *Hypertension in Pregnancy*, *33*(2), 250-259. <https://doi.org/10.3109/10641955.2013.858745>
- Becker, A., Thakur, B., Weiss, J., Kim, H., Peinado, H., & Lyden, D. (2016). Extracellular vesicles in cancer: cell-to-cell mediators of metastasis. *Cancer Cell*, *30*(6), 836. <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2016.10.009>
- Bergmann, A., Ahmad, S., Cudmore, M., Gruber, A., Wittschen, P., Lindenmaier, W., Christofori, G., Gross, V., Gonzalves, A., Gröne, H., Ahmed, A., & Weich, H. (2010). Reduction of circulating soluble Flt-1 alleviates preeclampsia-like symptoms in a mouse model. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *14*(6B), 1857-1867. <https://doi.org/10.1111/J.1582-4934.2009.00820.X>
- Bezerra, M., Holanda, M., Marques, L., Murthi, P., & da Silva, F. (2012). Prevention of preeclampsia. *Journal of Pregnancy*, *2012*. <https://doi.org/10.1155/2012/435090>
- Blacher, J., Benetos, A., Kirzin, J., Malmejac, A., Guize, L., & Safar, M. E. (2002). Relation of plasma total homocysteine to cardiovascular mortality in a French population. *The American Journal of Cardiology*, *90*(6), 591-595. [https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(02\)02561-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(02)02561-4)
- Bodnar, L., Catov, J., Klebanoff, M., Ness, R., & Roberts, J. (2007). Prepregnancy body mass index and the occurrence of severe hypertensive disorders of pregnancy. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, *18*(2), 234-239. <https://doi.org/10.1097/01.EDE.0000254119.99660.E7>
- Bodnar, L., Ness, R., Markovic, N., & Roberts, J. (2005). The risk of preeclampsia rises with increasing prepregnancy body mass index. *Annals of Epidemiology*, *15*(7), 475-482. <https://doi.org/10.1016/J.ANNEPIDEM.2004.12.008>

- Bokslag, A., Teunissen, P., Franssen, C., van Kesteren, F., Kamp, O., Ganzevoort, W., Paulus, W. J., & de Groot, C. (2017). Effect of early-onset preeclampsia on cardiovascular risk in the fifth decade of life. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *216*(5), 523.e1-523.e7. <https://doi.org/10.1016/J.AJOG.2017.02.015>
- Bootcov, M., Bauskin, A., Valenzuela, S., Moore, A., Bansal, M., He, X., Zhang, H., Donnellan, M., Mahler, S., Pryor, K., Walsh, B., Nicholson, R., Fairlie, W., Por, S., Robbins, J., & Breit, S. (1997). MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(21), 11514-11519. <https://doi.org/10.1073/PNAS.94.21.11514>
- Bovee, E., Gulati, M., & Maas, A. (2021). Novel Cardiovascular Biomarkers Associated with Increased Cardiovascular Risk in Women with Prior Preeclampsia/HELLP Syndrome: A Narrative Review. *European Cardiology*, *16*. <https://doi.org/10.15420/ECR.2021.21>
- Boyd, H., Tahir, H., Wohlfahrt, J., & Melbye, M. (2013). Associations of Personal and Family Preeclampsia History With the Risk of Early-, Intermediate- and Late-Onset Preeclampsia. *American Journal of Epidemiology*, *178*(11), 1611-1619. <https://doi.org/10.1093/AJE/KWT189>
- Brown, C., Turner, S., Bailey, K., Mosley, T., Kardia, S., Wiste, H., Kullo, I., & Garovic, V. (2013). Hypertension in pregnancy is associated with elevated C-reactive protein levels later in life. *Journal of Hypertension*, *31*(11), 2213. <https://doi.org/10.1097/HJH.0B013E3283642F6C>
- Brown, M., Magee, L., Kenny, L., Karumanchi, S., McCarthy, F., Saito, S., Hall, D., Warren, C., Adayi, G., & Ishaku, S. (2018). Hypertensive Disorders of Pregnancy. *Hypertension*, *72*(1), 24-43. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.10803>
- Brownfoot, F., Tong, S., Hannan, N., Binder, N., Walker, S., Cannon, P., Hastie, R., Onda, K., & Kaitu'u-Lino, T. (2015). Effects of Pravastatin on Human Placenta, Endothelium, and Women with Severe Preeclampsia. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, *66*(3), 687-697; discussion 445. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05445>
- Burger, D., & Touyz, R. (2012). Cellular biomarkers of endothelial health: microparticles, endothelial progenitor cells, and circulating endothelial cells. *Journal of the American Society of Hypertension*, *6*(2), 85-99. <https://doi.org/10.1016/J.JASH.2011.11.003>
- Burton, G., & Jauniaux, E. (2011). Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, *25*(3), 287-299. <https://doi.org/10.1016/J.BPOBGYN.2010.10.016>
- Cai, H., Reinisch, K., & Ferro-Novick, S. (2007). Coats, tethers, Rab, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Developmental Cell*, *12*(5), 671-682. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2007.04.005>
- Chau, K., Hennessy, A., & Makris, A. (2017). Placental growth factor and pre-eclampsia. *Journal of Human Hypertension*, *31*(12), 782. <https://doi.org/10.1038/JHH.2017.61>
- Chen, H., Zhang, J., Qin, F., Chen, X., & Jiang, X. (2018). Evaluation of the predictive value of high sensitivity C-reactive protein in pregnancy-induced hypertension syndrome. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *16*(2), 619-622. <https://doi.org/10.3892/ETM.2018.6246/HTML>

- Chen, Q., Lau, S., Tong, M., Wei, J., Shen, F., Zhao, J., & Zhao, M. (2016a). Serum uric acid may not be involved in the development of preeclampsia. *Journal of Human Hypertension*, *30*(2), 136-140. <https://doi.org/10.1038/JHH.2015.47>
- Chen, Q., Stone, P., Ching, L. M., & Chamley, L. (2009). A role for interleukin-6 in spreading endothelial cell activation after phagocytosis of necrotic trophoblastic material: implications for the pathogenesis of pre-eclampsia. *The Journal of Pathology*, *217*(1), 122-130. <https://doi.org/10.1002/PATH.2425>
- Chen, Q., Wang, Y., Zhao, M., Hyett, J., da Silva Costa, F., & Nie, G. (2016b). Serum levels of GDF15 are reduced in preeclampsia and the reduction is more profound in late-onset than early-onset cases. *Cytokine*, *83*, 226-230. <https://doi.org/10.1016/J.CYTO.2016.05.002>
- Chen, Y., Xu, Y., Wang, J., Prisinzano, P., Yuan, Y., Lu, F., Zheng, M., Mao, W., & Wan, Y. (2022). Statins Lower Lipid Synthesis but Promote Secretion of Cholesterol-Enriched Extracellular Vesicles and Particles. *Frontiers in Oncology*, *12*, 1965. <https://doi.org/10.3389/FONC.2022.853063/BIBTEX>
- Chiarello, D., Abad, C., Rojas, D., Toledo, F., Vázquez, C., Mate, A., Sobrevia, L., & Marín, R. (2020). Oxidative stress: Normal pregnancy versus preeclampsia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1866*(2), 165354. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2018.12.005>
- Chironi, G., Boulanger, C., Simon, A., Dignat-George, F., Freyssinet, J., & Tedgui, A. (2009). Endothelial microparticles in diseases. *Cell and Tissue Research*, *335*(1), 143-151. <https://doi.org/10.1007/S00441-008-0710-9>
- Ciardello, C., Cavallini, L., Spinelli, C., Yang, J., Reis-Sobreiro, M., Candia, P. de, Minciacchi, V. R., & di Vizio, D. (2016). Focus on Extracellular Vesicles: New Frontiers of Cell-to-Cell Communication in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences 2016, Vol. 17, Page 175*, *17*(2), 175. <https://doi.org/10.3390/IJMS17020175>
- Cikot, R., Steegers-Theunissen, R., Thomas, C., de Boo, T., Merkus, H., & Steegers, E. (2001). Longitudinal vitamin and homocysteine levels in normal pregnancy. *The British Journal of Nutrition*, *85*(1), 49-58. <https://doi.org/10.1079/BJN2000209>
- Ciobanu, A., Wright, A., Panaitescu, A., Syngelaki, A., Wright, D., & Nicolaidis, K. H. (2019). Prediction of imminent preeclampsia at 35-37 weeks gestation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *220*(6), 584.e1-584.e11. <https://doi.org/10.1016/J.AJOG.2019.01.235>
- Climont, E., Benaiges, D., & Pedro-Botet, J. (2021). Hydrophilic or Lipophilic Statins? *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, *8*, 687585. <https://doi.org/10.3389/FCVM.2021.687585>
- Cnossen, J., de Ruyter-Hanhijärvi, H., van der Post, J., Mol, B., Khan, K., & ter Riet, G. (2006). Accuracy of serum uric acid determination in predicting pre-eclampsia: A systematic review. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, *85*(5), 519-525. <https://doi.org/10.1080/00016340500342037>
- Corominas, A., Medina, Y., Balconi, S., Casale, R., Farina, M., Martínez, N., & Damiano, A. (2022). Assessing the Role of Uric Acid as a Predictor of Preeclampsia. *Frontiers in Physiology*, *12*, 2446. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2021.785219/BIBTEX>

- Costantine, M., Cleary, K., Hebert, M., Ahmed, M., Brown, L., Ren, Z., Easterling, T., Haas, D., Haneline, L., Caritis, S., Venkataramanan, R., West, H., D'Alton, M., & Hankins, G. (2016). Safety and pharmacokinetics of pravastatin used for the prevention of preeclampsia in high-risk pregnant women: a pilot randomized controlled trial. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *214*(6), 720.e1-720.e17. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.12.038>
- Costantine, M., Lawrence-Cleary, K., Saade, G., & Wapner, R. (2022). Letter by Costantine et al Regarding Article, "Pravastatin Versus Placebo in Pregnancies at High Risk of Term Preeclampsia." *Circulation*, *145*(4), e115-e116. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.121.056728>
- Crovetto, F., Figueras, F., Triunfo, S., Crispi, F., Rodriguez-Sureda, V., Peguero, A., Dominguez, C., & Gratacos, E. (2014). Added value of angiogenic factors for the prediction of early and late preeclampsia in the first trimester of pregnancy. *Fetal Diagnosis and Therapy*, *35*(4), 258-266. <https://doi.org/10.1159/000358302>
- Cruickshank, T., Macdonald, T., Walker, S., Keenan, E., Dane, K., Middleton, A., Kyritsis, V., Myers, J., Cluver, C., Hastie, R., Bergman, L., Garcha, D., Cannon, P., Murray, E., Nguyen, T. V., Hiscock, R., Pritchard, N., Hannan, N., Tong, S., & Kaitu'u-Lino, T. J. (2021a). Circulating Growth Differentiation Factor 15 Is Increased Preceding Preeclampsia Diagnosis: Implications as a Disease Biomarker. *Journal of the American Heart Association*, *10*(16). <https://doi.org/10.1161/JAHA.120.020302>
- Cufaro, M., Pieragostino, D., Lanuti, P., Rossi, C., Cicalini, I., Federici, L., de Laurenzi, V., & Boccio, P. (2019). Extracellular Vesicles and Their Potential Use in Monitoring Cancer Progression and Therapy: The Contribution of Proteomics. <https://doi.org/10.1155/2019/1639854>
- Dai, C., Fei, Y., Li, J., Shi, Y., & Yang, X. (2021). A Novel Review of Homocysteine and Pregnancy Complications. *BioMed Research International*, *2021*. <https://doi.org/10.1155/2021/6652231>
- Damiano, A., Corominas, A., Balconi, S., Palermo, M., Maskin, B., Posadas, H., Palomar, E., & Aires, B. (2014). Niveles de ácido úrico sérico y riesgo de desarrollar preeclampsia. *MEDICINA (Buenos Aires)* 2014; *74*: 462-471
- Das, M., & Kale, V. (2020). Extracellular vesicles: Mediators of embryo-maternal crosstalk during pregnancy and a new weapon to fight against infertility. *European Journal of Cell Biology*, *99*(8), 151125. <https://doi.org/10.1016/J.EJCB.2020.151125>
- Davignon, J. (2004). Cardioprotective and other emerging effects of statins. *International Journal of Clinical Practice, Supplement*, *143*, 49-57. <https://doi.org/10.1111/j.1368-504x.2004.00391.x>
- de Alwis, N., Beard, S., Mangwiro, Y., Binder, N., Kaitu'u-Lino, T., Brownfoot, F., Tong, S., & Hannan, N. (2020). Pravastatin as the statin of choice for reducing pre-eclampsia-associated endothelial dysfunction. *Pregnancy Hypertension*, *20*, 83-91. <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2020.03.004>
- de Falco, S. (2012). The discovery of placenta growth factor and its biological activity. *Experimental & Molecular Medicine* *2012* *44*:1, *44*(1), 1-9. <https://doi.org/10.3858/emm.2012.44.1.025>

- Deanfield, J., Donald, A., Ferri, C., Giannattasio, C., Halcox, J., Halligan, S., Lerman, A., Mancina, G., Oliver, J., Pessina, A., Rizzoni, D., Rossi, G., Salvetti, A., Schiffrin, E., Taddei, S., & Webb, D. (2005). Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *Journal of Hypertension*, *23*(1), 7-17. <https://doi.org/10.1097/00004872-200501000-00004>
- Dekker, G., de Vries, J., Doelitzsch, P., Huijgens, P., von Blomberg, B., Jakobs, C., & van Geijn, H. (1995). Underlying disorders associated with severe early-onset preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *173*(4), 1042-1048. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(95\)91324-6](https://doi.org/10.1016/0002-9378(95)91324-6)
- Dekker, G., & van Geijn, H. (1996). Endothelial dysfunction in preeclampsia. Part II: Reducing the adverse consequences of endothelial cell dysfunction in preeclampsia; therapeutic perspectives. *Journal of Perinatal Medicine*, *24*(2), 119-139. <https://doi.org/10.1515/JPME.1996.24.2.119>
- Del Rio, D., Stewart, A., & Pellegrini, N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, *15*(4), 316-328. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2005.05.003>
- Derosa, G., Maffioli, P., Reiner, Ž., Simental-Mendía, L., & Sahebkar, A. (2016). Impact of Statin Therapy on Plasma Uric Acid Concentrations: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Drugs*, *76*(9), 947-956. <https://doi.org/10.1007/S40265-016-0591-2/FIGURES/6>
- Dey-Hazra, E., Hertel, B., Kirsch, T., Woywodt, A., Lovric, S., Haller, H., Haubitz, M., & Erdbruegger, U. (2010). Detection of circulating microparticles by flow cytometry: Influence of centrifugation, filtration of buffer, and freezing. *Vascular Health and Risk Management*, *6*(1), 1125-1133. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S13236>
- Dhingra, R., Gona, P., Nam, B., D'Agostino, R., Wilson, P., Benjamin, E., & O'Donnell, C. (2007). C - Reactive Protein, Inflammatory Conditions and Cardiovascular Disease Risk. *The American Journal of Medicine*, *120*(12), 1054. <https://doi.org/10.1016/J.AMJMED.2007.08.037>
- Dianing Tyas, B., Lestari, P., Ilham, M., & Akbar, A. (2019). Maternal Perinatal Outcomes Related to Advanced Maternal Age in Preeclampsia Pregnant Women. *Journal of Family & Reproductive Health*, *13*(4), 191. <https://doi.org/10.18502/jfrh.v13i4.2646>
- Dobert, M., Varouxaki, A., Mu, A., Syngelaki, A., Ciobanu, A., Akolekar, R., de Paco Matallana, C., Cicero, S., Greco, E., Singh, M., Janga, D., del Mar Gil, M., Jani, J., Bartha, J., Maclagan, K., Wright, D., & Nicolaides, K. (2021). Pravastatin Versus Placebo in Pregnancies at High Risk of Term Preeclampsia. *Circulation*, *144*, 670-679. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.121.053963>
- Dodds, L., Fell, D., Dooley, K., Armson, B., Allen, A., Nassar, B., Perkins, S., & Joseph, K. (2008). Effect of homocysteine concentration in early pregnancy on gestational hypertensive disorders and other pregnancy outcomes. *Clinical Chemistry*, *54*(2), 326-334. <https://doi.org/10.1373/CLINCHEM.2007.097469>

- Doyle, L., & Wang, M. (2019). Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells* 2019, Vol. 8, Page 727, 8(7), 727. <https://doi.org/10.3390/CELLS8070727>
- Dragovic, R., Southcombe, J., Tannetta, D., Redman, C., & Sargent, I. (2013). Multicolor flow cytometry and nanoparticle tracking analysis of extracellular vesicles in the plasma of normal pregnant and pre-eclamptic women. *Biology of Reproduction*, 89(6), 151-152. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.113.113266/2514316>
- D'Souza, V., Rani, A., Patil, V., Pisal, H., Randhir, K., Mehendale, S., Wagh, G., Gupte, S., & Joshi, S. (2016). Increased oxidative stress from early pregnancy in women who develop preeclampsia. *Clinical and Experimental Hypertension*, 38(2), 225-232. <https://doi.org/10.3109/10641963.2015.1081226>
- Duley, L. (2009). The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Seminars in Perinatology*, 33(3), 130-137. <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2009.02.010>
- Dymara-Konopka, W., & Laskowska, M. (2019). The Role of Nitric Oxide, ADMA, and Homocysteine in The Etiopathogenesis of Preeclampsia—Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(11). <https://doi.org/10.3390/IJMS20112757>
- Endemann, D., & Schiffrin, E. (2004). Endothelial dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 15(8), 1983-1992. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000132474.50966.DA>
- England, L., & Zhang, J. (2007). Smoking and risk of preeclampsia: a systematic review. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 12(7), 2471-2483. <https://doi.org/10.2741/2248>
- Enquobahrie, D., Williams, M., Butler, C., Frederick, I., Miller, R., & Luthy, D. (2004). Maternal plasma lipid concentrations in early pregnancy and risk of preeclampsia. *American Journal of Hypertension*, 17(7), 574-581. <https://doi.org/10.1016/J.AMJHYPER.2004.03.666>
- Fabbrini, E., Serafini, M., Colic Baric, I., Hazen, S. L., & Klein, S. (2014). Effect of plasma uric acid on antioxidant capacity, oxidative stress, and insulin sensitivity in obese subjects. *Diabetes*, 63(3), 976–981. <https://doi.org/10.2337/db13-1396>
- Flammer, A., & Lüscher, T. (2010). Three decades of endothelium research: from the detection of nitric oxide to the everyday implementation of endothelial function measurements in cardiovascular diseases. *Swiss Medical Weekly*, 140. <https://doi.org/10.4414/SMW.2010.13122>
- Fonseca, F., & Izar, M. (2018). Endothelial Biomarkers. *Endothelium and Cardiovascular Diseases*, 229-233. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812348-5.00017-9>
- Fox, R., Kitt, J., Leeson, P., Aye, C. Y. L., & Lewandowski, A. J. (2019). Preeclampsia: Risk Factors, Diagnosis, Management, and the Cardiovascular Impact on the Offspring. *Journal of Clinical Medicine*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/JCM8101625>
- Freeman, D., McManus, F., Brown, E., Cherry, L., Norrie, J., Ramsay, J., Clark, P., Walker, I., Sattar, N., & Greer, I. (2004). Short- and long-term changes in plasma inflammatory markers associated with preeclampsia. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 44(5), 708-714. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000143849.67254.CA>

- Gallos, I., Sivakumar, K., Kilby, M., Coomarasamy, A., Thangaratinam, S., & Vatish, M. (2013). Pre-eclampsia is associated with, and preceded by, hypertriglyceridaemia: a meta-analysis. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, *120*(11), 1321-1332. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.12375>
- Gambardella, J., Khondkar, W., Morelli, M., Wang, X., Santulli, G., & Trimarco, V. (2020). Arginine and Endothelial Function. *Biomedicines*, *8*(8). <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES8080277>
- Gilani, S., Weissgerber, T., Garovic, V., & Jayachandran, M. (2016). Preeclampsia and Extracellular Vesicles. In *Current Hypertension Reports* (Vol. 18, Issue 9). Current Medicine Group LLC 1. <https://doi.org/10.1007/s11906-016-0678-x>
- Girardi, G. (2014). Can statins prevent pregnancy complications? *Journal of Reproductive Immunology*, *101-102*(1), 161-167. <https://doi.org/10.1016/J.JRI.2013.07.005>
- González-Quintero, V., Jiménez, J., Jy, W., Mauro, L., Hortman, L., O'Sullivan, M., & Ahn, Y. (2003). Elevated plasma endothelial microparticles in preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *189*(2), 589-593. [https://doi.org/10.1067/S0002-9378\(03\)00469-1](https://doi.org/10.1067/S0002-9378(03)00469-1)
- González-Quintero, V., Smarkusky, L., Jiménez, J., Mauro, L., Jy, W., Hortman, L., O'Sullivan, M., & Ahn, Y. (2004). Elevated plasma endothelial microparticles: Preeclampsia versus gestational hypertension. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *191*(4), 1418-1424. <https://doi.org/10.1016/J.AJOG.2004.06.044>
- Gradziuk, M., & Radziwon, P. (2017). Methods for detection of microparticles derived from blood and endothelial cells. *Acta Haematologica Polonica*, *48*(4), 316-329. <https://doi.org/10.1016/J.ACHAEM.2017.03.003>
- Granger, J., Spradley, F., & Bakrania, B. (2018). The Endothelin System: A Critical Player in the Pathophysiology of Preeclampsia. In *Current Hypertension Reports* (Vol. 20, Issue 4). Current Medicine Group LLC 1. <https://doi.org/10.1007/s11906-018-0828-4>
- Greer, I., Lyall, F., Perera, T., Boswell, F., & Magara, L. (1994). Increased concentrations of cytokines interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in plasma of women with preeclampsia: a mechanism for endothelial dysfunction? *Obstetrics and Gynecology*, *84*(6), 937-940. [https://doi.org/10.1016/0020-7292\(95\)94888-m](https://doi.org/10.1016/0020-7292(95)94888-m)
- Grimes, S., & Wild, R. (2018). Effect of Pregnancy on Lipid Metabolism and Lipoprotein Levels. *Endotext*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK498654/>
- György, B., Szabó, T., Pásztói, M., Pál, Z., Misják, P., Aradi, B., László, V., Pállinger, É., Pap, E., Kittel, Á., Nagy, G., Falus, A., & Buzás, E. (2011). Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and Molecular Life Sciences* *2011* *68*:16, *68*(16), 2667-2688. <https://doi.org/10.1007/S00018-011-0689-3>
- Hamadeh, R., Mohsen, A., Kobeissy, F., Karouni, A., & Akoum, H. (2021). C-Reactive Protein for Prediction or Early Detection of Pre-Eclampsia: A Systematic Review. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, *86*(1-2), 13-26. <https://doi.org/10.1159/000515530>

- Hanley, J., & McNeil, B. (1983). A method of comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases. *Radiology*, *148*(3), 839-843. <https://doi.org/10.1148/RADIOLOGY.148.3.6878708>
- Hernández-Díaz, S., Toh, S., & Cnattingius, S. (2009). Risk of pre-eclampsia in first and subsequent pregnancies: prospective cohort study. *BMJ*, *338*(7711), 34. <https://doi.org/10.1136/BMJ.B2255>
- Hertig, A., Berkane, N., Lefevre, G., Toumi, K., Marti, H., Capeau, J., Uzan, S., & Rondeau, E. (2004). Maternal serum sFlt1 concentration is an early and reliable predictive marker of preeclampsia. *Clinical Chemistry*, *50*(9), 1702-1703. <https://doi.org/10.1373/CLINCHEM.2004.036715>
- Heydarian, M., McCaffrey, T., Florea, L., Yang, Z., Ross, M., Zhou, W., & Maynard, S. (2009). Novel splice variants of sFlt1 are upregulated in preeclampsia. *Placenta*, *30*(3), 250-255. <https://doi.org/10.1016/J.PLACENTA.2008.12.010>
- Holden, D., Fickling, S., Whitley, G., & Nussey, S. (1998). Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine, a natural inhibitor of nitric oxide synthase, in normal pregnancy and preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *178*(3), 551-556. [https://doi.org/10.1016/S0002-9378\(98\)70437-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(98)70437-5)
- Hromada, C., Mühleder, S., Grillari, J., Redl, H., & Holnthoner, W. (2017). Endothelial extracellular vesicles-promises and challenges. *Frontiers in Physiology*, *8*(MAY), 275. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2017.00275/BIBTEX>
- Hutcheon, J., Lisonkova, S., & Joseph, K. (2011). Epidemiology of pre-eclampsia and the other hypertensive disorders of pregnancy. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, *25*(4), 391-403. <https://doi.org/10.1016/J.BPOBGYN.2011.01.006>
- Hwang, H., Kwon, J., Kim, M., Park, Y., & Kim, Y. (2007). Maternal serum highly sensitive C-reactive protein in normal pregnancy and pre-eclampsia. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics: The Official Organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, *98*(2), 105-109. <https://doi.org/10.1016/J.IJGO.2007.03.050>
- Inglis, H., Norris, P., & Danesh, A. (2015). Techniques for the analysis of extracellular vesicles using flow cytometry. *Journal of Visualized Experiments*, *2015*(97). <https://doi.org/10.3791/52484>
- Jayachandran, M., Miller, V., Heit, J., & Owen, W. (2012). Methodology for isolation, identification and characterization of microvesicles in peripheral blood. *Journal of Immunological Methods*, *375*(1-2), 207-214. <https://doi.org/10.1016/J.JIM.2011.10.012>
- Jim, B., & Karumanchi, S. (2017). Preeclampsia: Pathogenesis, Prevention, and Long-Term Complications. *Seminars in Nephrology*, *37*(4), 386-397. <https://doi.org/10.1016/J.SEMNEPHROL.2017.05.011>
- Jimenez, J., Jy, W., Mauro, L., Soderland, C., Horstman, L., & Ahn, Y. (2003). Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thrombosis Research*, *109*(4), 175-180. [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(03\)00064-1](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(03)00064-1)

- Johnson, J., & Louis, J. (2022). *Does race or ethnicity play a role in the origin, pathophysiology, and outcomes of preeclampsia? An expert review of the literature.* <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.07.038>
- Johnson, R., Kanbay, M., Kang, D., Sánchez-Lozada, L., & Feig, D. (2011). Uric acid: A clinically useful marker to distinguish preeclampsia from gestational hypertension. In *Hypertension* (Vol. 58, Issue 4, pp. 548-549). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.178921>
- Kanda, T., & Takahashi, T. (2004). Interleukin-6 and cardiovascular diseases. *Japanese Heart Journal*, 45(2), 183-193. <https://doi.org/10.1536/JHJ.45.183>
- Karacay, Ö., Sepici-Dincel, A., Karcaaltincaba, D., Sahin, D., Yalvaç, S., Akyol, M., Kandemir, Ö., & Altan, N. (2010). A quantitative evaluation of total antioxidant status and oxidative stress markers in preeclampsia and gestational diabetic patients in 24-36 weeks of gestation. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 89(3), 231-238. <https://doi.org/10.1016/J.DIABRES.2010.04.015>
- Katsi, V., Georgountzos, G., Kallistratos, M, Zerdes, I., Makris, T., Manolis, A., Nihoyannopoulos, P., & Tousoulis, D. (2017). The Role of Statins in Prevention of Preeclampsia: A Promise for the Future? *Frontiers in Pharmacology*, 8, 247. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00247>
- Kattah, A. (2020). Preeclampsia and Kidney Disease: Deciphering Cause and Effect. *Current Hypertension Reports* 22:11, 22(11), 1-11. <https://doi.org/10.1007/S11906-020-01099-1>
- Kaur, G., Mishra, S., Sehgal, A., & Prasad, R. (2008). Alterations in lipid peroxidation and antioxidant status in pregnancy with preeclampsia. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 313(1-2), 37-44. <https://doi.org/10.1007/S11010-008-9739-Z>
- Kendall, R., Wang, G., & Thomas, K. (1996). Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 226(2), 324-328. <https://doi.org/10.1006/BBRC.1996.1355>
- Khaliq, O., Konoshita, T., Moodley, J., & Naicker, T. (2018). The Role of Uric Acid in Preeclampsia: Is Uric Acid a Causative Factor or a Sign of Preeclampsia? <https://doi.org/10.1007/s11906-018-0878-7>
- Khosla, K., Heimberger, S., Nieman, K., Tung, A., Shahul, S., Staff, A., & Rana, S. (2021). Long-Term Cardiovascular Disease Risk in Women After Hypertensive Disorders of Pregnancy: Recent Advances in Hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 78(4), 927-935. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.121.16506>
- Kim, J., Back, M., Yi, H., Joung, K., Kim, H., & Ku, B. (2016). Effect of Atorvastatin on Growth Differentiation Factor-15 in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus and Dyslipidemia. *Diabetes & Metabolism Journal*, 40(1), 70. <https://doi.org/10.4093/DMJ.2016.40.1.70>
- Kishimoto, K. (1976). *Regulation of antibody response in vitro. X. Biphasic effect of cyclic AMP on the secondary anti-hapten antibody response to anti-immunoglobulin and enhancing soluble factor - PubMed.* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/175119/>

- Krüger-Genge, A., Blocki, A., Franke, R., & Jung, F. (2019). Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18). <https://doi.org/10.3390/IJMS20184411>
- Kulandavelu, S., Whiteley, K., Qu, D., Mu, J., Bainbridge, S., & Adamson, S. (2012). Endothelial nitric oxide synthase deficiency reduces uterine blood flow, spiral artery elongation, and placental oxygenation in pregnant mice. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 60(1), 231-238. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.187559>
- Kumasawa, K., Ikawa, M., Kidoya, H., Hasuwa, H., Saito-Fujita, T., Morioka, Y., Takakura, N., Kimura, T., & Okabe, M. (2011). Pravastatin induces placental growth factor (PGF) and ameliorates preeclampsia in a mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(4), 1451-1455. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1011293108>
- Kumasawa, K., Iriyama, T., Nagamatsu, T., Osuga, Y., & Fujii, T. (2020). Pravastatin for preeclampsia: From animal to human. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 46(8), 1255-1262. <https://doi.org/10.1111/jog.14295>
- Kupferminc, M., Peaceman, A., Aderka, D., Wallach, D., & Socol, M. (1996). Soluble tumor necrosis factor receptors and interleukin-6 levels in patients with severe preeclampsia. *Obstetrics and Gynecology*, 88(3), 420-427. [https://doi.org/10.1016/0029-7844\(96\)00179-2](https://doi.org/10.1016/0029-7844(96)00179-2)
- Kwak, B., Mulhaupt, F., Myit, S., & Mach, F. (2000). Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nature Medicine*, 6(12), 1399-1402. <https://doi.org/10.1038/82219>
- Lalic-Cosic, S., Dopsaj, V., Kovac, M., Mandic-Markovic, V., Mikovic, Z., Mobarrez, F., & Antovic, A. (2021). Phosphatidylserine Exposing Extracellular Vesicles in Pre-eclamptic Patients. *Frontiers in Medicine*, 8. <https://doi.org/10.3389/FMED.2021.761453>
- Laresgoiti-Servitje, E., & Gomez-Lopez, N. (2012). The pathophysiology of preeclampsia involves altered levels of angiogenic factors promoted by hypoxia and autoantibody-mediated mechanisms. *Biology of Reproduction*, 87(2), 36-37. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.112.099861/2513813>
- Laskowska, M., Laskowska, K., & Oleszczuk, J. (2012). PP135. Maternal serum levels of endothelial nitric oxide synthase and ADMA, an endogenous ENOS inhibitor in pregnancies complicated by severe preeclampsia. *Pregnancy Hypertension*, 2(3), 312. <https://doi.org/10.1016/J.PREGHY.2012.04.246>
- Laufs, U., la Fata, V., Plutzky, J., & Liao, J. (1998). Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation*, 97(12), 1129-1135. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.97.12.1129>
- Lefkou, E., Mamopoulos, A., Dagklis, T., Vosnakis, C., Rousso, D., & Girardi, G. (2016). Pravastatin improves pregnancy outcomes in obstetric antiphospholipid syndrome refractory to antithrombotic therapy. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(8), 2933-2940. <https://doi.org/10.1172/JCI86957>
- León, G., Maida, R., Urrutia, A., Jorge, E., Guzmán, A., Fuentes, S., Medina, R., Moreno, M., Muñoz, J., Hicks, J., & Torres, Y. (2017). Oxidative profiles of LDL and HDL isolated from

- women with preeclampsia. *Lipids in Health and Disease*, 16(1).
<https://doi.org/10.1186/s12944-017-0480-z>
- Levine, R., Maynard, S., Qian, C., Lim, K., England, L., Yu, K., Schisterman, E., Thadhani, R., Sachs, B., Epstein, F., Sibai, B., Sukhatme, V., & Karumanchi, S. (2004). Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *The New England Journal of Medicine*, 350(7), 672-683. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA031884>
- Liao, J. (2002). Isoprenoids as mediators of the biological effects of statins. *The Journal of Clinical Investigation*, 110(3), 285. <https://doi.org/10.1172/JCI16421>
- Lisowska, M., Pietrucha, T., & Sakowicz, A. (2018). Preeclampsia and Related Cardiovascular Risk: Common Genetic Background. *Current Hypertension Reports*, 20(8).
<https://doi.org/10.1007/S11906-018-0869-8>
- Lok, C., Jebbink, J., Nieuwland, R., Faas, M., Boer, K., Sturk, A., & van der Post, J. (2009). Leukocyte Activation and Circulating Leukocyte-Derived Microparticles in Preeclampsia. *American Journal of Reproductive Immunology*, 61(5), 346-359.
<https://doi.org/10.1111/J.1600-0897.2009.00701.X>
- Lok, C., van der Post, J., Sargent, I., Hau, C., Sturk, A., Boer, K., & Nieuwland, R. (2008). Changes in microparticle numbers and cellular origin during pregnancy and preeclampsia. *Hypertension in Pregnancy*, 27(4), 344-360. <https://doi.org/10.1080/10641950801955733>
- Lok, C., van der Post, J., Sturk, A., Sargent, I., & Nieuwland, R. (2011). The functions of microparticles in preeclampsia. *Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health*, 1(1), 59-65.
<https://doi.org/10.1016/J.PREGHY.2010.10.006>
- López, M., Montalvo, I., Vital, V., Hinojosa, J., Leaños, A., & Martínez, A. (2015). Serial determinations of asymmetric dimethylarginine and homocysteine during pregnancy to predict pre-eclampsia: a longitudinal study. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 122(12), 1586-1592. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.13516>
- Luan, Y., & Yao, Y. (2018). The clinical significance and potential role of C-reactive protein in chronic inflammatory and neurodegenerative diseases. *Frontiers in Immunology*, 9(JUN), 1302. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.01302/BIBTEX>
- Luo, Z., An, N., Xu, H., Larante, A., Audibert, F., & Fraser, W. (2007). The effects and mechanisms of primiparity on the risk of pre-eclampsia: a systematic review. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, 21 Suppl 1(SUPPL. 1), 36-45. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3016.2007.00836.X>
- Luppi, P., & DeLoia, J. (2006). Monocytes of preeclamptic women spontaneously synthesize pro-inflammatory cytokines. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, 118(2-3), 268-275.
<https://doi.org/10.1016/J.CLIM.2005.11.001>
- Ma, Y., Ye, Y., Zhang, J., Ruan, C., & Gao, P. (2019). Immune imbalance is associated with the development of preeclampsia. *Medicine*, 98(14).
<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000015080>
- Makedos, G., Papanicolaou, A., Hitoglou, A., Kalogiannidis, I., Makedos, A., Vrazioti, V., & Goutzioulis, M. (2007). Homocysteine, folic acid and B12 serum levels in pregnancy

- complicated with preeclampsia. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 275(2), 121-124. <https://doi.org/10.1007/S00404-006-0223-2>
- Mannaerts, D., Faes, E., Gielis, J., van Craenenbroeck, E., Cos, P., Spaanderman, M., Gyselaers, W., Cornette, J., & Jacquemyn, Y. (2018). Oxidative stress and endothelial function in normal pregnancy versus pre-eclampsia, a combined longitudinal and case control study. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12884-018-1685-5>
- Many, A., Hubel, C., & Roberts, J. (1996). Hyperuricemia and xanthine oxidase in preeclampsia, revisited. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 174(1 Pt 1), 288-291. [https://doi.org/10.1016/S0002-9378\(96\)70410-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(96)70410-6)
- Mao, D., Che, J., Li, K., Han, S., Yue, Q., Zhu, L., Zhang, W., & Li, L. (2010). Association of homocysteine, asymmetric dimethylarginine, and nitric oxide with preeclampsia. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 282(4), 371-375. <https://doi.org/10.1007/S00404-009-1234-6>
- Marjono, A., Brown, D., Horton, K., Wallace, E., Breit, S., & Manuelpillai, U. (2003). Macrophage inhibitory cytokine-1 in gestational tissues and maternal serum in normal and pre-eclamptic pregnancy. *Placenta*, 24(1), 100-106. <https://doi.org/10.1053/PLAC.2002.0881>
- Marques, F., Campos, F., Filho, O., Carvalho, A., Dusse, L., & Gomes, K. (2012). Circulating microparticles in severe preeclampsia. *Clinica Chimica Acta*, 414, 253-258. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.09.023>
- Martin, A., Bindra, R., Curcio, P., Cicero, S., & Nicolaidis, K. (2001). Screening for pre-eclampsia and fetal growth restriction by uterine artery Doppler at 11-14 weeks of gestation. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 18(6), 583-586. <https://doi.org/10.1046/J.0960-7692.2001.00594.X>
- Maynard, S., Min, J., Merchan, J., Lim, K., Li, J., Mondal, S., Libermann, T., Morgan, J., Sellke, F., Stillman, I., Epstein, F., Sukhatme, V., & Karumanchi, S. (2003). Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *Journal of Clinical Investigation*, 111(5), 649. <https://doi.org/10.1172/JCI17189>
- Mbah, A., Kornosky, J., Kristensen, S., August, E., Alio, A., Marty, P., Belogolovkin, V., Bruder, K., & Salihu, H. (2010). Super-obesity and risk for early and late pre-eclampsia. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 117(8), 997-1004. <https://doi.org/10.1111/J.1471-0528.2010.02593.X>
- McDonald, S., Malinowski, A., Zhou, Q., Yusuf, S., & Devereaux, P. (2008). Cardiovascular sequelae of preeclampsia/eclampsia: a systematic review and meta-analyses. *American Heart Journal*, 156(5), 918-930. <https://doi.org/10.1016/J.AHJ.2008.06.042>
- Metzger, B., Buchanan, T., Coustan, D., de Leiva, A., Dunger, D., Hadden, D., Hod, M., Kitzmiller, J., Kjos, S., Oats, J., Pettitt, D., Sacks, D., & Zoupas, C. (2007). Summary and recommendations of the Fifth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 30 Suppl 2(SUPPL. 2). <https://doi.org/10.2337/DC07-S225>

- Meziani, F., Tesse, A., & Andriantsitohaina, R. (2008). Microparticles are vectors of paradoxical information in vascular cells including the endothelium: role in health and diseases. *Pharmacol Rep.* 2008 Jan-Feb; 60(1):75-84. PMID: 18276988.
- Mihu, D., Costin, N., Mihu, C. M., Blaga, L., & Pop, R. (2008). C-reactive protein, marker for evaluation of systemic inflammatory response in preeclampsia. *Revista Medico-Chirurgicala a Societatii de Medici Si Naturalisti Din Iasi*, 112(4), 1019-1025. <https://europepmc.org/article/med/20209780>
- Mikhailova, V., Ovchinnikova, O., Zainulina, M., Sokolov, D., & Sel'kov, S. (2014). Detection of microparticles of leukocytic origin in the peripheral blood in normal pregnancy and preeclampsia. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 157(6), 751-756. <https://doi.org/10.1007/S10517-014-2659-X>
- Miller, E., & Vollbracht, S. (2021). Neurology of Preeclampsia and Related Disorders: an Update in Neuro-obstetrics. *Current Pain and Headache Reports*, 25(6). <https://doi.org/10.1007/S11916-021-00958-Z>
- Moe, K., Sugulle, M., Dechend, R., Angel, K., & Staff, A. (2020). Functional and structural vascular biomarkers in women 1 year after a hypertensive disorder of pregnancy. *Pregnancy Hypertension*, 21, 23-29. <https://doi.org/10.1016/J.PREGHY.2020.04.008>
- Moore, A., Brown, D., Fairlie, W., Bauskin, A., Brown, P., Munier, M., Russell, P., Salamonsen, L., Wallace, E., & Breit, S. (2000). The transforming growth factor- β superfamily cytokine macrophage inhibitory cytokine-1 is present in high concentrations in the serum of pregnant women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85(12), 4781-4788. <https://doi.org/10.1210/JCEM.85.12.7007>
- Mulla, M., Myrtolli, K., Potter, J., Boeras, C., Kavathas, P., Sfakianaki, A., Tadesse, S., Norwitz, E., Guller, S., & Abrahams, V. (2011). Uric Acid Induces Trophoblast IL-1 β Production Via the Inflammasome: Implications for the Pathogenesis of Preeclampsia. *American Journal of Reproductive Immunology*, 65(6), 542-548. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0897.2010.00960.X>
- Myatt, L., & Webster, R. (2009). Vascular biology of preeclampsia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 7(3), 375-384. <https://doi.org/10.1111/J.1538-7836.2008.03259.X>
- Nair, A., & Savitha, C. (2017). Estimation of Serum Uric Acid as an Indicator of Severity of Preeclampsia and Perinatal Outcome. *Journal of Obstetrics and Gynaecology of India*, 67(2), 109. <https://doi.org/10.1007/S13224-016-0933-8>
- Nieuwland, R., Berckmans, R., Rotteveel-Eijkman, R., Maquelin, K., Roozendaal, K., Jansen, P., ten Have, K., Eijnsman, L., Hack, C., & Sturk, A. (1997). Cell-derived microparticles generated in patients during cardiopulmonary bypass are highly procoagulant. *Circulation*, 96(10), 3534-3541. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.96.10.3534>
- Nilsson, E., Ros, H., Cnattingius, S., & Lichtenstein, P. (2004). The importance of genetic and environmental effects for pre-eclampsia and gestational hypertension: a family study. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 111(3), 200-206. <https://doi.org/10.1111/J.1471-0528.2004.00042X.X>

- Nirupama, R., Divyashree, S., Janhavi, P., Muthukumar, S., & Ravindra, P. (2021). Preeclampsia: Pathophysiology and management. *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*, 50(2), 101975. <https://doi.org/10.1016/J.JOGOH.2020.101975>
- Oggero, S., Godec, T., van Gorp, R., Pinto, L., Schurgers, J., Reutelingsperger, C., Sever, P., Norling, L. v., Perretti, M., & Gupta, A. (2022). Role of plasma extracellular vesicles in prediction of cardiovascular risk and alterations in response to statin therapy in hypertensive patients. *Journal of Hypertension*, 40(8), 1522-1529. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000003178>
- O'Gorman, N., Wright, D., Syngelaki, A., Akolekar, R., Wright, A., Poon, L., & Nicolaides, K. (2016). Competing risks model in screening for preeclampsia by maternal factors and biomarkers at 11-13 weeks gestation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 214(1), 103.e1-103.e12. <https://doi.org/10.1016/J.AJOG.2015.08.034>
- Omani-Samani, R., Alizadeh, A., Almasi-Hashiani, A., Mohammadi, M., Maroufizadeh, S., Navid, B., Khedmati-Morasae, E., & Amini, P. (2020). Risk of preeclampsia following assisted reproductive technology: systematic review and meta-analysis of 72 cohort studies. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine: The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, 33(16), 2826-2840. <https://doi.org/10.1080/14767058.2018.1560406>
- Östlund, I., Haglund, B., & Hanson, U. (2004). Gestational diabetes and preeclampsia. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 113(1), 12-16. <https://doi.org/10.1016/J.EJOGRB.2003.07.001>
- Owens, M., Martin, J., Wallace, K., Keiser, S., Parrish, M., Tam Tam, K., & Martin, R. (2013). Postpartum thrombotic microangiopathic syndrome. *Transfusion and Apheresis Science: Official Journal of the World Apheresis Association: Official Journal of the European Society for Haemapheresis*, 48(1), 51-57. <https://doi.org/10.1016/J.TRANSCI.2012.05.016>
- Panaitescu, A., Ciobanu, A., Syngelaki, A., Wright, A., Wright, D., & Nicolaides, K. (2018). Screening for pre-eclampsia at 35-37 weeks' gestation. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 52(4). <https://doi.org/10.1002/UOG.19111>
- Pecoraro, V., & Trenti, T. (2020). Predictive value of serum uric acid levels for adverse maternal and perinatal outcomes in pregnant women with high blood pressure. A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 252, 447-454. <https://doi.org/10.1016/J.EJOGRB.2020.07.042>
- Peng, H., Yong, C., Xu, J., & Fan, Y. (2015). Elevated homocysteine levels and risk of cardiovascular and all-cause mortality: a meta-analysis of prospective studies. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 16(1), 78-86. <https://doi.org/10.1631/JZUS.B1400183>
- Perry, H., Khalil, A., & Thilaganathan, B. (2018). Preeclampsia and the cardiovascular system: An update. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 28(8), 505-513. <https://doi.org/10.1016/J.TCM.2018.04.009>
- Pertegal, M., Fenoy, F., Hernández, M., Mendiola, J., Delgado, J., Bonacasa, B., Corno, A., López, B., Bosch, V., & Hernández, I. (2016). Fetal Val108/158Met catechol-O-methyltransferase

- (COMT) polymorphism and placental COMT activity are associated with the development of preeclampsia. *Fertility and Sterility*, 105(1), 134-143.e3. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2015.09.019>
- Petrozella, L., Mahendroo, M., Timmons, B., Roberts, S., McIntire, D., & Alexander, J. (2012). Endothelial microparticles and the antiangiogenic state in preeclampsia and the postpartum period. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 207(2), 140.e20-140.e26. <https://doi.org/10.1016/J.AJOG.2012.06.011>
- Pober, J., & Sessa, W. (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature Reviews Immunology* 2007 7:10, 7(10), 803-815. <https://doi.org/10.1038/nri2171>
- Poon, L., Zaragoza, E., Akolekar, R., Anagnostopoulos, E., & Nicolaides, K. (2008). Maternal serum placental growth factor (PIGF) in small for gestational age pregnancy at 11(+0) to 13(+6) weeks of gestation. *Prenatal Diagnosis*, 28(12), 1110-1115. <https://doi.org/10.1002/PD.2143>
- Possomato-Vieira, J., & Khalil, R. (2016). Mechanism of endothelial dysfunction in hypertensive pregnancy and preeclampsia. *Advances in Pharmacology*, 77(7503), 361-431. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2016.04.008>
- Prins, J., Gomez, N., & Robertson, S. (2012). Interleukin-6 in pregnancy and gestational disorders. *Journal of Reproductive Immunology*, 95(1-2), 1-14. <https://doi.org/10.1016/J.JRI.2012.05.004>
- Punthumapol, C., & Kittichotpanich, B. (2008). Comparative Study of Serum Lipid Concentrations in Preeclampsia and Normal Pregnancy. *J Med Assoc Thai*, 91(7). <http://www.medassocthai.org/journal>
- Ram, M., Anteby, M., Weiniger, C., Havakuk, O., Gilboa, I., Shenhav, M., & Yogev, Y. (2021). Acute pulmonary edema due to severe preeclampsia in advanced maternal age women. *Pregnancy Hypertension*, 25, 150-155. <https://doi.org/10.1016/J.PREGHY.2021.05.019>
- Ramos, P. (2015). Statins: From High Potency to Extralipid Effects. *Rev Esp Cardiol Supl*, 15, 22-27. [https://doi.org/10.1016/S1131-3587\(15\)70121-4](https://doi.org/10.1016/S1131-3587(15)70121-4)
- Rana, S., & Karumanchi, S. (2017). Pathophysiology of Preeclampsia. In *Fetal and Neonatal Physiology* (pp. 1724-1732.e2). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35214-7.00172-4>
- Raymond, D., & Peterson, E. (2011). A critical review of early-onset and late-onset preeclampsia. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 66(8), 497-506. <https://doi.org/10.1097/OGX.0B013E3182331028>
- Redman, C. (1991). Current topic: pre-eclampsia and the placenta. *Placenta*, 12(4), 301-308. [https://doi.org/10.1016/0143-4004\(91\)90339-H](https://doi.org/10.1016/0143-4004(91)90339-H)
- Redman, C., & Sargent, I. (2008). Circulating microparticles in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Placenta*, 29 Suppl A(SUPPL.), 73-77. <https://doi.org/10.1016/J.PLACENTA.2007.11.016>
- Redman, C., Staff, A., & Roberts, J. (2022). Syncytiotrophoblast stress in preeclampsia: the convergence point for multiple pathways. *Am J Obstet Gynecol*. 2022 Feb;226(2S): S907-S927. doi: 10.1016/j.ajog.2020.09.047

- Redman, C., & Sargent, I. (2005). Latest advances in understanding preeclampsia. *Science (New York, N.Y.)*, *308*(5728), 1592-1594. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1111726>
- Roberge, S., Bujold, E., & Nicolaides, K. (2018). Aspirin for the prevention of preterm and term preeclampsia: systematic review and metaanalysis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *218*(3), 287-293.e1. <https://doi.org/10.1016/J.AJOG.2017.11.561>
- Rochette, L., Zeller, M., Cottin, Y., & Vergely, C. (2020). Insights Into Mechanisms of GDF15 and Receptor GFRAL: Therapeutic Targets. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *31*(12), 939-951. <https://doi.org/10.1016/J.TEM.2020.10.004>
- Rolnik, D., Wright, D., Poon, L. C., O’Gorman, N., Syngelaki, A., de Paco Matallana, C., Akolekar, R., Cicero, S., Janga, D., Singh, M., Molina, F., Persico, N., Jani, J., Plasencia, W., Papaioannou, G., Tenenbaum-Gavish, K., Meiri, H., Gizurarson, S., Maclagan, K., & Nicolaides, K. (2017b). Aspirin versus Placebo in Pregnancies at High Risk for Preterm Preeclampsia. *New England Journal of Medicine*, *377*(7), 613-622. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1704559>
- Rolnik, D., Wright, D., Poon, L., Syngelaki, A., O’Gorman, N., de Paco Matallana, C., Akolekar, R., Cicero, S., Janga, D., Singh, M., Molina, F., Persico, N., Jani, J., Plasencia, W., Papaioannou, G., Tenenbaum-Gavish, K., & Nicolaides, K. (2017a). ASPRE trial: performance of screening for preterm pre-eclampsia. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, *50*(4), 492-495. <https://doi.org/10.1002/uog.18816>
- Saffer, C., Olson, G., Boggess, K., Beyerlein, R., Eubank, C., & Sibai, B. (2013). Determination of placental growth factor (PlGF) levels in healthy pregnant women without signs or symptoms of preeclampsia. *Pregnancy Hypertension*, *3*(2), 124-132. <https://doi.org/10.1016/J.PREGHY.2013.01.004>
- Salazar, J., Martínez, M., Chávez-Castillo, M., Núñez, V., Añez, R., Torres, Y., Toledo, A., Chacín, M., Silva, C., Pacheco, E., Rojas, J., & Bermúdez, V. (2014). C-Reactive Protein: An In-Depth Look into Structure, Function, and Regulation. *International Scholarly Research Notices*, *2014*, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2014/653045>
- Sánchez-Aranguren, L., Prada, C., Riaño-Medina, C., & Lopez, M. (2014). Endothelial dysfunction and preeclampsia: role of oxidative stress. *Frontiers in Physiology*, *5*(OCT). <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2014.00372>
- Sangrador, C., & Orejas, G. (1999). Educación Continuada Epidemiología y Metodología Científica Aplicada a la Pediatría (IV): Pruebas diagnósticas. *An Esp Peditr* 1999;50:301-314
- Sato, Y., Kanno, S., Oda, N., Abe, M., Ito, M., Shitara, K., & Shibuya, M. (2000). Properties of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in signal transduction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *902*, 201-207. <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.2000.TB06314.X>
- Savvidou, M., Lees, C., Parra, M., Hingorani, A., & Nicolaides, K. (2002). Levels of C-reactive protein in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, *109*(3), 297-301. <https://doi.org/10.1111/J.1471-0528.2002.01130.X>
- Serban, C., Sahebkar, A., Ursoniu, S., Mikhailidis, D., Rizzo, M., Lip, G., Kees Hovingh, G., Kastelein, J., Kalinowski, L., Rysz, J., & Banach, M. (2015). A systematic review and meta-

- analysis of the effect of statins on plasma asymmetric dimethylarginine concentrations. *Scientific Reports* 2015 5:1, 5(1), 1-8. <https://doi.org/10.1038/srep09902>
- Serrano, N., Guio, E., Becerra-Bayona, S., Quintero-Lesmes, D., Bautista-Niño, P., Colmenares-Mejía, C., Páez, M., Luna, M., Díaz, L., Ortiz, R., Beltrán, M., Monterrosa, Á., Miranda, Y., Mesa, C., Saldarriaga, W., & Casas, J. (2020). C-reactive protein, interleukin-6 and pre-eclampsia: large-scale evidence from the GenPE case-control study. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 80(5), 381-387. <https://doi.org/10.1080/00365513.2020.1747110>
- Shibata, E., Rajakumar, A., Powers, R., Larkin, R., Gilmour, C., Bodnar, L., Crombleholme, W., Ness, R., Roberts, J., & Hubel, C. (2005). Soluble fms-like tyrosine kinase 1 is increased in preeclampsia but not in normotensive pregnancies with small-for-gestational-age neonates: relationship to circulating placental growth factor. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90(8), 4895-4903. <https://doi.org/10.1210/JC.2004-1955>
- Sibai, B., Dekker, G., & Kupferminc, M. (2005). Pre-eclampsia. *Lancet (London, England)*, 365(9461), 785-799. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)17987-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)17987-2)
- Sibal, L., Agarwal, S., Home, P., & Boger, R. (2010). The Role of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disease. *Current Cardiology Reviews*, 6(2), 82. <https://doi.org/10.2174/157340310791162659>
- Smith, D., & Costantine, M. (2020). The role of statins in the prevention of preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. <https://doi.org/10.1016/J.AJOG.2020.08.040>
- Sohlberg, S., Stephansson, O., Cnattingius, S., & Wikström, A. (2012). Maternal Body Mass Index, Height, and Risks of Preeclampsia. <https://doi.org/10.1038/ajh.2011.175>
- Spence, T., Allsopp, P. J., Yeates, A., Mulhern, M. S., Strain, J. J., & Mccorley, E. M. (2021). Review Article Maternal Serum Cytokine Concentrations in Healthy Pregnancy and Preeclampsia. <https://doi.org/10.1155/2021/6649608>
- Spradley, F., Palei, A., & Granger, J. (2015). Increased risk for the development of preeclampsia in obese pregnancies: weighing in on the mechanisms. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 309(11), R1326. <https://doi.org/10.1152/AJPREGU.00178.2015>
- Stillman, I., & Karumanchi, S. (2007). The glomerular injury of preeclampsia. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 18(8), 2281-2284. <https://doi.org/10.1681/ASN.2007020255>
- Stühlinger, M., Tsao, P., Her, J., Kimoto, M., Balint, R., & Cooke, J. (2001). Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation*, 104(21), 2569-2575. <https://doi.org/10.1161/HC4601.098514>
- Suades, R., Padró, T., Alonso, R., Mata, P., & Badimon, L. (2013). Lipid-lowering therapy with statins reduces microparticle shedding from endothelium, platelets and inflammatory cells. *Thrombosis and Haemostasis*, 110(08), 366-377. <https://doi.org/10.1160/TH13-03-0238>

- Sugulle, M., Dechend, R., Herse, F., Weedon-Fekjaer, M., Johnsen, G., Brosnihan, K., Anton, L., Luft, F., Wollert, K., Kempf, T., & Staff, A. (2009). Circulating and placental growth-differentiation factor 15 in preeclampsia and in pregnancy complicated by diabetes mellitus. *Hypertension (Dallas, Tex: 1979)*, *54*(1), 106-112. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.130583>
- Tangeras, L., Austdal, M., Skråstad, R., Salvesen, K., Austgulen, R., Bathen, T., & Iversen, A. (2015). Distinct First Trimester Cytokine Profiles for Gestational Hypertension and Preeclampsia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *35*(11), 2478-2485. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.305817>
- Tannetta, D., Masliukaite, I., Vatish, M., Redman, C., & Sargent, I. (2017). Update of syncytiotrophoblast derived extracellular vesicles in normal pregnancy and preeclampsia. *Journal of Reproductive Immunology*, *119*, 98-106. <https://doi.org/10.1016/J.JRI.2016.08.008>
- Taravati, A., & Tohidi, F. (2018). Comprehensive analysis of oxidative stress markers and antioxidants status in preeclampsia. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, *57*(6), 779-790. <https://doi.org/10.1016/J.TJOG.2018.10.002>
- Tashie, W., Fondjo, L., Owiredu, W., Ephraim, R., Asare, L., Adu-Gyamfi, E., & Seidu, L. (2020). Altered Bioavailability of Nitric Oxide and L-Arginine Is a Key Determinant of Endothelial Dysfunction in Preeclampsia. *BioMed Research International*, *2020*. <https://doi.org/10.1155/2020/3251956>
- Taylor, B., Tang, G., Ness, R., Olsen, J., Hougaard, D., Skogstrand, K., Roberts, J., & Haggerty, C. L. (2016). Mid-pregnancy Circulating Immune Biomarkers in Women with Preeclampsia and Normotensive Controls. *Pregnancy Hypertension*, *6*(1), 72. <https://doi.org/10.1016/J.PREGHY.2015.11.002>
- Tayyar, A., Krithinakis, K., Wright, A., Wright, D., & Nicolaidis, K. (2016). Mean arterial pressure at 12, 22, 32 and 36 weeks' gestation in screening for pre-eclampsia. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, *47*(5), 573-579. <https://doi.org/10.1002/UOG.15815>
- Temel-Yuksel, I., Mathyk, B., Aslan-Cetin, B., Turhan, U., Okumus, Z., Yetkin-Yildirim, G., & Acar, D. (2018). Maternal levels of growth differentiation factor-15 in patients with preeclampsia. *Hypertension in Pregnancy*, *37*(4), 192-196. <https://doi.org/10.1080/10641955.2018.1524477>
- Teran, E., Escudero, C., & Calle, A. (2005). C-reactive protein during normal pregnancy and preeclampsia. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, *89*(3), 299-300. <https://doi.org/10.1016/J.IJGO.2005.02.002>
- Tesfa, E., Nibret, E., & Munshea, A. (2020). Maternal lipid profile and risk of pre-eclampsia in African pregnant women: A systematic review and meta-analysis. *PloS One*, *15*(12). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0243538>
- Théry, C., Witwer, K., Aikawa, E., Alcaraz, M., Anderson, J., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G., Ayre, D., Bach, J., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N., Baxter, A., Bebawy, M., ... Zuba-Surma, E. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of

- the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1), 1535750. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
- Thilaganathan, B., & Kalafat, E. (2019). Cardiovascular System in Preeclampsia and Beyond. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 73(3), 522-531. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11191>
- Thompson, D., Pepys, M., & Wood, S. (1999). The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure (London, England: 1993)*, 7(2), 169-177. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(99\)80023-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(99)80023-9)
- Tillett, W., & Francis, T. (1930). Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *The Journal of Experimental Medicine*, 52(4), 561. <https://doi.org/10.1084/JEM.52.4.561>
- Tomimatsu, T., Mimura, K., Endo, M., Kumasawa, K., & Kimura, T. (2017). Pathophysiology of preeclampsia: An angiogenic imbalance and long-lasting systemic vascular dysfunction. In *Hypertension Research* (Vol. 40, Issue 4, pp. 305-310). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/hr.2016.152>
- Too, G., & Hill, J. (2013). Hypertensive crisis during pregnancy and postpartum period. *Seminars in Perinatology*, 37(4), 280-287. <https://doi.org/10.1053/J.SEMPERI.2013.04.007>
- Tsai, V., Husaini, Y., Sainsbury, A., Brown, D., & Breit, S. (2018). The MIC-1/GDF15-GFRAL Pathway in Energy Homeostasis: Implications for Obesity, Cachexia, and Other Associated Diseases. *Cell Metabolism*, 28(3), 353-368. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2018.07.018>
- Turbeville, H., & Sasser, J. (2020). Preeclampsia beyond pregnancy: long-term consequences for mother and child. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 318(6), F1315-F1326. <https://doi.org/10.1152/AJPRENAL.00071.2020>
- Ugwuanyi, R., Chiege, I., Agwu, F., Eleje, G., & Ifediorah, N. (2021). Association between Serum Uric Acid Levels and Perinatal Outcome in Women with Preeclampsia. *Obstetrics and Gynecology International*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6611828>
- VanWijk, M., Nieuwland, R., Boer, K., van der Post, J., VanBavel, E., & Sturk, A. (2002). Microparticle subpopulations are increased in preeclampsia: possible involvement in vascular dysfunction? *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 187(2), 450-456. <https://doi.org/10.1067/MOB.2002.124279>
- Verlohren, S., Brennecke, S., Galindo, A., Karumanchi, S., Mirkovic, L., Schlembach, D., Stepan, H., Vatish, M., Zeisler, H., & Rana, S. (2022). Clinical interpretation and implementation of the sFlt-1/PlGF ratio in the prediction, diagnosis and management of preeclampsia. *Pregnancy Hypertension*, 27, 42-50. <https://doi.org/10.1016/J.PREGHY.2021.12.003>
- Vince, G., Starkey, P., Austgulen, R., Kwiatkowski, D., & Redman, C. (1995). Interleukin-6, tumour necrosis factor and soluble tumour necrosis factor receptors in women with pre-eclampsia. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 102(1), 20-25. <https://doi.org/10.1111/J.1471-0528.1995.TB09020.X>

- Voto, L., Illia, R., Darbon-Grosso, H., Francisco Uranga, I., & Margulies, M. (1988). Uric acid levels: a useful index of the severity of preeclampsia and perinatal prognosis. *Journal of Perinatal Medicine*, 16(2), 123-126. <https://doi.org/10.1515/JPME.1988.16.2.123>
- Voto, L., & Zeitune, M. (2022). Statins to prevent or treat preeclampsia: sometimes it is too late. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 226(3), 453. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2021.10.014>
- Wadhvani, N., Patil, V., Mehendale, S., Wagh, G., Gupte, S., & Joshi, S. (2016). Increased homocysteine levels exist in women with preeclampsia from early pregnancy. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine: The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, 29(16), 2719-2725. <https://doi.org/10.3109/14767058.2015.1102880>
- Wang, A., Rana, S., & Karumanchi, S. (2009). Preeclampsia: The Role of Angiogenic Factors in Its Pathogenesis. *Physiology*, 24(3), 147-158. <https://doi.org/10.1152/physiol.00043.2008>
- Wassmann, S., Laufs, U., Bäumer, A., Müller, K., Konkol, C., Sauer, H., Böhm, M., & Nickenig, G. (2001). Inhibition of geranylgeranylation reduces angiotensin II-mediated free radical production in vascular smooth muscle cells: involvement of angiotensin AT1 receptor expression and Rac1 GTPase. *Molecular Pharmacology*, 59(3), 646-654. <https://doi.org/10.1124/MOL.59.3.646>
- Wei, J., Liao, J., & Bairey-Merz, C. (2021). Challenging Statin Pleiotropy: Preeclampsia. *Circulation*, 144, 680-683. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.121.056140>
- Wikström, A., Larsson, A., Eriksson, U., Nash, P., Nordén-Lindeberg, S., & Olovsson, M. (2007). Placental growth factor and soluble FMS-like tyrosine kinase-1 in early-onset and late-onset preeclampsia. *Obstetrics and Gynecology*, 109(6), 1368-1374. <https://doi.org/10.1097/01.AOG.0000264552.85436.A1>
- Wikström, A., Stephansson, O., & Cnattingius, S. (2010). Tobacco uses during pregnancy and preeclampsia risk: effects of cigarette smoking and snuff. *Hypertension (Dallas, Tex: 1979)*, 55(5), 1254-1259. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.147082>
- Williams, K., & Galerneau, F. (2002). The role of serum uric acid as a prognostic indicator of the severity of maternal and fetal complications in hypertensive pregnancies. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada: JOGC = Journal d'obstetrique et Gynecologie Du Canada: JOGC*, 24(8), 628-632. [https://doi.org/10.1016/S1701-2163\(16\)30193-1](https://doi.org/10.1016/S1701-2163(16)30193-1)
- Wischhusen, J., Melero, I., & Fridman, W. (2020). Growth/Differentiation Factor-15 (GDF-15): From Biomarker to Novel Targetable Immune Checkpoint. *Frontiers in Immunology*, 11, 951. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.00951/BIBTEX>
- Wolf, P. (1967). The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. *British Journal of Haematology*, 13(3), 269-288. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2141.1967.TB08741.X>
- Wollert, K., Kempf, T., & Wallentin, L. (2017). Growth Differentiation Factor 15 as a Biomarker in Cardiovascular Disease. *Clinical Chemistry*, 63(1), 140-151. <https://doi.org/10.1373/CLINCHEM.2016.255174>

- Wright, A., Wright, D., Ispas, C., Poon, L., & Nicolaides, K. (2015). Mean arterial pressure in the three trimesters of pregnancy: effects of maternal characteristics and medical history. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 45(6), 698-706. <https://doi.org/10.1002/UOG.14783>
- Wu, Y., Potempa, L., el Kebir, D., & Filep, J. (2015). C-reactive protein and inflammation: conformational changes affect function. *Biological Chemistry*, 396(11), 1181-1197. <https://doi.org/10.1515/HSZ-2015-0149>
- Xiao, J. P., Yin, Y., Gao, Y., Lau, S., Shen, F., Zhao, M., & Chen, Q. (2012). The increased maternal serum levels of IL-6 are associated with the severity and onset of preeclampsia. *Cytokine*, 60(3), 856-860. <https://doi.org/10.1016/J.CYTO.2012.07.039>
- Yáñez-Mó, M., Siljander, P., Andreu, Z., Zavec, A., Borràs, F., Buzas, E., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E., Cordeiro-Da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J., Ghobrial, I., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., ... de Wever, O. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell vesículas*. 2015 mayo 14;4. <https://doi.org/10.3402/JEV.V4.27066>
- Yang, Y., & Wu, N. (2022). Gestational Diabetes Mellitus and Preeclampsia: Correlation and Influencing Factors. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 0, 193. <https://doi.org/10.3389/FCVM.2022.831297>
- Yokoyama-Kobayashi, M., Saeki, M., Sekine, S., & Kato, S. (1997). Human cDNA encoding a novel TGF-beta superfamily protein highly expressed in placenta. *Journal of Biochemistry*, 122(3), 622-626. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.JBCHEM.A021798>
- Young, B., Levine, R., & Karumanchi, S. (2010). Pathogenesis of Preeclampsia. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 5(1), 173-192. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102149>
- Zaborowski, M., Balaj, L., Breakefield, X., & Lai, C. (2015). Editor's Choice: Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *Bioscience*, 65(8), 783. <https://doi.org/10.1093/BIOSCI/BIV084>
- Zeisler, H., Llurba, E., Chantraine, F., Vatish, M., Staff, A., Sennström, M., Olovsson, M., Brennecke, S., Stepan, H., Allegranza, D., Dilba, P., Schoedl, M., Hund, M., & Verlohren, S. (2016). Predictive Value of the sFlt-1:PlGF Ratio in Women with Suspected Preeclampsia. *New England Journal of Medicine*, 374(1), 13-22. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1414838>
- Zhang, Y., Zhao, C., Wei, Y., Yang, S., Cui, C., Yang, J., Zhang, J., & Qiao, R. (2018). Increased circulating microparticles in women with preeclampsia. *International Journal of Laboratory Hematology*, 40(3), 352-358. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12796>

8 Anexos

I. Dictamen favorable del Comité de Ética de Investigación con Medicamentos del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca



DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS

D. Antonio Piñero Madrona, Presidente del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del **Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca**.

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la siguiente propuesta de la **modificación sustancial**, subestudio **ENDOSTATIN**, del ensayo clínico:

Título: Estudio controlado aleatorizado con Pravastatina versus placebo para la prevención de preeclampsia (estudio STATIN)

Código Promotor: FFIS/2016/02/ST **Nº EUDRACT:** 2016-005206-19

Promotor: Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia

Versión Protocolo Evaluada: 1.0 03/01/2017

Versión Hoja Información al Paciente Evaluada: CRIBADO / 2.1 25/05/2018
GENERAL / 3.1 25/05/2018

Y considera que:

El CEIm del **Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca** en su reunión del 29/10/2018, tras la evaluación de la siguiente modificación sustancial:

Modificación sustancial: Subestudio **ENDOSTATIN**

Documentos: Protocolo subestudio 2.1 22/10/2018
Hoja de Información al Paciente 2.1 22/10/2018

emite un **DICTAMEN FAVORABLE** y acepta que se realice por la **Dra. Catalina De Paco Matallana** en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca.

Que este Comité ha realizado la evaluación de la modificación sustancial de la solicitud de autorización del ensayo, de acuerdo con lo previsto en el Real Decreto 1090/2015 y en el capítulo III del reglamento (UE) 536/2014.

Que el CEIm del **Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca** tanto en su composición como en sus procedimientos, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con la legislación vigente que regula su funcionamiento, y que la composición del CEIm del **Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca** es la indicada en el anexo I, teniendo en cuenta que en el caso de que algún miembro participe en el ensayo o declare algún conflicto de interés no habrá participado en la evaluación ni en el dictamen de la solicitud de autorización del ensayo clínico.

Lo que firmo en Murcia, a 29 de octubre de 2018

Fdo:

Dr. D. Antonio Piñero Madrona



II. Propuesta favorable de la Comisión para la Realización de Trabajos de Investigación en el Área I de Salud a la Dirección Gerencia del Área



PROPUESTA DE AUTORIZACIÓN PARA LA REALIZACIÓN DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN EN EL ÁREA I DE SALUD

189

<p>Solicitante: JEAN MICHEL SANTOYO GARCIA</p> <p>DNI: 49971015L</p> <p>Denominación del Trabajo: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PRAVASTATINA SOBRE LA FUNCION ENDOTELIAL VASCULAR EN MUJERES CON ALTO RIESGO DE PEECLAMPسيا TARDIA</p> <p>Tipo de trabajo (TFG, TFM, Tesis, etc.): TESIS DOCTORAL</p> <p>Servicio de desarrollo: ANALISIS CLINICOS</p> <p>Tutor en el centro: ISBEL HERNANDEZ GARCIA</p> <p>Fechas de realización: 2018</p>

Analizada la solicitud y documentación presentada por el/la solicitante para la realización del trabajo de investigación arriba referido, reunida la **COMISIÓN PARA LA EVALUACIÓN DE TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN DEL ÁREA I DE SALUD** se propone a la Dirección Gerencia del Área su **AUTORIZACIÓN**.

El/la solicitante deberá ajustarse a las Instrucciones aprobadas por la Dirección Gerencia del Área, debiendo remitir, una vez finalizado el mismo una copia del mismo a la Comisión para su archivo.

Fechado y firmado digitalmente al margen

10/12/2015 15:51:56

Imprimir - BARRA ALBERTO, ABEL

Comentarios - COBILANCA, HERNANDEZ, JOSÉ GUARDINO



Esta es una copia auténtica imprimible de un documento electrónico administrativo archivado por la Comunidad Autónoma de Murcia, según artículo 37.3.c) de la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser confirmada accediendo a la siguiente dirección: <http://sede.carm.es/verificacoinformacion> (Código de verificación: 03972876404847848274818724555)

III. Informe favorable de la Comisión de Ética de Investigación de la Universidad de Murcia

UNIVERSIDAD DE MURCIA
 Vicecomisión de Investigación y Transferencia

CEI Comisión de Ética de Investigación

CAMPUS MARE NOSTRUM

INFORME DE LA COMISIÓN DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

Jaime Peris Riera, Catedrático de Universidad y Secretario de la Comisión de Ética de Investigación de la Universidad de Murcia,

CERTIFICA:

Que D. Jean Michell Santoyo García ha presentado la memoria de trabajo de la Tesis Doctoral titulada "*Efecto del tratamiento con pravastatina sobre la función endotelial vascular en mujeres con alto riesgo de preeclampsia tardía*", dirigida por D.ª Isabel Hernández García y D. José Antonio Noguera Velasco, a la Comisión de Ética de Investigación de la Universidad de Murcia.

Que dicha Comisión analizó toda la documentación presentada, y de conformidad con lo acordado el día trece de febrero de dos mil diecinueve¹, por unanimidad, se emite INFORME FAVORABLE, desde el punto de vista ético de la investigación.

Y para que conste y tenga los efectos que correspondan firmo esta certificación con el visto bueno del Presidente de la Comisión.

Vº Bº
 EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

Fdo.: Francisco Esquembre Martínez

ID: 2219/2018

¹A los efectos de lo establecido en el art. 19.5 de la Ley 40/2015 de 1 de octubre de Régimen Jurídico del Sector Público (B.O.E. 02-10), se advierte que el acta de la sesión citada está pendiente de aprobación



Código seguro de verificación: RUxPMkc2-aptifo+8-3EtFbc9U-r+EAxmXW

COPIA ELECTRÓNICA - Página 1 de 1

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento administrativo electrónico archivado por la Universidad de Murcia, según el artículo 27.1 c) de la Ley 39/2016, de 2 de octubre. Su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: <https://sede.um.es/validador/>

IV. Informe favorable del Comité de Bioseguridad en Experimentación de la Universidad de Murcia

UNIVERSIDAD DE MURCIA
Vicerrectorado de Investigación y Transferencia

CBE Comité de Bioseguridad en Experimentación

cm 27 31
CAMPUS MARE NOSTRUM

INFORME DEL COMITÉ DE BIOSEGURIDAD EN EXPERIMENTACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

Lucía Periago García, Jefa de Sección de Recursos Humanos de la Investigación y del Plan Propio y en funciones de Secretaria del Comité de Bioseguridad en Experimentación de la Universidad de Murcia

CERTIFICA:

Que D. Jean Michell Santoyo García presentó la memoria de trabajo de su Tesis Doctoral titulada *"Efecto del tratamiento con pravastatina sobre la función endotelial vascular en mujeres con alto riesgo de preeclampsia tardía"*, dirigida por D.ª Isabel Hernández García y D. José Antonio Noguera Velasco, al Comité de Bioseguridad en Experimentación.

Que dicho Comité analizó toda la documentación presentada, y de conformidad con lo acordado el día catorce de febrero de dos mil diecinueve, por unanimidad, se emite INFORME FAVORABLE, desde el punto de vista ético de la bioseguridad en la investigación.

Y para que conste y tenga los efectos que correspondan, firmo esta certificación, con el visto bueno del Presidente de la Comisión.

Vº Bº
EL PRESIDENTE DEL COMITÉ
DE BIOSEGURIDAD EN EXPERIMENTACIÓN
DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

Fdo.: Francisco Esquembre Martínez

ID: CBE 180/2018



Código seguro de verificación: RUXFMort-BFDVayxP-DhId/gCV-ShqxgoEZ

COPIA ELECTRÓNICA - Página 1 de 1

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento administrativo electrónico archivado por la Universidad de Murcia, según el artículo 27.3 c) de la Ley 39/2016, de 1 de octubre. Su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: <https://sede.um.es/validador/>

V. Consentimiento informado firmado por los participantes del estudio



Subestudio ENDOSTATIN, versión 2.1. Fecha 22-10-2018

HOJA DE INFORMACIÓN A LA PERSONA PARTICIPANTE

Título del subestudio: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PRAVASTATINA SOBRE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL VASCULAR EN MUJERES CON ALTO RIESGO DE PREECLAMPSIA TARDÍA

Estimada Sra.:

Le invitamos a participar en un estudio de investigación porque es usted:

- una gestante sana o,
- una gestante con riesgo de preeclampsia que va a participar en el ensayo clínico STATIN

Objetivos y finalidad

La salud cardiovascular depende en parte de la función del endotelio vascular, que se ve afectado en distintas patologías la preeclampsia. La alteración de la función endotelial se produce en ocasiones en etapas precoces del desarrollo de la enfermedad vascular, por lo que puede servir de marcador precoz en pacientes de riesgo. Por ello en este estudio se pretende la evaluación de la función endotelial en mujeres gestantes sanas y con riesgo de preeclampsia mediante la medida del flujo sanguíneo cutáneo mediante una técnica láser y marcadores bioquímicos

El conocimiento generado con la realización de este proyecto de investigación permitirá el avance en la comprensión de los mecanismos moleculares y bioquímicos que participan en la preeclampsia y por tanto el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas encaminadas a reducir la morbilidad y mortalidad asociada. Asimismo ayudará a identificar a las madres con elevado riesgo de padecer la enfermedad, permitiendo el desarrollo de estrategias preventivas específicas, precoces y, en consecuencia, más eficaces. Con este proyecto de investigación esperamos poder mejorar el diagnóstico y la comprensión de la fisiopatología de la preeclampsia tardía.

Datos referentes al participante. Informar sobre lo siguiente:

¿Por qué le hemos invitado?

El motivo de dicha invitación es que usted es una **gestante sana** o con riesgo de preeclampsia que va a participar en el ensayo clínico STATIN, lo que puede servir para determinar la relación de posibles alteraciones de la función endotelial y la enfermedad, así como el efecto de la administración de pravastatina.

¿Qué pasa si participo en el estudio?

Si es usted una gestante sana formará parte del grupo control del estudio ENDOSTATIN.

- Obtendremos una muestra de sangre para el estudio de marcadores de función endotelial en plasma, que será almacenada en el Biobanc-Mur hasta su utilización, y que una vez acabado el estudio será destruida.

ENDOSTATIN

UNIVERSIDAD DE
MURCIA



IMIB
ARRIXACA

- Le determinaremos la respuesta de flujo capilar de la piel que aumentarán localmente tras una reducción del flujo sanguíneo humeral durante 3 minutos.

Si es usted una gestante con alto riesgo de preeclampsia que está formando parte de los grupos placebo o tratamiento del estudio STATIN, podrá participar en el subestudio ENDOSTATIN, lo que no supondrá intervención alguna que pueda modificar o interferir en el desarrollo o los resultados del estudio STATIN, ya que se ajustará en lugar y tiempo con las visitas programadas para dicho estudio.

- Analizaremos distintos marcadores bioquímicos en muestras de sangre obtenidas, previa solicitud al Biobanco de la Región de Murcia, de alícuotas almacenadas procedentes del estudio STATIN.
- Le determinaremos la respuesta de flujo capilar de la piel que aumentará localmente tras una reducción del flujo sanguíneo humeral durante 3 minutos.

Después de un registro durante 60 segundos del flujo sanguíneo tisular basal, se procede de una compresión de la arteria humeral mediante la insuflación del manguito de presión arterial 30 mmHg por encima de la presión arterial sistólica, determinada previamente en el brazo contralateral. A los 3 minutos de registro isquemia (flujo=0), se libera el manguito y se registra el cambio de flujo sanguíneo tras reperusión durante 3 minutos, para el posterior análisis del área de la curva.

¿Cuáles son las posibles desventajas o beneficios si forma parte del estudio?

No hay desventajas o riesgos al formar parte de este estudio, a excepción de los derivados de la interrupción transitoria del flujo sanguíneo en el antebrazo (ligera sensación de hormigueo) y la punción venosa para la obtención de sangre.

Medidas de Seguridad. Este equipo y protocolo se ha utilizado previamente en pacientes gestantes para determinación de la función endotelial, sin que haya presentado ninguna reacción adversa. No obstante se tomarán las siguientes precauciones. El manejo del equipo y la medida de función endotelial se realizará por personal cualificado y entrenado para ello, participante en el proyecto de investigación, siguiendo las recomendaciones del manual del propio sistema Perilont Micropharmacology System. No se realizará la prueba a sujetos sensibles al contacto con sistemas eléctricos.

¿Qué pasa si hay algún problema?

Ante cualquier queja que tenga al respecto, los responsables del estudio serán debidamente informados. Cualquier duda que tenga respecto a este estudio, pregunte a los médicos responsables del mismo.

¿Será confidencial la participación en el estudio?

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en el Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento europeo y del Consejo de 27 de abril de 2016 de Protección de Datos

ENDOSTATINUNIVERSIDAD DE
MURCIA


IMIB
ARRIXACA

(RGPD). De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual debe dirigirse a los médicos responsables del estudio.

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y sólo los médicos responsables y colaboradores podrán relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo excepciones, en caso de urgencia médica o requerimiento legal.

Sólo se transmitirán a terceros y a otros países los datos recogidos para el estudio que en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente, como nombre y apellidos, iniciales, dirección, nº de la seguridad social, etc. En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito y garantizando la confidencialidad como mínimo con el nivel de protección de la legislación vigente en nuestro país.

¿Qué pasará con los resultados del estudio?

Tras el análisis de toda la información, sacaremos conclusiones que serán publicadas en revistas científicas. Sus datos personales no serán identificados en ningún caso.

¿Quién organiza este estudio?

El estudio será dirigido por Departamento Obstetricia y Ginecología (HCUVA) y de Fisiología Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia.

¿Quién ha revisado el estudio?

Este proyecto ha sido revisado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de la Arrixaca.

Datos de los investigadores

Ante cualquier duda o renuncia que pueda surgir en relación con su participación en la presente investigación, pueden dirigirse a la persona responsable de la misma, cuyos datos son los siguientes:

- Nombre: Catalina de Paco Matallana
- Cargo: FEA
- Dirección de contacto: Departamento de Obstetricia y Ginecología. Unidad de Medicina Materno fetal, HCUVA
- Correo electrónico: Katy.depaco@gmail.com

En consecuencia, le solicitamos que firme y entregue la hoja de consentimiento informado que se adjunta.

Firmado: En nombre del equipo investigador,

ENDOSTATINUNIVERSIDAD DE
MURCIAIMIB
ARRIXACA

Consentimiento Informado. ENDOSTATIN, V 2.1. Fecha: 22-10-2018
Estudio vinculado al estudio STATIN.

Efecto de la pravastatina en mujeres con alto riesgo de preeclampsia sobre la función endotelial y los marcadores de inflamación, estrés oxidativo y microvesículas extracelulares circulantes.

CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO DE FUNCIÓN ENDOTELIAL VINCULADO AL STATIN

Confirmando que he leído y entendido la Hoja de Información al Paciente del Subestudio ENDOSTATIN (Versión 1.0 Fecha 15 de Julio de 2018) para el estudio arriba reseñado y he tenido la oportunidad de preguntar mis dudas con una respuesta satisfactoria a todas ellas.

He sido identificado como de alto o bajo riesgo para desarrollar preeclampsia y estoy de acuerdo en participar en el estudio de evaluación de la función endotelial.

Nombre de la paciente Firma..... Fecha.....

Investigador..... Firma..... Fecha.....

Testigo..... Firma..... Fecha.....

VI. Características técnicas de los ensayos utilizados para el estudio

Ensayo	Principio o método	Muestras	Estabilidad a -20 °C	Unidad de medida	Límite de detección	Intervalo de medición	CV intra-ensayo (%)	CV inter-ensayo (%)
CATS	Colorimétrico	Suero, plasma	>3 meses	mmol/L	0,1	0 - 2,5	1,2	2,4
HCIS	Inmunonefelométrico	Suero, plasma	>3 meses	μmol/L	2	2,0 - 64,0	4,5	7,3
AU	Enzimático colorimétrico	Suero, plasma	>3 meses	mg/dL	0,2	0,20 - 25	1,1	1,8
IL-6	Electroquimioluminiscencia	Suero, plasma	>3 meses	pg/mL	1,5	1,5 - 5000	1,4	2,7
GDF-15	Electroquimioluminiscencia	Suero, plasma	>3 meses	μg/mL	400	400 - 20000	0,9	1,8
PCR	Turbidimétrico	Suero, plasma	>3 meses	mg/dL	0,1	0,2 - 20	0,9	3,5
PIGF	TRACE	Suero, plasma	>3 meses	pg/mL	3,6	3,6 - 7000	3,1	6,6
sFlt-1	TRACE	Suero, plasma	>3 meses	pg/mL	22	22 - 90000	0,8	3,7
MVs	Citometría de flujo	Plasma	< 1 año	mvs/μL	1	1 - 100000	4,0	5,0
ADMA	ELISA de competición	Suero, plasma	>3 meses	ng/mL	24,7	24,7 - 2000	5,0	5,0
Colesterol total	Enzimático colorimétrico	Suero, plasma	>3 meses	mg/dL	3,87	3,87 - 800	0,5	1,9
Triglicéridos	Enzimático colorimétrico	Suero, plasma	>3 meses	mg/dL	8,85	8,85 - 885	1,6	1,9
HDL-colesterol	Enzimático colorimétrico	Suero, plasma	>3 meses	mg/dL	3,09	3,09 - 150	1,0	1,5
ApoB	Inmunonefelométrico	Suero, plasma	>3 meses	mg/dL	25	400	1,9	3,6
ApoAI	Inmunonefelométrico	Suero, plasma	>3 meses	mg/dL	5	5 - 600	2,3	2,7
LpA	Inmunonefelométrico	Suero, plasma	1 mes	mg/dL	0,2	2,5 - 160	1,8	3,5

Nota. CV, coeficiente de variación; CATS, capacidad antioxidante total del suero; HCIS, homocisteína; AU, ácido úrico; IL-6, interleuquina 6; GDF-15, factor de diferenciación del crecimiento 15; PCR, proteína C reactiva; PIGF, factor de crecimiento placentario; sFlt-1, forma soluble de la tirosina quinasa tipo 1 similar al FMS; MVs, microvesículas; ADMA, dimetil arginina asimétrica; ApoB, apolipoproteína B; ApoAI, apolipoproteína AI; LpA, lipoproteína A; TRACE, Emisión Amplificada de Criptato Resuelta en el Tiempo.

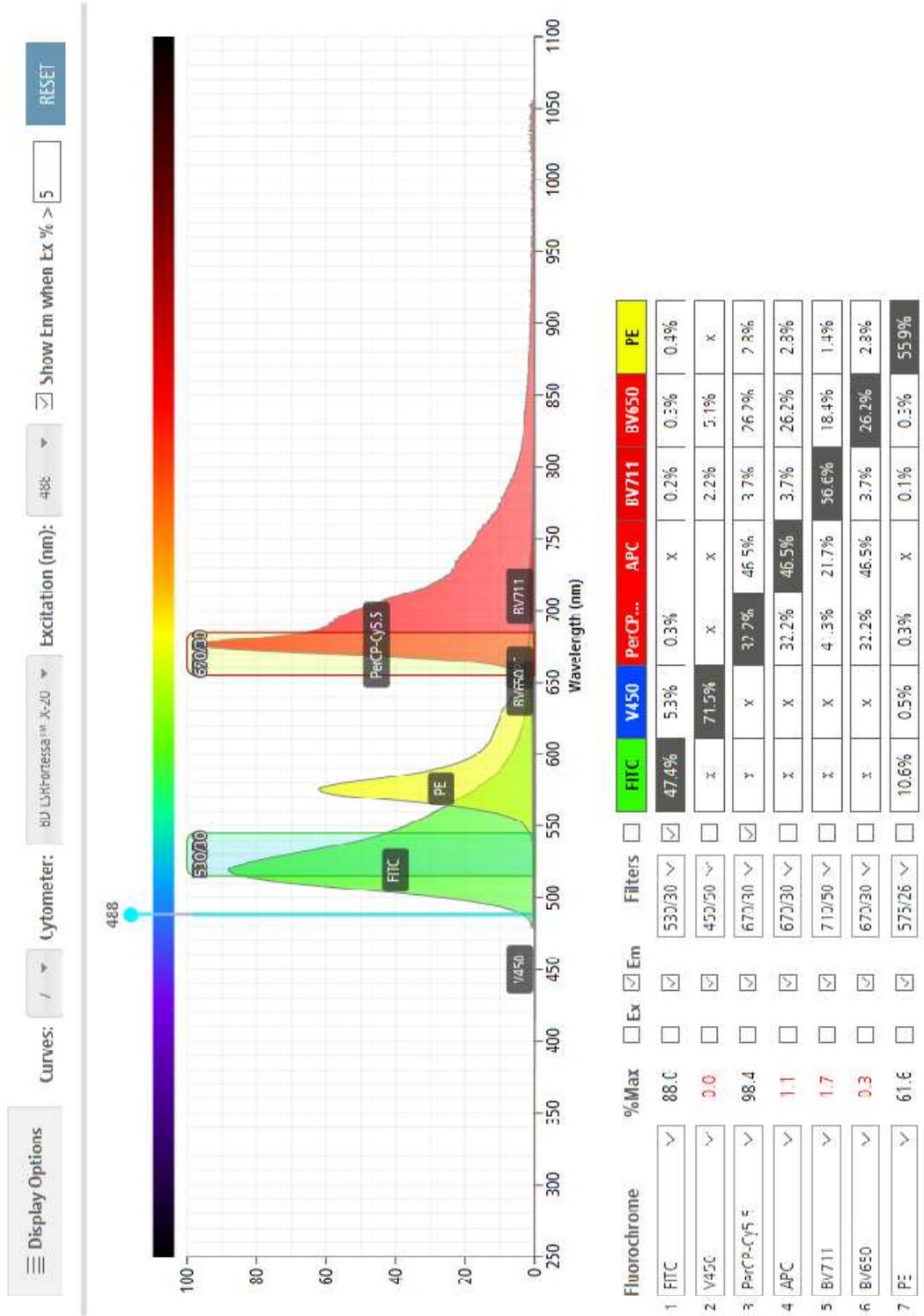
VII. Valores de normalidad de los biomarcadores analizados en el estudio

Biomarcador	Unidad de medida	Rango de normalidad
CATS	mmol/L	1,33 - 1,77*
HCIS	μmol/L	3,2 - 21,4*
AU	mg/dL	3,1 - 6,3*
IL-6	pg/mL	< 7 [§]
GDF-15	μg/mL	36,0 - 66,1 [§]
PCR	mg/dL	< 0,8*
PIGF	pg/mL	41 - 752 [§]
sFLT-1	pg/mL	1023 - 8492 [§]
MVs	mvs/μL	-
ADMA	ng/mL	-
Colesterol total	mg/dL	219 - 349*
Triglicéridos	mg/dL	131 - 453*
Colesterol HDL	mg/dL	48 - 87*
Colesterol LDL	mg/dL	101 - 224*
ApoB	mg/dL	85 - 238*
ApoAI	mg/dL	145 - 262*
LpA	mg/dL	1 - 30*

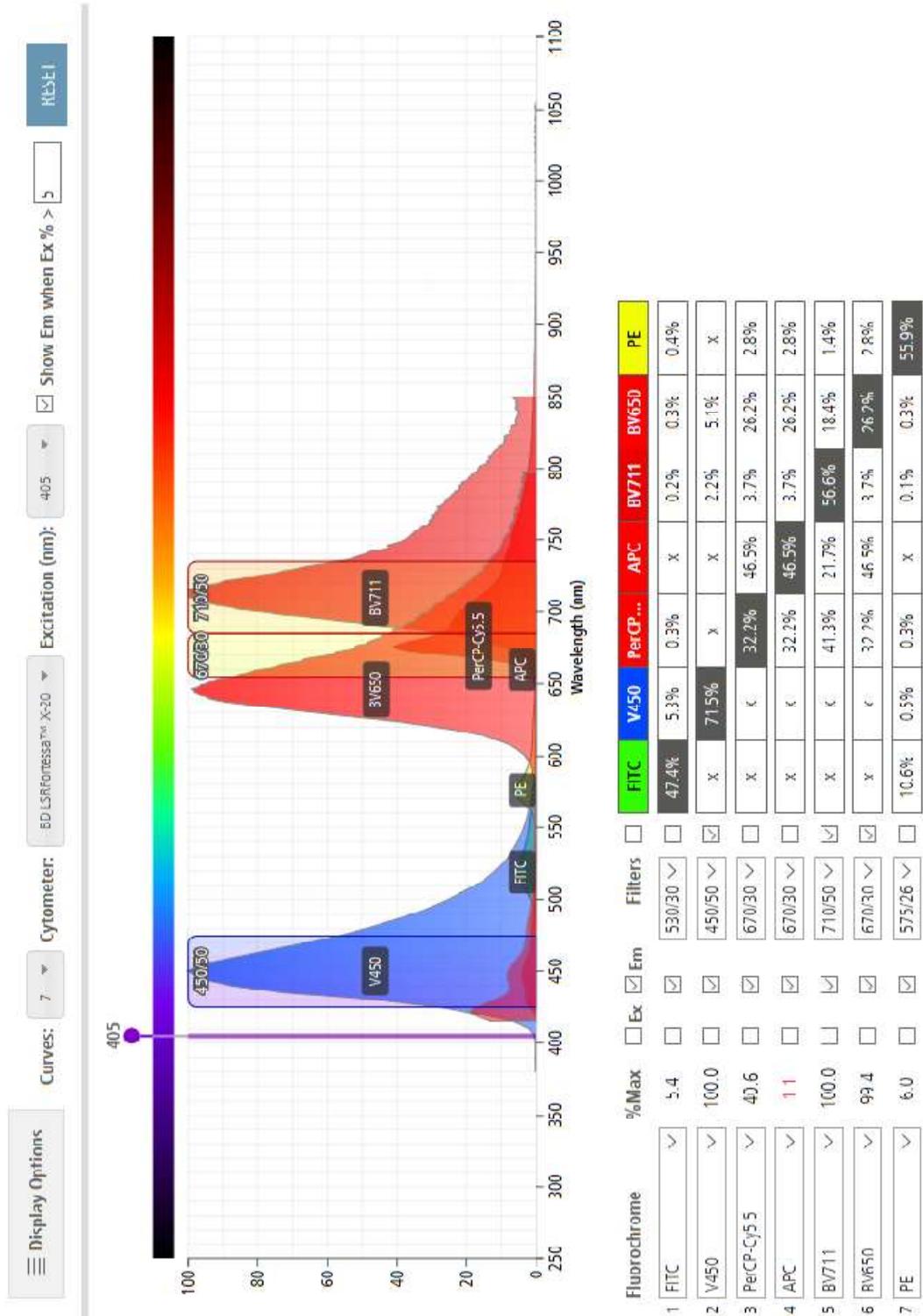
Nota. CATS, capacidad antioxidante total del suero; HCIS, homocisteína; AU, ácido úrico; IL-6, interleuquina 6; GDF-15, factor de diferenciación del crecimiento 15; PCR, proteína C reactiva; PIGF, factor de crecimiento placentario; sFlt-1, forma soluble de la tirosina quinasa tipo 1 similar al FMS; MVs, microvesículas; ADMA, dimetil arginina asimétrica; ApoB, apolipoproteína B; ApoAI, apolipoproteína AI; LpA, lipoproteína A. Fuentes: (*) Abbassi-Ghanavati et al., 2009; (§) Documentación del fabricante; y (-) no definido.

VIII. Curvas de emisión de los fluorocromos del panel

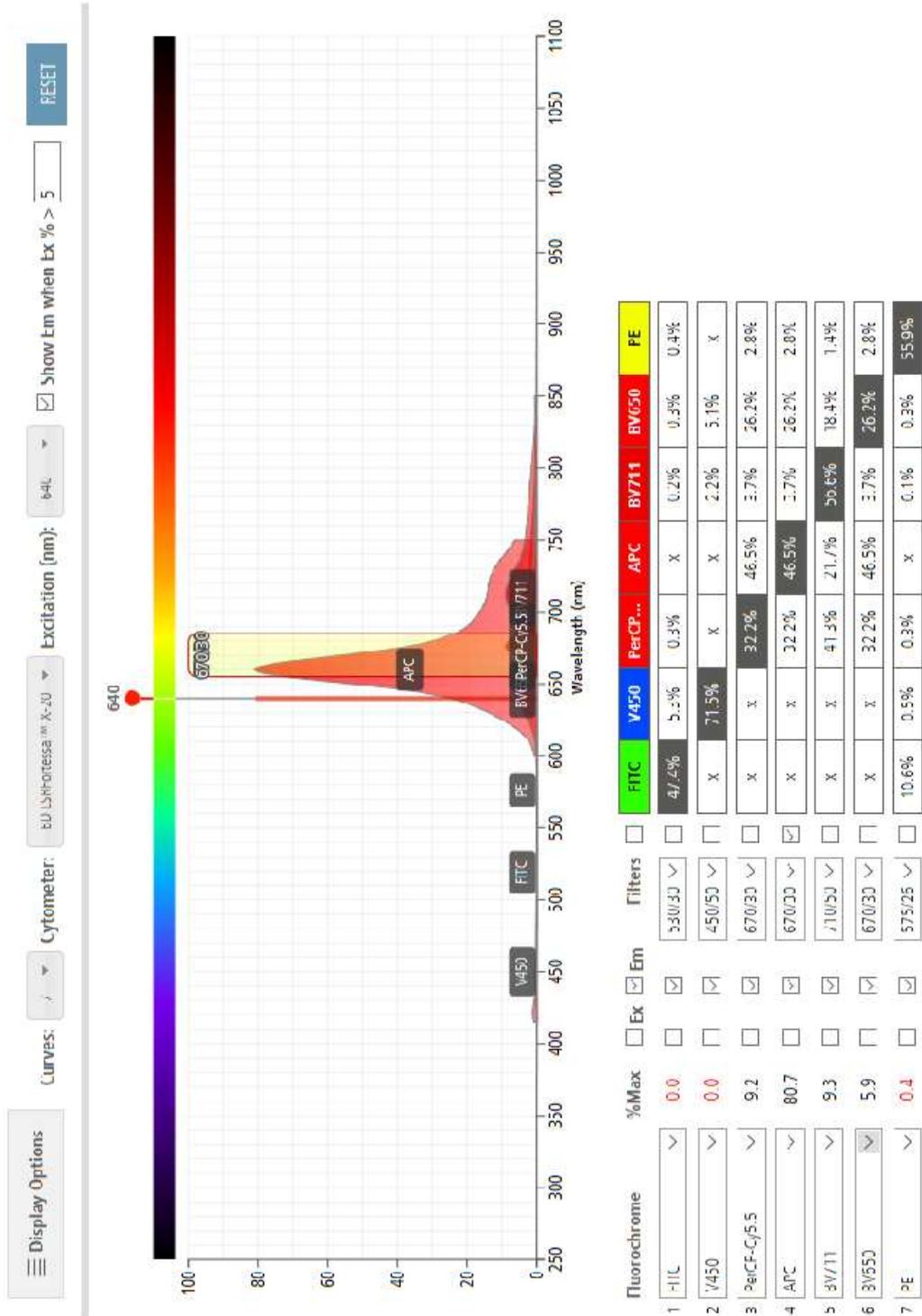
Spectrum Viewer



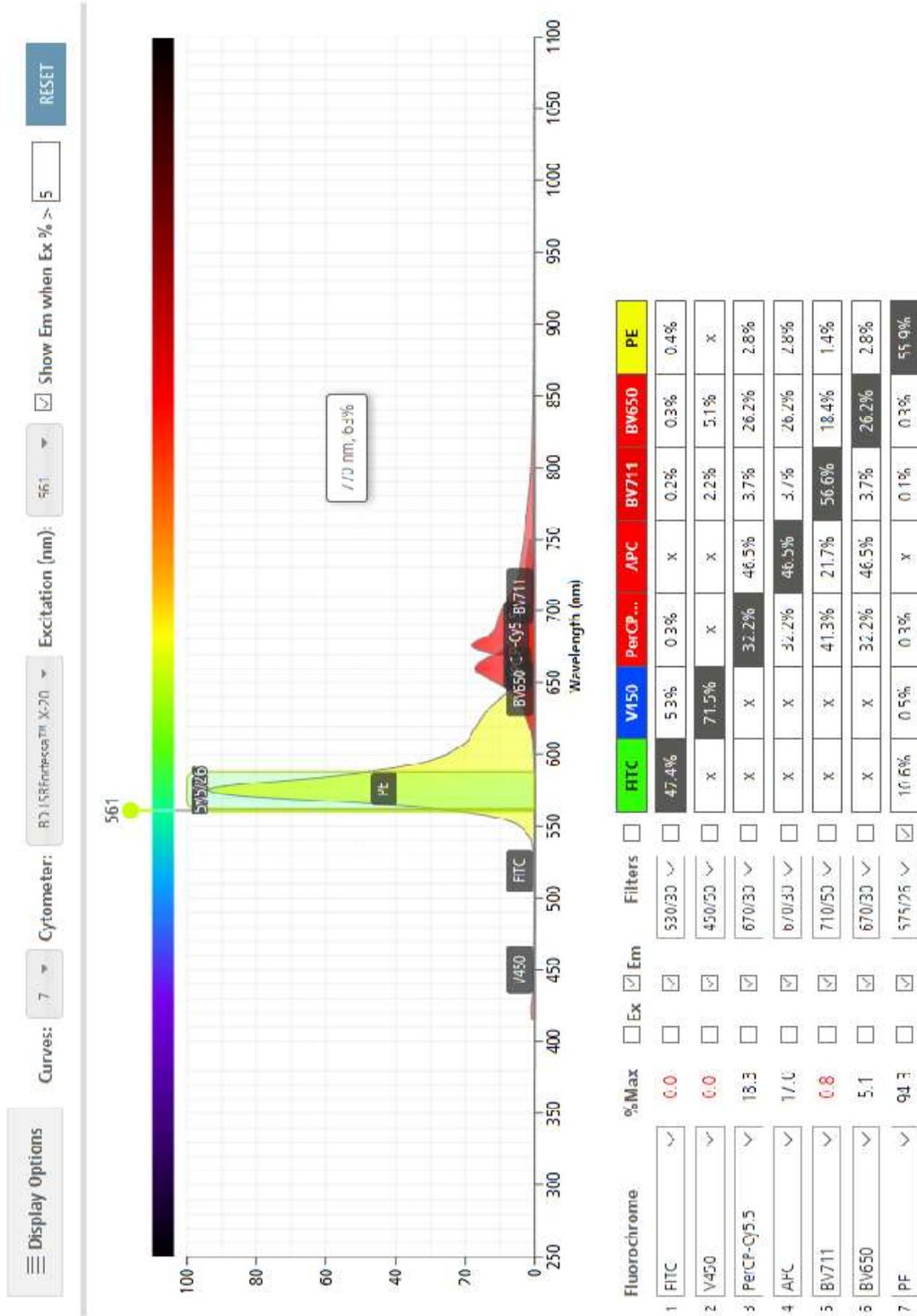
Spectrum Viewer



Spectrum Viewer



Spectrum Viewer



IX. Tablas de resultados

Tabla A.1

Biomarcadores medidos en los grupos con bajo y alto riesgo de PE a término

Biomarcador	Bajo riesgo (n=57)	Alto riesgo (n=68)	Significación estadística (p)
<i>Estrés oxidativo</i>			
CATS (mmol/L)	1,72 [1,64 - 1,88]	1,59 [1,53 - 1,66]	<0,001
HCIS (μmol/L)	5,3 [4,7 - 5,9]	6,3 [5,7 - 7,17]	<0,001
AU (mg/dL)	3,7 [3,25 - 4,1]	4,6 [4 - 5,1]	<0,001
<i>Inflamación</i>			
IL-6 (pg/mL)	1,5 [1,5 - 2,36]	4,2 [2,95 - 5,15]	<0,001
GDF-15 (μg/mL)	79,7 [64,7 - 117,6]	114,2 [75,1 - 159,8]	0,001
PCR (mg/dL)	0,47 [0,25 - 0,76]	0,48 [0,27 - 0,70]	0,923
<i>Angiogénesis</i>			
PIGF (pg/mL)	354,7 [165,5 - 546,3]	91 [57,2 - 146,6]	<0,001
PIGF MoM	1,05 [0,60 - 1,73]	0,34 [0,24 - 0,60]	<0,001
sFlt-1 (pg/mL)	2090 [1489 - 2689]	5011 [3683,2 - 6478,7]	<0,001
sFlt-1 (MoM)	1,03 [0,71 - 1,36]	2,09 [1,64 - 2,88]	<0,001
Relación sFlt-1/PIGF	5,6 [3,6 - 14]	57,1 [32,97 - 90,27]	<0,001
<i>Función endotelial</i>			
MVs-tot (mvs/μL)	2108 [1382 - 3017]	2153 [1471 - 3026]	0,641
MVs-pla (mvs/μL)	1685 [1017 - 2374]	1283 [839 - 1813]	0,053
MVs-leu (mvs/μL)	30 [14 - 71]	89 [47 - 159]	<0,001
MVs-mon (mvs/μL)	4 [2 - 15]	12 [8 - 18]	<0,001
MVs-end (mvs/μL)	6 [3 - 14]	10 [8 - 17]	0,001
MVs-ena (mvs/μL)	2 [1 - 4]	8 [4 - 11]	<0,001
MVs-sct (mvs/μL)	4 [2 - 6]	9 [6 - 14]	<0,001
ADMA (ng/mL)	657 [537 - 991]	786 [502 - 1497]	0,049
<i>Dislipemia</i>			
Colesterol total (mg/dL)	250 [217,5 - 280,5]	246 [209,2 - 273,7]	0,511
Triglicéridos (mg/dL)	246 [189,5 - 292]	256,5 [225 - 300,7]	0,159
Colesterol-HDL (mg/dL)	76 [63,5 - 82,5]	68 [58 - 77,5]	0,058
Colesterol-no-HDL (mg/dL)	180 [146,5 - 203,5]	172 [143,2 - 200,7]	0,779
Colesterol-LDL (mg/dL)	127 [102 - 151]	123 [92,5 - 148,5]	0,573
ApoB (mg/dL)	133 [115 - 153]	127,5 [113,7 - 156]	0,957
ApoAI (mg/dL)	224 [205 - 246,5]	216,5 [202,2 - 231]	0,140
Relación ApoB/ApoAI	0,61 [0,52 - 0,69]	0,59 [0,52 - 0,73]	0,730
LpA (mg/dL)	13,5 [4,7 - 27,45]	13,3 [7,5 - 31,5]	0,753

Nota. Los datos están expresados como mediana [rango intercuartílico]. Nota. CATS, capacidad antioxidante total del suero; HCIS, homocisteína; AU, ácido úrico; IL-6, Interleuquina 6; GDF-15, factor de diferenciación del crecimiento 15; PCR, proteína C reactiva; PIGF, factor de crecimiento placentario; MoM, múltiplos de la mediana; sFlt-1, forma soluble de la tirosina quinasa tipo 1 similar al FMS; MVs-tot, total de MVs anexina V+; MVs-pla, MVs de plaquetas; MVs-leu, MVs leucocitarias; MVs-mon, MVs de monocitos; MVs-end, MVs de células endoteliales; MVs-ena, MVs de células endoteliales activadas; MVs-sct, MVs de sincitiotrofoblasto; ADMA, dimetil arginina asimétrica; ApoB, apolipoproteína B; ApoAI, apolipoproteína AI; LpA, lipoproteína A.

Tabla A.2*Características demográficas y clínicas basales de los subgrupos del ensayo clínico*

Característica	Placebo (n=35)	Pravastatina (n=33)	Significación estadística (p)
<i>Datos demográficos y epidemiológicos</i>			
Edad (años)	33,2 ± 6,3	32,4 ± 6,5	0,572
Peso (kg)	76,5 [70 - 85,4]	75 [70,2 - 84,9]	0,965
Estatura (m)	161 [157 - 164]	160 [157 - 167]	0,693
IMC (kg/m ²)	30,2 ± 4,8	29,9 ± 4,6	0,632
Raza blanca	34 (97,7)	32 (97)	0,739
Hábito de fumar	5 (14,3)	0	0,031
Nuliparidad	22 (62,9)	25 (75,8)	0,187
Historia familiar de PE	3 (8,6)	5 (15,2)	0,321
<i>Comorbilidades:</i>			
Lupus eritematoso sistémico	0	0	-
Síndrome antifosfolípido	1 (2,9)	0	0,515
Diabetes mellitus	1 (2,9)	0	0,515
Hipertensión arterial crónica	1 (2,9)	1 (3)	0,739
<i>Datos clínicos del embarazo</i>			
Conseguido por reproducción asistida	3 (8,6)	9 (25,7)	0,590
Edad gestacional (semanas)	35,4 [35,3 - 35,7]	35,6 [35,3 - 35,7]	0,453
Riesgo de PE (1 en)	9 (6 - 14)	11 (5 - 15)	0,863
Presión arterial media (mmHg)	95,3 [91 - 100,7]	96,2 [91 - 99,8]	0,897
Presión arterial media (MoM)	1,07 ± 0,08	1,07 ± 0,07	0,883
Consumo de aspirina en dosis bajas	13 (37,1)	8 (24,2)	0,187
IP de la arteria uterina	0,73 [0,61 - 0,9]	0,69 [0,6 - 0,8]	0,238
IP de la arteria uterina (MoM)	1,04 [0,85 - 1,3]	0,96 [0,84 - 1,13]	0,256
Desarrollo de PE	4 (11,4)	3 (9,1)	0,753
Diabetes mellitus gestacional	5 (14,3)	3 (9,1)	0,753
Hipertensión inducida por el embarazo	7 (20)	4 (12,1)	0,381
<i>Resultados del embarazo</i>			
Trabajo de parto			
Espontáneo	14 (40)	16 (48,5)	0,485
Inducido	19 (54,3)	15 (45,5)	0,470
Sin trabajo	2 (5,7)	2 (6,1)	0,952
Forma de parto			
Vaginal	13 (37,1)	17 (51,5)	0,236
Cesárea	14 (40)	7 (21,2)	0,096
Instrumental	8 (22,9)	9 (27,3)	0,677
Edad gestacional al parto (semanas)	39,7 [39,1 - 40,4]	39,9 [38,9 - 40,5]	0,749
Peso al nacer (g)	3200 [2760 - 3555]	3230 [3012 - 3473]	0,722

Nota. Los datos están expresados como media ± desviación estándar, mediana [rango intercuartílico] o número (porcentaje). IMC, índice de masa corporal; MoM, múltiplos de la mediana; IP, índice de pulsatilidad.

Tabla A.3
Biomarcadores basales de los subgrupos del ensayo clínico

Biomarcador	Placebo (n=35)	Pravastatina (n=33)	Significación estadística (p)
<i>Estrés oxidativo</i>			
CATS (mmol/L)	1,59 [1,55 - 1,66]	1,58 [1,53 - 1,66]	0,645
HCIS (μmol/L)	6,45 [5,67 - 7,22]	6,2 [5,7 - 6,9]	0,511
AU (mg/dL)	4,5 [4 - 5,1]	4,7 [4 - 5,3]	0,893
<i>Inflamación</i>			
IL-6 (pg/mL)	3,94 [2,65 - 4,85]	4,35 [3,04 - 5,57]	0,273
GDF-15 (μg/mL)	105,4 [74,7 - 151,2]	122,9 [77,6 - 182,8]	0,480
PCR (mg/dL)	0,42 [0,26 - 0,70]	0,51 [0,27 - 0,73]	0,548
<i>Angiogénesis</i>			
PIGF (pg/mL)	94,7 [55,9 - 125,7]	91 [61,2 - 155,7]	0,754
PIGF MoM	0,35 [0,23 - 0,52]	0,33 [0,25 - 0,7]	0,488
sFlt-1 (pg/mL)	5119 [3541,7 - 6027,5]	4899 [3693,5 - 6516,5]	0,956
sFlt-1 (MoM)	2,08 [1,63 - 3,06]	2,11 [1,68 - 2,75]	0,936
Relación sFlt-1/PLGF	55,5 [31,87 - 95,37]	59 [33,9 - 81,15]	0,976
<i>Función endotelial</i>			
MVs-tot (mvs/μL)	2048 [1425 - 3022]	2153 [1586 - 3649]	0,498
MVs-pla (mvs/μL)	1230 [849 - 1727]	1328 [805 - 1834]	0,729
MVs-leu (mvs/μL)	92 [57 - 141]	83 [41 - 189]	0,724
MVs-mon (mvs/μL)	10 [8 - 18]	13 [10 - 17]	0,165
MVs-end (mvs/μL)	10 [7 - 13]	13 [8 - 17]	0,202
MVs-ena (mvs/μL)	7 [4 - 10]	9 [5 - 12]	0,135
MVs-sct (mvs/μL)	9 [6 - 14]	9 [6 - 15]	0,795
ADMA (ng/mL)	764 [434 - 1631]	958 [598 - 1474]	0,529
<i>Dislipemia</i>			
Colesterol total (mg/dL)	245 [200 - 245]	245 [214 - 278]	0,602
Triglicéridos (mg/dL)	268 [234 - 320,2]	254 [205 - 289]	0,202
Colesterol-HDL (mg/dL)	66 [57,5 - 76,5]	68 [62 - 79]	0,527
Colesterol-no-HDL (mg/dL)	168 [141,2 - 193,5]	172 [147 - 209]	0,672
Colesterol-LDL (mg/dL)	120,5 [86 - 145]	122 [97 - 148]	0,733
ApoB (mg/dL)	131 [109 - 147,7]	125 [117 - 162]	0,830
ApoAI (mg/dL)	219,5 [2,3 - 231,5]	213 [201 - 235]	0,704
Relación ApoB/ApoAI	0,58 [0,51 - 0,58]	0,59 [0,52 - 0,76]	0,663
LpA (mg/dL)	10,5 [7,4 - 31,6]	17,9 [7,6 - 32,7]	0,432

Nota. Los datos están expresados como mediana [rango intercuartílico]. Nota. CATS, capacidad antioxidante total del suero; HCIS, homocisteína; AU, ácido úrico; IL-6, Interleuquina 6; GDF-15, factor de diferenciación del crecimiento 15; PCR, proteína C reactiva; PIGF, factor de crecimiento placentario; MoM, múltiplos de la mediana; sFlt-1, forma soluble de la tirosina quinasa tipo 1 similar al FMS; MVs-tot, total de MVs anexina V+; MVs-pla, MVs de plaquetas; MVs-leu, MVs leucocitarias; MVs-mon, MVs de monocitos; MVs-end, MVs de células endoteliales; MVs-ena, MVs de células endoteliales activadas; MVs-sct, MVs de sincitiotrofoblasto; ADMA, dimetil arginina asimétrica; ApoB, apolipoproteína B; ApoAI, apolipoproteína AI; LpA, lipoproteína A.

Tabla A.4*Biomarcadores pareados medidos en el subgrupo que recibió placebo*

Biomarcador	Placebo visita pre-intervención (n=35)	placebo visita post-intervención (n=35)	Significación estadística (p)
<i>Estrés oxidativo</i>			
CATS (mmol/L)	1,59 [1,55 - 1,66]	1,63 [1,6 - 1,69]	<0,001
HCIS (μmol/L)	6,45 [5,67 - 7,22]	6,4 [5,6 - 7,7]	0,081
AU (mg/dL)	4,5 [4 - 5,1]	4,9 [4,3 - 5,9]	<0,001
<i>Inflamación</i>			
IL-6 (pg/mL)	3,94 [2,65 - 4,85]	4,47 [3,5 - 5,58]	0,052
GDF-15 (μg/mL)	105,4 [74,7 - 151,2]	107,2 [77,1 - 165]	0,400
PCR (mg/dL)	0,42 [0,26 - 0,70]	0,45 [0,21 - 0,84]	0,461
<i>Angiogénesis</i>			
PIGF (pg/mL)	94,7 [55,9 - 125,7]	60,28 [48,35 - 88,7]	<0,001
PIGF MoM	0,35 [0,23 - 0,52]	0,36 [0,19 - 0,56]	0,050
sFlt-1 (pg/mL)	5119 [3541,7 - 6027,5]	6934 [4849 - 9249]	<0,001
sFlt-1 (MoM)	2,08 [1,63 - 3,06]	2,49 [1,71 - 3,07]	0,249
Relación sFlt-1/PLGF	55,5 [31,87 - 95,37]	102,2 [74 - 188,1]	<0,001
<i>Función endotelial</i>			
MVs-tot (mvs/μL)	2048 [1425 - 3022]	2931 [2076 - 3749]	0,008
MVs-pla (mvs/μL)	1230 [849 - 1727]	1655 [1172 - 2276]	0,005
MVs-leu (mvs/μL)	92 [57 - 141]	123 [89 - 178]	0,005
MVs-mon (mvs/μL)	10 [8 - 18]	16 [9 - 29]	0,004
MVs-end (mvs/μL)	10 [7 - 13]	14 [10 - 24]	<0,001
MVs-ena (mvs/μL)	7 [4 - 10]	9 [5 - 14]	0,018
MVs-sct (mvs/μL)	9 [6 - 14]	11 [6 - 15]	0,024
ADMA (ng/mL)	764 [434 - 1631]	418 [345 - 1610]	0,155
<i>Dislipemia</i>			
Colesterol total (mg/dL)	245 [200 - 245]	233 [203 - 264]	0,321
Triglicéridos (mg/dL)	268 [234 - 320,2]	290 [242 - 355]	0,014
Colesterol-HDL (mg/dL)	66 [57,5 - 76,5]	63 [58 - 76]	0,085
Colesterol-no-HDL (mg/dL)	168 [141,2 - 193,5]	163 [141 - 194]	0,600
Colesterol-LDL (mg/dL)	120,5 [86 - 145]	-	-
ApoB (mg/dL)	131 [109 - 147,7]	125 [110 - 150]	0,231
ApoAI (mg/dL)	219,5 [2,3 - 231,5]	218 [204 - 234]	0,527
Relación ApoB/ApoAI	0,58 [0,51 - 0,58]	0,6 [0,48 - 0,7]	0,165
LpA (mg/dL)	10,5 [7,4 - 31,6]	9,9 [5,6 - 24,5]	0,001

Nota. Los datos están expresados como mediana [rango intercuartílico]. Nota. CATS, capacidad antioxidante total del suero; HCIS, homocisteína; AU, ácido úrico; IL-6, Interleuquina 6; GDF-15, factor de diferenciación del crecimiento 15; PCR, proteína C reactiva; PIGF, factor de crecimiento placentario; MoM, múltiplos de la mediana; sFlt-1, forma soluble de la tirosina quinasa tipo 1 similar al FMS; MVs-tot, total de MVs anexina V+; MVs-pla, MVs de plaquetas; MVs-leu, MVs leucocitarias; MVs-mon, MVs de monocitos; MVs-end, MVs de células endoteliales; MVs-ena, MVs de células endoteliales activadas; MVs-sct, MVs de sincitiotrofoblasto; ADMA, dimetil arginina asimétrica; ApoB, apolipoproteína B; ApoAI, apolipoproteína AI; LpA, lipoproteína A.

Tabla A.5

Biomarcadores pareados medidos en el subgrupo que recibió pravastatina

Biomarcador	Pravastatina visita pre-intervención (n=33)	Pravastatina post-intervención (n=33)	Significación estadística (p)
<i>Estrés oxidativo</i>			
CATS (mmol/L)	1,58 [1,53 - 1,66]	1,62 [1,54 - 1,66]	0,064
HCIS (μmol/L)	6,2 [5,7 - 6,9]	6,3 [5,65 - 7,3]	0,610
AU (mg/dL)	4,7 [4 - 5,3]	4,9 [4,2 - 5,75]	0,011
<i>Inflamación</i>			
IL-6 (pg/mL)	4,35 [3,04 - 5,57]	4,88 [3,61 - 5,87]	0,299
GDF-15 (μg/mL)	122,9 [77,6 - 182,8]	110,8 [82,3 - 184,2]	0,288
PCR (mg/dL)	0,51 [0,27 - 0,73]	0,37 [0,25 - 0,78]	0,092
<i>Angiogénesis</i>			
PIGF (pg/mL)	91 [61,2 - 155,7]	59,8 [46,97 - 123,4]	0,043
PIGF MoM	0,33 [0,25 - 0,7]	0,34 [0,30 - 1,87]	0,176
sFlt-1 (pg/mL)	4899 [3693,5 - 6516,5]	7830 [5930 - 9289]	<0,001
sFlt-1 (MoM)	2,11 [1,68 - 2,75]	2,24 [0,99 - 2,74]	0,866
Relación sFlt-1/PIGF	59 [33,9 - 81,15]	116,5 [62,6 - 180,5]	<0,001
<i>Función endotelial</i>			
MVs-tot (mvs/μL)	2153 [1586 - 3649]	1637 [1010 - 2290]	<0,001
MVs-pla (mvs/μL)	1328 [805 - 1834]	761 [487 - 1387]	<0,001
MVs-leu (mvs/μL)	83 [41 - 189]	62 [24 - 114]	<0,001
MVs-mon (mvs/μL)	13 [10 - 17]	5 [3 - 9]	<0,001
MVs-end (mvs/μL)	13 [8 - 17]	4 [3 - 7]	<0,001
MVs-ena (mvs/μL)	9 [5 - 12]	4 [2 - 5]	<0,001
MVs-sct (mvs/μL)	9 [6 - 15]	5 [3 - 8]	<0,001
ADMA (ng/mL)	958 [598 - 1474]	676 [452 - 1323]	0,112
<i>Marcadores de dislipemia</i>			
Colesterol total (mg/dL)	245 [214 - 278]	220 [187 - 251]	<0,001
Triglicéridos (mg/dL)	254 [205 - 289]	234 [188 - 283]	0,317
Colesterol-HDL (mg/dL)	68 [62 - 79]	71 [57 - 80]	0,465
Colesterol-no-HDL (mg/dL)	172 [147 - 209]	151 [115 - 184,5]	<0,001
Colesterol-LDL (mg/dL)	122 [97 - 148]	99 [71 - 126,5]	<0,001
ApoB (mg/dL)	125 [117 - 162]	117 [95,5 - 135,5]	<0,001
ApoAI (mg/dL)	213 [201 - 235]	222 [192,5 - 240,5]	0,844
Relación ApoB/ApoAI	0,59 [0,52 - 0,76]	0,52 [0,43 - 0,68]	<0,001
LpA (mg/dL)	16,9 [7,6 - 32,7]	13,5 [5,8 - 31,5]	0,061

Nota. Los datos están expresados como mediana [rango intercuartílico]. Nota. CATS, capacidad antioxidante total del suero; HCIS, homocisteína; AU, ácido úrico; IL-6, Interleuquina 6; GDF-15, factor de diferenciación del crecimiento 15; PCR, proteína C reactiva; PIGF, factor de crecimiento placentario; MoM, múltiplos de la mediana; sFlt-1, forma soluble de la tirosina quinasa tipo 1 similar al FMS; MVs-tot, total de MVs anexina V+; MVs-pla, MVs de plaquetas; MVs-leu, MVs leucocitarias; MVs-mon, MVs de monocitos; MVs-end, MVs de células endoteliales; MVs-ena, MVs de células endoteliales activadas; MVs-sct, MVs de sincitiotrofoblasto; ADMA, dimetil arginina asimétrica; ApoB, apolipoproteína B; ApoAI, apolipoproteína AI; LpA, lipoproteína A.