



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

**Biomarcadores Predictores de preeclampsia en  
Gestantes con Factores de Riesgo**

**D<sup>a</sup>. Ana Martínez Ruiz**

**2013**



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular (B) e Inmunología*



**TESIS DOCTORAL**

**BIOMARCADORES PREDICTORES DE PREECLAMPSIA EN  
GESTANTES CON FACTORES DE RIESGO**

Memoria para optar al grado de doctor

presentada por

**Ana Martínez Ruiz**

Bajo la dirección de los Doctores:

*Dr. Pedro Martínez Hernández*

*Dra. Isabel Tovar Zapata*

*Dra. M<sup>a</sup> Desamparados Sarabia Meseguer*

**Murcia, 2013**





UNIVERSIDAD DE MURCIA

Dr. PEDRO MARTÍNEZ HERNÁNDEZ, Jefe de Servicio del Laboratorio Clínico del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia y profesor Asociado al Departamento de BIOQUÍMICA y BIOLOGÍA MOLECULAR B E INMUNOLOGÍA de la Universidad de Murcia, autoriza:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "**BIOMARCADORES PREDICTORES DE PREECLAMPSIA EN GESTANTES CON FACTORES DE RIESGO**", realizada por D<sup>a</sup> ANA MARTÍNEZ RUIZ, bajo mi dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 4 de Febrero de 2013

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Pedro Martínez Hernández', with a long horizontal stroke underneath.





UNIVERSIDAD DE MURCIA

Dra. ISABEL TOVAR ZAPATA, facultativo especialista en Análisis Clínicos en el HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LA ARRIXACA, autoriza:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "**Biomarcadores predictores de preeclampsia en gestantes con factores de riesgo**", realizada por D<sup>a</sup> ANA MARTÍNEZ RUIZ, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

  
En Murcia, a 4 de Febrero de 2013







UNIVERSIDAD DE MURCIA

Dra. M<sup>a</sup> Desamparados Sarabia Meseguer, facultativo especialista en Análisis Clínicos en el HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LA ARRIXACA, autoriza:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "**Biomarcadores predictores de preeclampsia en gestantes con factores de riesgo**", realizada por D<sup>a</sup> ANA MARTÍNEZ RUIZ, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 4 de Febrero de 2013

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized initial 'A' followed by a surname.



*A mis padres*

*A mi hermana*

*A Joaquín*

*Las tres referencias fundamentales en mi vida*



## ***AGRADECIMIENTOS***

A mis directores de tesis: Pedro Martínez, Isabel Tovar y Amparo Sarabia, sin vosotros este proyecto no hubiera sido posible. Gracias por vuestra ayuda, dedicación y confianza que me han permitido desarrollarme profesionalmente.

A todos los integrantes del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Virgen de la Arrixaca, y en especial al Laboratorio de Hormonas por haber participado de algún modo en la elaboración de esta tesis.

A la Unidad de Medicina Fetal del Hospital Virgen de la Arrixaca por su colaboración en este proyecto.

A mis *murcianicos*, gracias por estos cinco años irrepetibles llenos de grandes momentos. Nunca los olvidaré.

A mis malagueñas, gracias por todos estos años de amistad, para que duren otros tantos, y porque hacéis de Málaga la ciudad a la que siempre quiero regresar.

A mi hermana Elena, mi mejor amiga, gracias por poder contar contigo y saber que siempre estarás ahí.

A Migue y Carlota, por todo lo que nos queda por compartir juntos.

A mis padres, por vuestro cariño y confianza durante todos estos años, sin olvidar los *homenajes de los domingos* en familia.

A mi abuela Catalina, siempre presente en los momentos importantes de mi vida.

Al resto de mi familia, M<sup>a</sup> Angeles, Joaquín, Ana, M<sup>a</sup> Angeles y Paco, por aceptarme como una más entre vosotros.

A mi futuro marido Joaquín, mi mejor amigo, gracias por tu apoyo incondicional, por los buenos momentos que hemos compartido y los que quedan por venir.

*A todos, gracias*



## ***INDICE***

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ABREVIATURAS</b>   | <b>I</b>  |
| <b>LISTA DE TABLAS</b>  | <b>V</b>  |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b>   | <b>IX</b> |
| <b>I. INTRODUCCIÓN</b>  | <b>1</b>  |
| I.1 La preeclampsia como trastorno hipertensivo del embarazo          | 3         |
| I.2 Definición e incidencia   | 4         |
| I.3 Etiología y factores de riesgo                                    | 5         |
| I.4 Diagnóstico   | 9         |
| I.5 Fisiopatología de la preeclampsia                                 | 11        |
| I.5.1 Establecimiento de una deficiente circulación placentaria       | 11        |
| I.5.2 Establecimiento de una respuesta sistémica materna              | 17        |
| I.6 Aspectos genéticos en la preeclampsia                             | 19        |
| I.7 Hipótesis unificada de la fisiopatología de la preeclampsia       | 20        |
| I.8 Prevención de la preeclampsia                                     | 23        |
| I.9 Factores predictores de preeclampsia                              | 23        |
| I.9.1 Estudio Doppler de las resistencias en las arterias uterinas    | 24        |
| I.9.2 Marcadores propuestos como posibles predictores de preeclampsia | 25        |
| I.9.2.1 Forma soluble de la tirosín kinasa 1 (sFlt-1)                 | 26        |
| I.9.2.2 Factor de crecimiento placentario (PIGF)                      | 26        |
| I.9.2.3 Proteína plasmática A asociada al embarazo (PAPP-A)           | 27        |

|             |   |           |
|-------------|---|-----------|
| I.9.2.4     | Ácido úrico   | 27        |
| I.9.2.5     | Triglicéridos   | 28        |
| I.9.2.6     | Antígeno sérico CA125   | 28        |
| I.9.2.7     | Enzima convertidora de angiotensina   | 29        |
| I.9.3       | Polimorfismo genético de la ECA y su asociación con la preeclampsia                       | 29        |
| I.9.4       | Polimorfismo genético de la Apolipoproteína E (Apo E) y su asociación con la preeclampsia | 30        |
| I.9.5       | Otros marcadores de interés   | 31        |
| I.9.5.1     | Endoglina soluble (sEng)  | 31        |
| I.9.5.2     | Inhibina A  | 31        |
| I.9.5.3     | Proteína placentaria 13 (PP13)  | 31        |
| <b>II.</b>  | <b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>  | <b>33</b> |
| <b>III.</b> | <b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>   | <b>37</b> |
| III.1       | Diseño del estudio  | 39        |
| III.2       | Sujetos   | 40        |
| III.2.1     | Criterios de inclusión  | 40        |
| III.2.2     | Criterios de exclusión  | 41        |
| III.2.3     | Grupos de estudio   | 41        |
| III.3       | Método  | 43        |
| III.3.1     | Parámetros de estudio   | 43        |
| III.3.1.1   | Parámetros de laboratorio   | 43        |
| III.3.1.2   | Variables clínicas  | 44        |



|  |           |
|--|-----------|
| III.3.2 Recogida y procesamiento de las muestras   | 44        |
| III.3.3 Análisis estadístico   | 59        |
| III.3.4 Confidencialidad del estudio   | 60        |
| <b>IV. RESULTADOS</b>  | <b>61</b> |
| IV.1 Estudio descriptivo   | 63        |
| IV.1.1 Características generales de la población de riesgo   | 63        |
| IV.1.1 Características de los distintos grupos de estudio  | 64        |
| IV.1.3 Descriptivo del grupo con preeclampsia  | 67        |
| IV.2 Comparativa de las características maternas de los distintos grupos de estudio                          | 69        |
| IV.3 Estudio Doppler de las arterias uterinas  | 74        |
| IV.4 Estudio analítico   | 79        |
| IV.4.1 Comparación de marcadores de variables cuantitativas  | 79        |
| IV.4.1.1 Primer trimestre de gestación   | 79        |
| IV.4.1.2 Segundo trimestre de gestación  | 88        |
| IV.4.2 Correlaciones bivariadas  | 96        |
| IV.4.2.1 Primer trimestre de gestación   | 96        |
| IV.4.2.2 Segundo trimestre de gestación  | 100       |
| IV.4.3 Influencia de los factores de riesgo sobre los marcadores propuestos como predictores de preeclampsia | 102       |
| IV.4.3.1 Primer trimestre de gestación   | 102       |
| IV.4.3.2 Segundo trimestre de gestación  | 104       |
| IV.4.4 Análisis univariante de los marcadores predictores de preeclampsia                                    | 105       |
| IV.4.4.1 Primer trimestre de gestación   | 105       |

|  |     |
|--|-----|
| IV.4.4.2 Segundo trimestre de gestación  | 108 |
| IV.5 Análisis multivariante  | 112 |
| IV.5.1 Combinación de marcadores para el cálculo del rendimiento diagnóstico   | 112 |
| IV.5.2 Regresión lineal múltiple   | 115 |
| IV.5.2.1 Primer trimestre de gestación   | 116 |
| IV.5.2.2 Segundo trimestre de gestación  | 120 |
| IV.5.3 Regresión logística   | 122 |
| IV.6 Estudio genético  | 123 |
| IV.6.1 Estudio genético de la ECA  | 123 |
| IV.6.2 Estudio genético de la Apo E  | 127 |
| IV.7 Comparación de los marcadores angiogénicos (sFlt-1 y PlGF) entre embarazos únicos y múltiples en el primer y segundo trimestre de gestación | 128 |
| IV.7.1 Primer trimestre de gestación   | 128 |
| IV.7.2 Segundo trimestre de gestación  | 131 |
| <b>V. DISCUSIÓN</b>  | 133 |
| V.1 Primer trimestre de gestación  | 136 |
| V.1.1 Estudio de los marcadores predictores de PE en el primer trimestre de gestación  | 136 |
| V.1.2 Estudio de correlaciones y análisis de la influencia de los factores de riesgo en el primer trimestre de gestación                         | 140 |
| V.1.3 Análisis del rendimiento diagnóstico de los marcadores predictores de PE en el primer trimestre de gestación                               | 142 |
| V.2 Segundo trimestre de gestación   | 143 |
| V.2.1 Estudio de los marcadores predictores de PE en el segundo trimestre de gestación   | 143 |

|   |     |
|---|-----|
| V.1.2 Estudio de correlaciones y análisis de la influencia de los factores de riesgo en el segundo trimestre de gestación                       | 146 |
| V.1.3 Análisis del rendimiento diagnóstico de los marcadores predictores de PE en el segundo trimestre de gestación                             | 147 |
| V.3 Combinación de marcadores para la predicción de la PE   | 148 |
| V.4 Estudio genético de la ECA y de la Apo E  | 148 |
| V.5 Comparación de los marcadores angiogénicos (sFlt-1 y PlGF) entre embarazos únicos y múltiples en el primer y segundo trimestre de gestación | 150 |
| V.6 Aproximación al establecimiento de un test de cribado para la PE  | 151 |
| V.7 Limitaciones del estudio  | 152 |
| V.8 Conflicto de intereses  | 152 |
| <b>VI. CONCLUSIONES</b>   | 153 |
| <b>VII. ANEXOS</b>  | 157 |
| <b>VIII. REFERENCIAS</b>  | 163 |



## ***ABREVIATURAS***

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| <b><math>\beta</math>hCG</b>   | Subunidad $\beta$ de la gonadotropina coriónica humana |
| <b>ABC</b>                     | Área bajo la curva                                     |
| <b>ADN</b>                     | Ácido desoxirribonucleico                              |
| <b>Apo B</b>                   | Apolipoproteína B                                      |
| <b>Apo E</b>                   | Apolipoproteína E                                      |
| <b>ATI</b>                     | Receptor I de la angiotensina II                       |
| <b>CA125</b>                   | Antígeno sérico CA125                                  |
| <b>CIR</b>                     | Crecimiento intrauterino restringido                   |
| <b>D</b>                       | Delección  |
| <b>dNTP's</b>                  | Desoxinucleótidos trifosfato                           |
| <b>ECA</b>                     | Enzima convertidora de angiotensina                    |
| <b>eNOS</b>                    | Óxido nítrico sintasa endotelial                       |
| <b>E</b>                       | Especificidad  |
| <b>ECLIA</b>                   | Electroquimioluminiscencia                             |
| <b>EDTA</b>                    | Ácido etilendiaminotetracético                         |
| <b>F</b>                       | Foward   |
| <b>FIV</b>                     | Fecundación in vitro                                   |
| <b>Flt-1</b>                   | Receptor de la tirosín kinasa 1                        |
| <b>FRET</b>                    | Transferencia de energía de resonancia de Förster      |
| <b>GOT</b>                     | Aspartato aminotransferasa                             |
| <b>GPT</b>                     | Alanina aminotransferasa                               |
| <b>HIF-<math>\alpha</math></b> | Factor de transcripción inducido por la hipoxia        |
| <b>HTA</b>                     | Hipertensión arterial                                  |
| <b>I</b>                       | Inserción  |
| <b>IMC</b>                     | Índice de masa corporal                                |

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| <b>IMPT</b>                      | Inhibidores de metaloproteasas tisulares   |
| <b>IP</b>                        | Índice de pulsatilidad medio               |
| <b>IR</b>                        | Índice de resistencia medio                |
| <b>KIR</b>                       | Receptor inmunoglobulin killer             |
| <b>LDH</b>                       | Lactato deshidrogenasa                     |
| <b>LDL</b>                       | Lipoproteínas de baja densidad             |
| <b>MoM</b>                       | Múltiplo de la mediana                     |
| <b>NK</b>                        | Natural killer                             |
| <b>NO</b>                        | Óxido nítrico                              |
| <b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b> | Anión superóxido                           |
| <b>OR</b>                        | Odss ratio                                 |
| <b>OVF</b>                       | Onda de velocidad de flujo                 |
| <b>PA</b>                        | Presión arterial                           |
| <b>PAPP-A</b>                    | Proteína plasmática A asociada al embarazo |
| <b>PCR</b>                       | Reacción en cadena de la polimerasa        |
| <b>PE</b>                        | Preeclampsia                               |
| <b>PFE</b>                       | Peso fetal estimado                        |
| <b>PIGF</b>                      | Factor de crecimiento placentario          |
| <b>PP13</b>                      | Proteína placentaria 13                    |
| <b>R</b>                         | Reverse                                    |
| <b>ROC</b>                       | Curvas de rendimiento diagnóstico          |
| <b>RIC</b>                       | Rango intercuartílico                      |
| <b>sEng</b>                      | Endoglina soluble                          |
| <b>S</b>                         | Sensibilidad                               |
| <b>sFlt-1</b>                    | Forma soluble de la tirosín kinasa 1       |
| <b>TFP</b>                       | Tasa de falsos positivos                   |

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| <b>TGF-<math>\beta</math></b> | Factor de crecimiento transformante $\beta$ |
| <b>THE</b>                    | Trastornos hipertensos del embarazo         |
| <b>Tm</b>                     | Temperatura de fusión o melting             |
| <b>TNF<math>\alpha</math></b> | Factor de necrosis tumoral alfa             |
| <b>TPA</b>                    | Tripropilamina                              |
| <b>VEGF</b>                   | Factor de crecimiento endotelial vascular   |
| <b>VPN</b>                    | Valor predictivo negativo                   |
| <b>VPN</b>                    | Valor predictivo positivo                   |





## ***LISTA DE TABLAS***

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1. Clasificación de los THE  | 3  |
| Tabla 2. Clasificación de la PE  | 10 |
| Tabla 3. Principales genes candidatos estudiados en la PE  | 20 |
| Tabla 4. Características analíticas del ácido úrico y triglicéridos  | 46 |
| Tabla 5. Características analíticas de los marcadores determinados por electroquimioluminiscencia  | 48 |
| Tabla 6. Valores de PAPP-A calculados para cada semana de gestación  | 49 |
| Tabla 7. Características analíticas de la ECA  | 49 |
| Tabla 8. Componentes de la Reacción en cadena de la polimerasa   | 51 |
| Tabla 9. Reacción de secuenciación   | 53 |
| Tabla 10. Características de la PCR a tiempo real  | 55 |
| Tabla 11. Componentes de la PCR  | 56 |
| Tabla 12 Genotipo del codón 112 de la Apo E  | 57 |
| Tabla 13. . Genotipo del codón 158 de la Apo E   | 57 |
| Tabla 14. Resultados del análisis de las curvas Melting de la Apo E  | 59 |
| Tabla 15. Características maternas de la población de riesgo   | 63 |
| Tabla 16. Descriptivo de las características maternas del grupo 1  | 64 |
| Tabla 17. Descriptivo de las características maternas del grupo 2  | 65 |
| Tabla 18. Descriptivo de las características maternas del grupo 3  | 66 |
| Tabla19. Características de las ocho gestantes que han desarrollado PE durante el estudio  | 68 |
| Tabla 20. Características maternas de la población de riesgo total (grupo 1 y 2) y el grupo control (grupo 3) durante su inclusión en el estudio | 69 |
| Tabla 21. Características maternas de las gestantes de los tres grupos durante su inclusión en el estudio  | 70 |

|   |    |
|---|----|
| Tabla 22. Características maternas del grupo 1 y 2 durante su inclusión en el estudio   | 71 |
| Tabla 23. Características maternas del grupo 1 y 3 durante su inclusión en el estudio   | 72 |
| Tabla 24. Características maternas del grupo 1 y grupo 2 y 3 durante su inclusión en el estudio   | 73 |
| Tabla 25. Estudio Doppler de las arterias uterinas del grupo de riesgo y control  | 74 |
| Tabla 26. Estudio Doppler de las arterias uterinas de los tres grupos de estudio  | 74 |
| Tabla 27. Estudio Doppler de las arterias uterinas del grupo 1 y 2  | 76 |
| Tabla 28. Estudio Doppler de las arterias uterinas del grupo 1 y 3  | 77 |
| Tabla 29. Estudio Doppler de las arterias uterinas del grupo 1 y el grupo 2 y 3   | 78 |
| Tabla 30. Comparación de los parámetros bioquímicos clásicos y el parámetro hematológico en la población de riesgo y grupo control en el primer trimestre de gestación  | 80 |
| Tabla 31. Comparación de los parámetros bioquímicos clásicos y el parámetro hematológico en los tres grupos de estudio en el primer trimestre de gestación              | 80 |
| Tabla 32. Comparación de los marcadores propuestos como predictores de PE en la población de riesgo y grupo control en el primer trimestre de gestación                 | 81 |
| Tabla 33. Comparación de los marcadores propuestos como predictores de PE en los tres grupos de estudio en el primer trimestre de gestación                             | 83 |
| Tabla 34. Comparación de los marcadores propuestos como predictores de PE en el grupo 1 y 2 en el primer trimestre de gestación   | 85 |
| Tabla 35. Comparación de los marcadores propuestos como predictores de PE en el grupo 1 y 3 en el primer trimestre de gestación   | 86 |
| Tabla 36. Comparación de los marcadores propuestos como predictores de PE en el grupo 1 y grupo 2 y 3 en el primer trimestre de gestación                               | 87 |
| Tabla 37. Comparación de los parámetros bioquímicos clásicos y el parámetro hematológico en la población de riesgo y grupo control en el segundo trimestre de gestación | 88 |

|  |     |
|--|-----|
| Tabla 38. Comparación de los parámetros bioquímicos clásicos y el parámetro hematológico en los tres grupos de estudio en el segundo trimestre de gestación                                      | 89  |
| Tabla 39. Comparación de los marcadores propuestos como predictores de PE en la población de riesgo y grupo control en el segundo trimestre de gestación   | 90  |
| Tabla 40. Comparación de los marcadores propuestos como predictores de PE en los tres grupos de estudio en el segundo trimestre de gestación   | 91  |
| Tabla 41. Comparación de los marcadores propuestos como predictores de PE en el grupo 1 y 2 en el segundo trimestre de gestación   | 93  |
| Tabla 42. Comparación de los marcadores propuestos como predictores de PE en el grupo 1 y 3 en el segundo trimestre de gestación   | 94  |
| Tabla 43. Comparación de los marcadores propuestos como predictores de PE en el grupo 1 y grupo 2 y 3 en el segundo trimestre de gestación   | 95  |
| Tabla 44. Análisis de la eficacia diagnóstica de los marcadores predictores de PE en el grupo 1 y 2 en el primer trimestre de gestación  | 105 |
| Tabla 45. Análisis de la eficacia diagnóstica de los marcadores predictores de PE en el grupo 1 y el grupo 2 y 3 en el primer trimestre de gestación   | 107 |
| Tabla 46. Análisis de la eficacia diagnóstica del marcador predictor de PE en el grupo 1 y el 2 en el segundo trimestre de gestación   | 108 |
| Tabla 47. Análisis de la eficacia diagnóstica de los marcadores predictores de PE en el grupo 1 y el grupo 2 y 3 en el segundo trimestre de gestación  | 109 |
| Tabla 48. Análisis de la eficacia diagnóstica del estudio Doppler como predictor de PE en el grupo 1 y 2 en el segundo trimestre de gestación  | 110 |
| Tabla 49. Análisis de la eficacia diagnóstica del estudio Doppler como predictor de PE en el grupo 1 y el grupo 2 y 3 en el segundo trimestre de gestación                                       | 111 |
| Tabla 50. Análisis de la combinación de marcadores para el cálculo del rendimiento diagnóstico entre el grupo 1 y 2  | 113 |
| Tabla 51. Análisis de la combinación de marcadores para el cálculo del rendimiento diagnóstico entre el grupo 1 y el grupo 2 y 3 con el punto de corte de PIGF del primer trimestre de gestación | 114 |

|   |     |
|---|-----|
| Tabla 52. Análisis de la combinación de marcadores para el cálculo del rendimiento diagnóstico entre el grupo 1 y el grupo 2 y 3 con el punto de corte de PIGF del segundo trimestre de gestación | 115 |
| Tabla 53. Regresión lineal múltiple de los principales factores de riesgo sobre el sFlt-1 en la población de riesgo en el primer trimestre de gestación   | 116 |
| Tabla 54. Regresión lineal múltiple de los principales factores de riesgo sobre el PIGF en la población de riesgo en el primer trimestre de gestación   | 117 |
| Tabla 55. Regresión lineal múltiple de los principales factores de riesgo sobre el ratio sFlt-1/PIGF en la población de riesgo en el primer trimestre de gestación                                | 118 |
| Tabla 56. Regresión lineal múltiple de los principales factores de riesgo sobre el MoM PAPP-A en la población de riesgo en el primer trimestre de gestación                                       | 119 |
| Tabla 57. Regresión lineal múltiple de los principales factores de riesgo sobre el sFlt-1 en la población de riesgo en el segundo trimestre de gestación  | 120 |
| Tabla 58. Regresión lineal múltiple de los principales factores de riesgo sobre el PIGF en la población de riesgo en el segundo trimestre de gestación  | 121 |
| Tabla 59. Regresión lineal logística aplicada sobre la población de riesgo  | 122 |
| Tabla 60. Genotipo de la ECA en el grupo con PE y grupo control   | 124 |
| Tabla 61. Frecuencia alélica del genotipo de la ECA en el grupo con PE y grupo control  | 125 |
| Tabla 62. Genotipo de la Apo E en el grupo con PE y grupo control   | 127 |
| Tabla 63. Características descriptivas del grupo de embarazo único y embarazo múltiple  | 128 |
| Tabla 64. Comparación de los marcadores angiogénicos en embarazo único y múltiple en el primer trimestre de gestación   | 129 |
| Tabla 65. Comparación de los marcadores angiogénicos en embarazo múltiple bicorial y múltiple monocorial en el primer trimestre de gestación  | 130 |
| Tabla 66. Comparación de los marcadores angiogénicos en embarazo único y múltiple en el segundo trimestre de gestación  | 131 |
| Tabla 67. Comparación de los marcadores angiogénicos en embarazo múltiple bicorial y múltiple monocorial en el segundo trimestre de gestación   | 133 |

## ***LISTA DE FIGURAS***

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Probabilidad de PE en función del IMC entre mujeres nulíparas y multíparas  | 7  |
| Figura 2. Esquema de la invasión trofoblástica  | 12 |
| Figura 3. Esquema de la placenta con su componente fetal y materno  | 13 |
| Figura 4. Factores que contribuyen al desarrollo de PE  | 15 |
| Figura 5. Esquema representativo del equilibrio normal entre factores angiogénicos circulantes, comparado con la disfunción endotelial inducida en PE | 18 |
| Figura 6. Esquema que ilustra la implicación de la L-Arginina en la preeclampsia  | 21 |
| Figura 7. Esquema que ilustra la hipótesis unificada de la fisiopatología de la PE  | 22 |
| Figura 8. Estudio Doppler de las arterias uterinas donde se muestra la persistencia del notch prodiastólico   | 25 |
| Figura 9. Esquema representativo del principio del test del ácido úrico   | 45 |
| Figura 10. Esquema representativo del principio del test de los triglicéridos   | 45 |
| Figura 11. Esquema representativo de la reacción electroquimioluminiscente  | 47 |
| Figura 12. Sistema automático de Promega (Maxwell 16 Blood DNA Purification Kit)  | 50 |
| Figura 13. A. Curva de absorbancia de una muestra de ADN. B. Nanodrop1000 (Termo)   | 50 |
| Figura 14. Cebadores utilizados en la Reacción en cadena de la polimerasa   | 51 |
| Figura 15. Cámara PowerShot A640 AiAF de Canon  | 52 |
| Figura 16. Proceso de secuenciación del ADN   | 53 |
| Figura 17. Analizador ABI 3130 (Applied Biosystems)   | 54 |
| Figura 18. Analizador Light-Cycler 2.0 (Roche Applied Science)  | 55 |
| Figura 19. Detección de fluorescencia según la situación de las sondas  | 57 |
| Figura 20. Curvas de Melting. Genotipo del codón 112 de la Apo E  | 58 |
| Figura 21. Curvas de Melting. Genotipo del codón 158 de la ApoE   | 58 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 22. Diagramas de cajas en el que se muestra la distribución del IP e IR en los tres grupos de estudio  | 75 |
| Figura 23. Diagrama de barras en el que se muestra la frecuencia de notch en los tres grupos de estudio   | 75 |
| Figura 24. Diagramas de cajas en el que se muestra la distribución del IP e IR en el grupo 1 y 2  | 76 |
| Figura 25. Diagramas de cajas en el que se muestra la distribución del IP e IR en el grupo 1 y 3  | 77 |
| Figura 26. Diagrama de barras en el que se muestra la frecuencia de notch en el grupo 1 y 3   | 77 |
| Figura 27. Diagramas de cajas en el que se muestra la distribución del IP e IR en el grupo 1 y el grupo 2 y 3   | 78 |
| Figura 28. Diagrama de barras en el que se muestra la frecuencia de notch en el grupo 1 y el grupo 2 y 3  | 79 |
| Figura 29. Diagramas de cajas en el que se muestra la distribución de los marcadores predictores de PE en el grupo de riesgo y grupo control en el primer trimestre de gestación  | 82 |
| Figura 30. Diagramas de cajas en el que se muestra la distribución de los marcadores predictores de PE en los tres grupos de estudio en el primer trimestre de gestación          | 84 |
| Figura 31. Diagramas de cajas en el que se muestra la distribución de los marcadores predictores de PE en el grupo 1 y 2 en el primer trimestre de gestación                      | 85 |
| Figura 32. Diagramas de cajas en el que se muestra la distribución de los marcadores predictores de PE en el grupo 1 y 3 en el primer trimestre de gestación                      | 87 |
| Figura 33. Diagramas de cajas en el que se muestra la distribución de los marcadores predictores de PE en el grupo 1 y grupo 2 y 3 en el primer trimestre de gestación            | 88 |
| Figura 34. Diagramas de cajas en el que se muestra la distribución de los marcadores predictores de PE en el grupo de riesgo y grupo control en el segundo trimestre de gestación | 91 |

|   |     |
|---|-----|
| Figura 35. Diagramas de cajas en el que se muestra la distribución de los marcadores predictores de PE en los tres grupos de estudio en el segundo trimestre de gestación   | 92  |
| Figura 36. Diagramas de cajas en el que se muestra la distribución del marcador predictores de PE en el grupo 1 y 2 en el segundo trimestre de gestación  | 93  |
| Figura 37. Diagramas de cajas en el que se muestra la distribución de los marcadores predictores de PE en el grupo 1 y 3 en el segundo trimestre de gestación   | 95  |
| Figura 38. Diagramas de cajas en el que se muestra la distribución de los marcadores predictores de PE en el grupo 1 y grupo 2 y 3 en el segundo trimestre de gestación   | 96  |
| Figura 39. Diagrama de dispersión que representa las relaciones de linealidad entre los diferentes marcadores que resultan estadísticamente significativas en el primer trimestre de gestación en la población de riesgo                        | 97  |
| Figura 40. Diagrama de dispersión que representa las relaciones de linealidad entre los diferentes marcadores que resultan estadísticamente significativas en el primer trimestre de gestación en el grupo con PE                               | 98  |
| Figura 41. Diagrama de dispersión que representa las relaciones de linealidad que resultan estadísticamente significativas entre los factores de riesgo y los marcadores propuestos como predictores de PE en el primer trimestre de gestación  | 99  |
| Figura 42. Diagrama de dispersión que representa las relaciones de linealidad entre los diferentes marcadores que resultan estadísticamente significativas en el segundo trimestre de gestación en la población de riesgo                       | 100 |
| Figura 43. Diagrama de dispersión que representa las relaciones de linealidad entre los diferentes marcadores que resultan estadísticamente significativas en el segundo trimestre de gestación en el grupo con PE                              | 101 |
| Figura 44. Diagrama de dispersión que representa las relaciones de linealidad que resultan estadísticamente significativas entre los factores de riesgo y los marcadores propuestos como predictores de PE en el segundo trimestre de gestación | 102 |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 45. Diagramas de cajas en el que se muestra la distribución de los marcadores propuestos como predictores de PE y los factores de riesgo en el primer trimestre de gestación  | 103 |
| Figura 46. Diagramas de cajas en el que se muestra la distribución de los marcadores propuestos como predictores de PE y los factores de riesgo en el segundo trimestre de gestación | 104 |
| Figura 47. Curvas ROC de los marcadores predictores de PE entre el grupo 1 y 2 en el primer trimestre de gestación   | 106 |
| Figura 48. Curvas ROC de los marcadores predictores de PE entre el grupo 1 y el grupo 2 y 3 en el primer trimestre de gestación  | 107 |
| Figura 49. Curva ROC del marcador predictor de PE entre el grupo 1 y 2 en el segundo trimestre de gestación  | 108 |
| Figura 50. Curvas ROC de los marcadores predictores de PE entre el grupo 1 y el grupo 2 y 3 en el segundo trimestre de gestación   | 109 |
| Figura 51. Curvas ROC del IP e IR como predictores de PE entre el grupo 1 y 2 en el segundo trimestre de gestación   | 110 |
| Figura 52. Curvas ROC del IP e IR como predictores de PE entre el grupo 1 y el grupo 2 y 3 en el segundo trimestre de gestación  | 111 |
| Figura 53. Genotipo de la ECA de las gestantes con PE  | 123 |
| Figura 54. Genotipo de la ECA del grupo control  | 124 |
| Figura 55. Secuencia de la ECA: homocigoto II  | 125 |
| Figura 56. Secuencia de la ECA: heterocigoto   | 126 |
| Figura 57. Secuencia de la ECA: homocigoto DD  | 126 |
| Figura 58. Diagrama de cajas en el que se muestra la distribución de los marcadores angiogénicos entre el grupo de embarazo único y múltiple en el primer trimestre de gestación     | 129 |
| Figura 59. Diagrama de cajas en el que se muestra la distribución de los marcadores angiogénicos entre el grupo de embarazo único y múltiple en el segundo trimestre de gestación    | 131 |



## ***I. INTRODUCCIÓN***



## I.1 La preeclampsia como trastorno hipertensivo del embarazo

Los trastornos hipertensivos del embarazo (THE) son una complicación obstétrica frecuente y de notable morbimortalidad materna y perinatal, presentando una prevalencia mantenida, a pesar de los grandes esfuerzos para su control, con la búsqueda de medidas preventivas. Afectan aproximadamente el 15% de los embarazos, de los cuales menos de una tercera parte llegan a desarrollar preeclampsia (PE). Su clasificación viene recogida en la Tabla 1.

|   |
|---|
| <p><b>1. <u>Hipertensión crónica:</u></b> hipertensión presente antes del embarazo o en el primer trimestre de gestación, ya sea esencial (primaria) o derivada de alguna enfermedad preexistente (secundaria). Persiste después del embarazo</p>       |
| <p><b>2. <u>Hipertensión gestacional:</u></b> hipertensión transitoria que es diagnosticada después de la semana 20 de gestación y desaparece después de 12 semanas posparto. No se acompaña de proteinuria.</p>  |
| <p><b>3. <u>Preeclampsia:</u></b> hipertensión y proteinuria “de novo” a partir de la semana 20 de gestación y que se normalizan dentro de los tres primeros meses tras el parto.</p>   |
| <p><b>4. <u>Preeclampsia sobreañadida:</u></b> aumento brusco de hipertensión y proteinuria y/o trombocitopenia y/o elevación de enzimas hepáticas después de la semana 20 de gestación en una mujer con hipertensión y/o proteinuria preexistente.</p> |

**Tabla 1. Clasificación de los THE [1].**

Se debe diferenciar la PE de otros THE, ya que la PE es el THE que cursa con mayores complicaciones maternas y perinatales y puede provocar graves consecuencias si pasa inadvertida, sin tratamiento o si evoluciona hacia una eclampsia.

Entre los riesgos maternos y fetales en los THE [2] encontramos los siguientes:

Riesgos maternos:

***No obstétricos:***

1. Insuficiencia cardíaca y edema pulmonar agudo
2. Insuficiencia renal
3. Daño hepático
4. Coagulación vascular diseminada
5. Accidente vascular encefálico
6. Necrosis subendocárdica

***Obstétricos:***

1. Desprendimiento prematuro de placenta
2. Eclampsia
3. Muerte

**Riesgos fetales y neonatales:**

1. Crecimiento intrauterino restringido (CIR)
2. Prematurez
3. Vasoconstricción fetal
4. Insuficiencia cardíaca intrauterina
5. Muerte fetal
6. Muerte en periodo neonatal

## **I.2 Definición e incidencia**

PE se define como la aparición “de novo” de hipertensión arterial y proteinuria después de la semana 20 de gestación. Se suele acompañar de edemas pero no es imprescindible la presencia de éstos para ser diagnosticada. Es una enfermedad característica y propia del embarazo de la que se pueden tratar los síntomas, pero sólo se cura con la finalización del mismo y si no se trata adecuadamente puede ser causa de graves complicaciones tanto para la mujer embarazada como para el feto [3].

La PE, junto con la hemorragia y la infección, forma la triada de complicaciones más temibles del embarazo, asociándose intensamente con el parto pretérmino, CIR y la mortalidad perinatal.

Los estudios realizados en diferentes centros a nivel mundial han mostrado una gran disparidad en cuanto a la incidencia de PE. Se estima aproximadamente entre un 6-8% de todos los embarazos, aumentando en presencia de factores de riesgo [4]. Particularmente afecta a los países en desarrollo, pero también a los más desarrollados. Incluso en países con una adecuada atención obstétrica, el 15% de las muertes maternas relacionadas con el embarazo se atribuyen a la aparición de PE, porcentaje que se eleva hasta el 25% en los países hispanoamericanos [5].

En España, Comino en 1986 [6] publicó los resultados de un estudio multicéntrico en el que se incluyeron 70.073 partos procedentes de 23 hospitales

españoles, observando una frecuencia global de THE del 2,23%, de los cuales el 1,1% correspondían a PE, el 0,4% a hipertensión crónica, el 0,3% a hipertensión crónica más PE sobreañadida y el 0,5% a hipertensión transitoria. Posteriormente, el mismo autor ha publicado los resultados de un estudio poblacional que recoge la mitad de los partos asistidos en Andalucía durante 1991 [7]. La frecuencia global de THE durante este período no difirió significativamente de la observada en el estudio anterior, siendo del 2,59%.

### **I.3 Etiología y factores de riesgo**

La etiología de la PE sigue siendo un enigma, rodeado de múltiples hipótesis que nos llevan a la conclusión de que no está causada por un solo factor, sino que tiene una etiología multifactorial. Hasta el momento, la identificación de los factores de riesgo es el único método de cribado de la PE.

Entre ellos encontramos:

#### **1. Edad**

Los datos demográficos de EEUU sugieren que el riesgo de PE aumenta en un 30% por cada año adicional a partir de los 34 años [8].

#### **2. Nuliparidad**

Aproximadamente el 75% de los casos de PE corresponden a primigestas, cuyo riesgo relativo ajustado es de 3,1 (1,5 a 6,17). Cuando la enfermedad ocurre en multíparas, responde a factores predisponentes que pueden haber estado ausentes en embarazos previos (cambio de pareja, hipertensión crónica, diabetes, embarazo múltiple, etc.) [9].

#### **3. Etnia**

El riesgo de PE es mayor en mujeres de raza negra, pues según la mayoría de los estudios presentan una incidencia de PE superior al 5%, con un riesgo relativo entre 1,5 a 3 respecto a la raza blanca. En países hispanoamericanos y caribeños, la PE causa la cuarta parte de las muertes maternas [10].

#### **4. Tabaco**

El hábito tabáquico durante el embarazo se asocia con una reducción del riesgo de padecer PE del 32%, aunque los embarazos de fumadoras que sufren PE tienen mayores tasas de bajo peso al nacimiento, mortalidad perinatal y desprendimiento de placenta, comparado con los embarazos de madres no fumadoras que padecen PE [11].

#### **5. PE previa**

Tiene un riesgo relativo después del primer embarazo de 7,19 (5,85 a 8,83), que aumenta a 7,71 si la PE se presentó en el segundo embarazo (4,3 a 13,47). Las pacientes con PE previa tienen también una mayor prevalencia de desarrollar la forma severa (7,5% versus 2,4%), de partos prematuros, de desprendimiento de placenta y muertes fetales [9;12].

#### **6. Historia familiar de PE**

Si existe el antecedente de PE en algún familiar de primer grado (madre o hermana) prácticamente se triplica el riesgo de PE [12].

#### **7. Gestación múltiple**

La incidencia es aproximadamente cinco veces mayor que la observada en la población general de embarazadas. Un embarazo gemelar casi la triplica, mientras que un embarazo triple eleva tres veces el riesgo del gemelar [13].

#### **8. Enfermedades preexistentes**

- Hipertensión crónica: si con anterioridad a la vigésima semana de gestación se encuentra una presión diastólica entorno a 100 mmHg, el riesgo relativo es de 3,2 (1 a 7,8), mientras que una mayor de 100 mmHg lo eleva a 5,2 (1,5 a 17,2) [14].

- Diabetes mellitus: se ha descrito mayor incidencia en mujeres diabéticas. Sin embargo, un adecuado control metabólico se asocia a una incidencia semejante a la de la población general [15].

- Enfermedad renal: Los datos existentes son muy limitados, aunque la presencia de enfermedad renal crónica se ha asociado de forma global con un riesgo de PE entre dos y tres veces superior a la población general. Se cree que el principal determinante del riesgo de PE no es la enfermedad de origen, sino la gravedad de la insuficiencia renal. Así en gestantes con una creatinina sérica >2,5 mg/dl al comienzo del embarazo

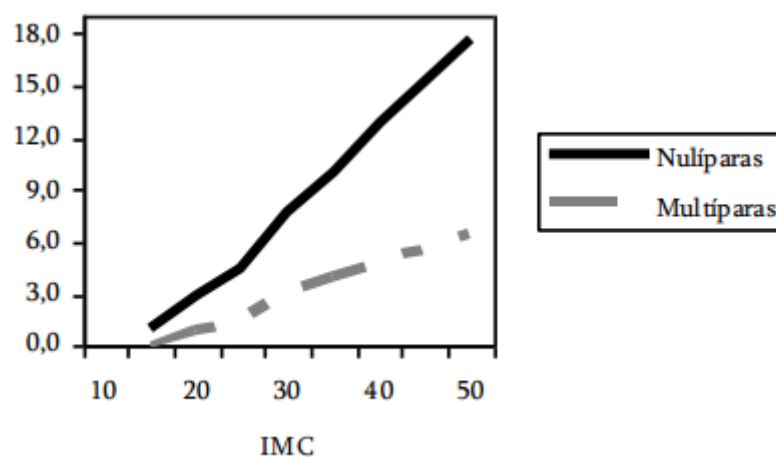
se estima que hasta el 40% desarrollarán una PE. En trasplantadas renales, el diagnóstico de PE puede resultar un desafío y se desconoce su verdadera incidencia, aunque en un estudio en el que se incluyeron más de 500 embarazadas con trasplante renal, se diagnosticó una PE al 27% de ellas [16;17].

- Alteraciones de la coagulación que predisponen a trombosis: en PE ocurre una activación de la coagulación. El principal anticoagulante fisiológico, la antitrombina III, está disminuido en este proceso, lo cual se relaciona con su consumo y la severidad de la enfermedad. Hay menor actividad fibrinolítica, probablemente, como consecuencia del aumento del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1. El inhibidor del activador del plasminógeno tipo 2 de origen placentario está disminuido y el activador tisular del plasminógeno endotelial se encuentra elevado [18].

## 9. Obesidad

La obesidad antes del embarazo también se asocia a mayor riesgo de PE, que es proporcional a la magnitud del sobrepeso. Para un índice de masa corporal de 25 o más, el riesgo ajustado es de 1,9 (0,7 a 4,8) [19].

En un estudio poblacional danés que incluía nulíparas y multíparas, en el que aproximadamente el 7,5% de las gestantes tenían un índice de masa corporal (IMC) pregestacional  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>, se observó que a medida que aumenta el IMC, se incrementa el riesgo de padecer PE, tal como muestra la Figura 1 [20].



**Figura 1.** Probabilidad de PE en función del IMC entre mujeres nulíparas y multíparas (modificado de Catov y cols.) [20].

### **10. Dislipemias**

Entre las alteraciones de los lípidos, la que se ha relacionado más intensamente con el riesgo de PE es la hipertrigliceridemia, que aumenta entre 2 y 4 veces el riesgo de padecerla, en función de la severidad de la elevación en los triglicéridos [21].

### **11. Reproducción asistida**

Las técnicas de reproducción asistida exponen a la futura madre a nuevos antígenos, lo que puede resultar en una alteración de la respuesta inmune materno-fetal, que se ha asociado a un aumento del riesgo de PE [22]. Las mujeres mayores de 40 años que se quedan embarazadas con donación de gametos presentan un riesgo particularmente elevado de padecer formas severas de PE [23].

### **12. Abortos de repetición**

El antecedente de dos o más abortos espontáneos aumenta el riesgo de padecer PE, mientras que el antecedente de abortos voluntarios disminuye el riesgo de PE de forma casi similar a la reducción de riesgo que se produce en las multíparas [24].

### **13. Infecciones**

El embarazo origina por sí mismo un estado proinflamatorio. Cualquier factor que aumente esta respuesta sistémica inflamatoria podría relacionarse con la aparición de PE. Esto justifica que algunas infecciones padecidas durante el embarazo (infecciones del tracto urinario, enfermedad periodontal, etc.) se hayan relacionado con un mayor riesgo de PE [3].

### **14. Factores genéticos**

Los estudios epidemiológicos confirman claramente un componente genético en el desarrollo de PE y la existencia de genes candidatos en su fisiopatología. Se han incluido genes relacionados con la trombofilia, estrés oxidativo, metabolismo de los lípidos entre otros. Al ser la PE un trastorno genético complejo, se espera que se identifique como factores de riesgo la combinación de varios de ellos [25].



## I.4 Diagnóstico

La PE se diagnostica generalmente debido a la presencia de hipertensión arterial (HTA) y proteinuria.

La HTA en el contexto de PE, es definida como presión arterial (PA) sistólica  $\geq 140$  mmHg y/o PA diastólica  $\geq 90$  mmHg en al menos dos ocasiones con un intervalo de medición  $\geq 6$  horas, a partir de la semana 20 de gestación en mujeres previamente normotensas [1;26].

La proteinuria es definida como una excreción de proteínas en orina  $\geq 3$ g/24 horas. En caso de emergencia, si no se puede determinar proteínas en orina de 24 horas, se realizará en una muestra simultánea de orina y al menos en dos determinaciones en un intervalo  $\geq 6$  horas, considerando proteinuria valores  $\geq 30$  mg/dl o  $\geq 1+$  en la tira de orina [1;26].

Diversos estudios han demostrado que la determinación de proteínas en tiras de orina no correlaciona con las proteínas en orina de 24 horas en mujeres con hipertensión gestacional [27-29]. Por tanto, el test definitivo para la determinación de proteinuria debe ser cuantitativo, mediante la medida de proteínas en 24 horas.

Una vez definidas las condiciones para diagnosticar la PE, hay que diferenciar entre leve y severa. La Tabla 2 muestra las diferencias entre ambas.

|                                      | <b>Preeclampsia Leve</b>                                     | <b>Preeclampsia severa</b> |
|--------------------------------------|--|----------------------------|
| Presión arterial sistólica           | <160 mmHg  | ≥160 mmHg                  |
| Presión arterial diastólica          | <110mmHg   | ≥110 mmHg                  |
| Proteinuria                          | >300 mg/24horas  | >5 g/24 horas              |
| Cefaleas                             | No   | Sí                         |
| Anomalías visuales                   | No   | Sí                         |
| Dolor abdominal                      | No   | Sí                         |
| Oliguria                             | No   | <500 ml/24 horas           |
| Convulsiones                         | No   | Sí (eclampsia)             |
| Creatinina sérica                    | Normal o ligeramente elevada<br>≤1 mg/dl                     | >1,2 mg/dl                 |
| Aspartato aminotransferasa           | Normal o ligeramente elevada<br>≤70 U/L                      | >70 U/L                    |
| Bilirrubina                          | Normal o ligeramente elevada<br>≤1,2 mg/dl                   | >1,2 mg/dl                 |
| Ácido úrico                          | Normal o ligeramente elevado<br>≤6 mg/dl                     | >8 mg/dl                   |
| Lactato Deshidrogenasa               | Normal o ligeramente elevada<br><600 U/L                     | ≥600 U/L                   |
| Plaquetas                            | Normal o ligeramente<br>disminuidas ≥100.000/mm <sup>3</sup> | <100.000/mm <sup>3</sup>   |
| Edema pulmonar                       | No   | Sí                         |
| Crecimiento intrauterino restringido | No   | Sí                         |
| Oligohidramnios                      | No   | Sí                         |

**Tabla 2. Clasificación de la PE [30].**

Si la preeclampsia no se trata convenientemente, puede dar lugar a la eclampsia, lo que ocurre en el 1 % de los casos [31], manifestándose por la aparición de convulsiones en una mujer previamente diagnosticada de PE.

## **I.5 Fisiopatología de la PE**

A pesar de la gran cantidad de estudios para identificar los factores que permiten el desarrollo de PE, no se ha logrado establecer aún de forma precisa su etiología ni su fisiopatología.

Desde hace tiempo se acepta que la presencia de la placenta es un requisito indispensable para la aparición de PE. No así el feto, ya que la PE puede aparecer en gestaciones molares, ni tampoco el útero ya que se ha descrito la existencia de PE en gestaciones abdominales [32]. Los primeros cambios fisiopatológicos conocidos que conducen a la PE acontecen en la circulación útero-placentaria y dan lugar a una insuficiencia e isquemia placentaria [33]. Situaciones obstétricas como la mola hidatiforme o la gestación múltiple en las que aparece un incremento relativo de la masa placentaria respecto al flujo placentario, aumentan el riesgo de PE.

Aunque la PE es una enfermedad sistémica, su origen parece encontrarse en la placenta. Sin embargo, el fallo en la placentación no es suficiente para explicar la alteración endotelial que origina el síndrome materno. Los factores de riesgo maternos para la aparición de PE se relacionan con situaciones médicas que condicionan una predisposición a la disfunción vascular, tales como la hipertensión crónica, diabetes mellitus, obesidad o trombofilias. Todo ello apunta hacia una relación entre una deficiente placentación y la inducción de un daño vascular materno, que podría estar mediado por factores liberados a la circulación materna desde una placenta insuficiente. Una serie de factores constitucionales maternos podrían influir en la variedad y la gravedad de la clínica.

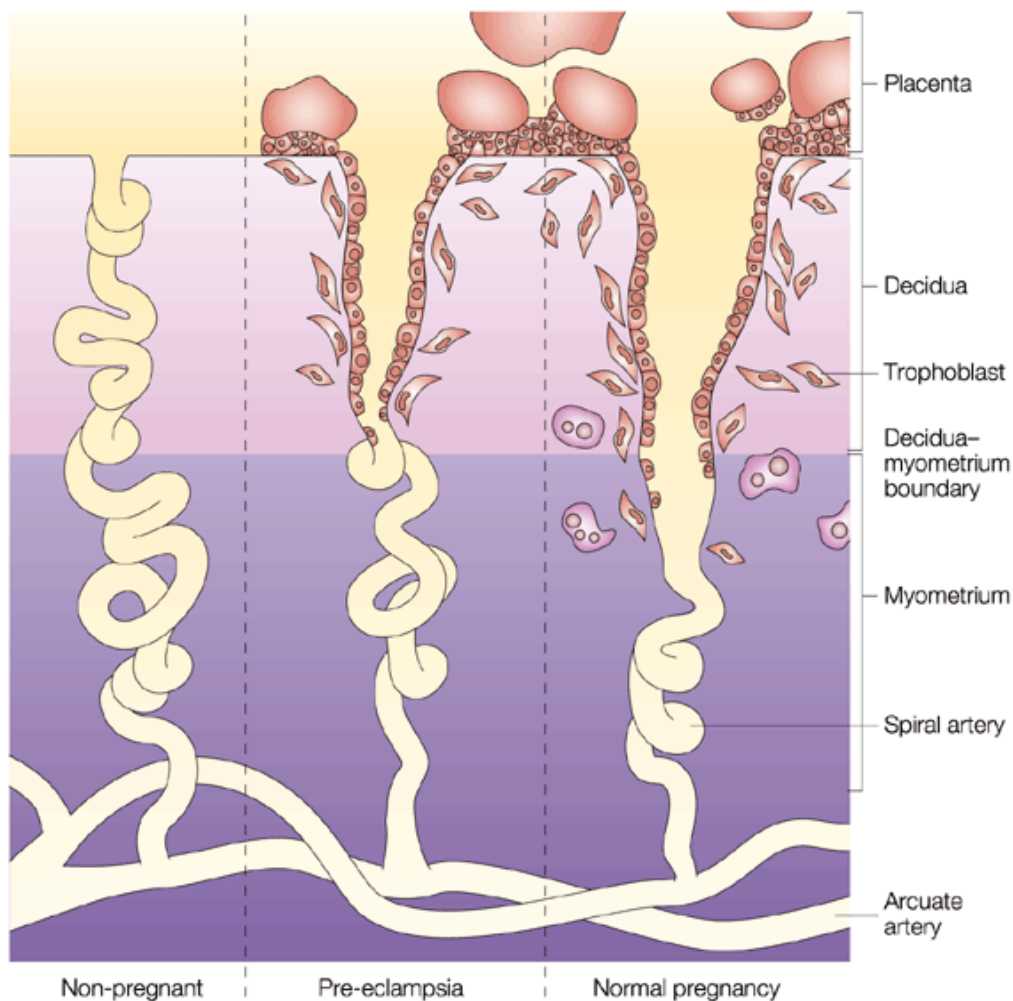
De acuerdo con lo anterior, podemos entender PE como un proceso con dos etapas fundamentales: la primera consiste en el establecimiento de una deficiente circulación placentaria y la segunda en la aparición de una respuesta sistémica materna.

### ***1.5.1 Establecimiento de una deficiente circulación placentaria***

#### **Embarazo normal**

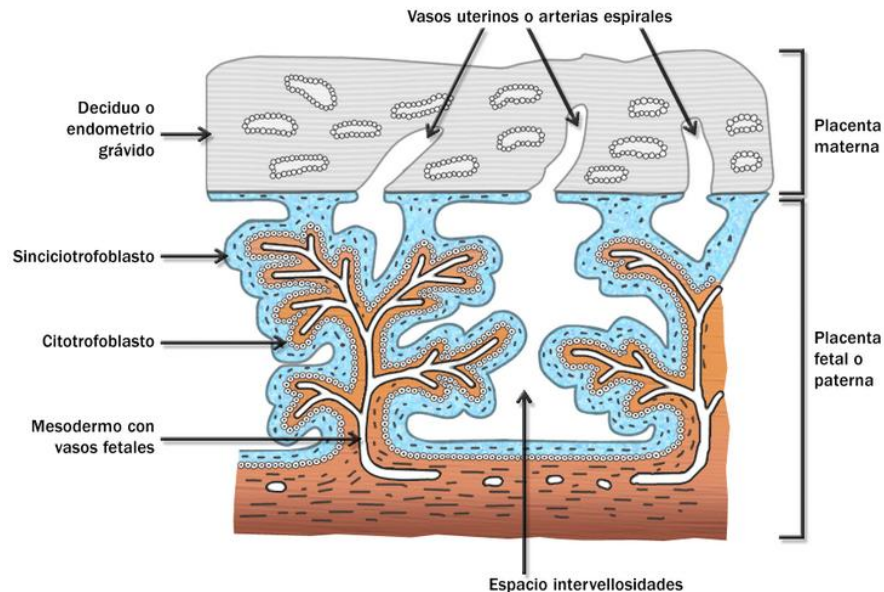
La placenta funciona como una barrera hemocorioendotelial a través de la cual se produce el intercambio de sustancias y gases entre la madre y el feto. El otro

componente principal para el correcto intercambio sanguíneo feto-materno es la adecuada provisión de sangre materna a la zona de intercambio, conocida como espacio intervelloso. De ella se encargan directamente las arterias espirales. Estas arterias surgen de la última ramificación del árbol arterial uterino, a nivel de la capa interna del miometrio, y desarrollan un trayecto que atraviesa la decidua hasta contactar con el espacio intervelloso. Durante el desarrollo placentario, en el embarazo normal acontece una invasión de las arterias espirales maternas por las células citotrofoblásticas, las cuales sufren cambios pasando de un fenotipo epitelial a un fenotipo endotelial invasor, proceso conocido como “pseudovasculogénesis”. En este proceso van a participar un número considerable de factores de transcripción, factores de crecimiento y citoquinas. Como resultado, se produce una disminución de la resistencia vascular y un aumento del flujo placentario que es fundamental para el abastecimiento nutricional fetal (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema de la invasión trofoblástica [34].

La placenta se desarrolla a partir de células derivadas del feto que son los trofoblastos. Desde el comienzo, los trofoblastos se diferencian en dos tipos, los citotrofoblastos, que son los precursores de todas las células trofoblásticas y los sincitiotrofoblastos, que son responsables de la invasión a la decidua (que es el endometrio grávido) y en particular en las arterias espirales maternas (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema de la placenta con su componente fetal y materno (Imagen tomada de <http://www.antioxidantes.com.ar/art263.htm>).

Existen dos oleadas de invasión trofoblástica, una al comienzo del embarazo y la otra en la etapa tardía del embarazo, alrededor de la décima cuarta semana de gestación. La invasión de los sincitiotrofoblastos en las arterias espirales produce un ensanchamiento entre 4 y 6 veces del calibre original de estos vasos, aumentando por lo tanto el flujo de sangre a la placenta y por consiguiente al feto en crecimiento (Figura 2). La primera oleada trofoblástica se extiende de la sexta a la duodécima semana. En el proceso de invasión, las células citotrofoblásticas necesitan reconocer diferentes componentes de la membrana decidual y de la matriz extracelular (integrinas, cadherina) y separarlos (mediante metaloproteasas). Para modular esta invasión, el endometrio modifica la composición de su matriz extracelular segregando el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y los inhibidores de metaloproteasas tisulares (IMPT). Además, la decidua es colonizada por células del sistema inmune (células natural killer (NK), linfocitos y macrófagos), que son responsables de la producción

local de citoquinas [35;36]. Existe una hipoxia relativa, lo que conlleva a un incremento del factor de transcripción inducido por la hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ), TGF- $\beta$ 3, citoquinas inflamatorias y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

La segunda oleada trofoblástica se desarrolla entre las 14-20 semanas. Las células citotrofoblásticas adquieren un fenotipo endotelial invasor mediado por cambios de pO<sub>2</sub> en el espacio intervelloso, encontrándose disminución del HIF-1 $\alpha$  y TGF- $\beta$ 3, accediendo a zonas más profundas del miometrio. Además, el consiguiente aumento del flujo hacia las zonas distales de las arterias espirales condiciona una situación de mayor oxigenación [37].

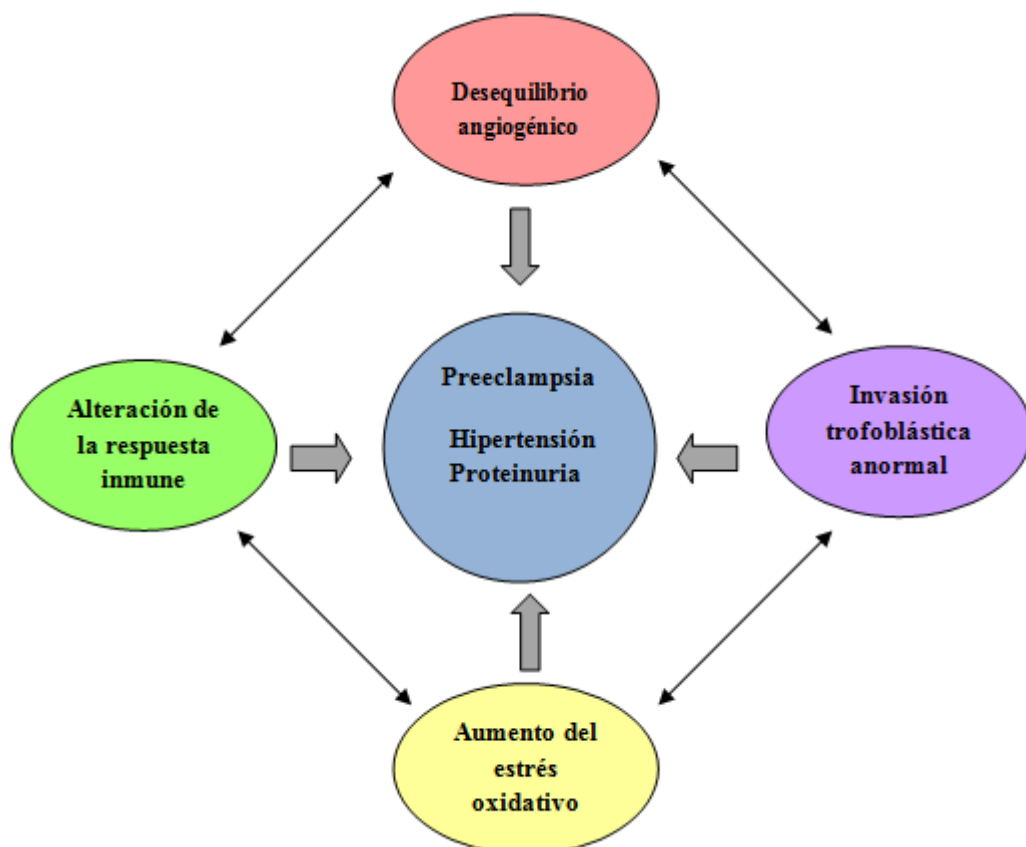
Completadas las modificaciones fisiológicas de las arterias espirales, pasan a denominarse vasos útero-placentarios. La remodelación no afecta a todas las arterias espirales por igual, observándose en un número mucho mayor en la zona central placentaria respecto a la zona periférica. Entre las 16-20 semanas, los segmentos endometriales y de la superficie miometrial de las arterias espirales completan su revestimiento por células citotrofoblásticas, lo que transforma estos pequeños vasos de alta resistencia en otros de mayor calibre y menor resistencia (Figura 2). Esta transformación permite que se alcance el flujo sanguíneo placentario necesario para satisfacer las necesidades nutritivas del feto, que en este momento inicia su etapa de mayor desarrollo y crecimiento.

Siendo la placenta un órgano en continuo desarrollo, sufre un remodelado permanente caracterizado por la apoptosis de los trofoblastos envejecidos sin que se afecten las células vecinas. El mecanismo de apoptosis es desencadenado por las mitocondrias de los trofoblastos, o por señales extrínsecas generadas por citoquinas. En cualquier circunstancia, las caspasas son las moléculas que forman parte de la cascada que conduce a la apoptosis. A medida que avanza la gestación, aumenta la relación peso fetal/peso placentario. Este incremento es exponencial en el tercer trimestre y solamente se frena poco tiempo antes de llegar a término. Por tanto, las demandas fetales en proporción al volumen placentario aumentan respecto al primer trimestre y la placenta debe transformarse para satisfacerlas. Para ello, debe aumentar la relación superficie/volumen de las vellosidades y disminuir el grosor de la barrera trofoblástica que separa las circulaciones materna y fetal.

## ***Preeclampsia***

En PE, la invasión trofoblástica permanece superficial llevando a una deficiente circulación útero-placentaria y una posterior isquemia placentaria. Esto es evidente en la descripción macroscópica de la placenta de pacientes con PE [38]. La biopsia de estas placentas, también demuestran unos vasos estrechos y constrictos, como resultado de la insuficiente invasión trofoblástica. Las pacientes con un aumento de la masa placentaria y menor flujo placentario presentan también mayor riesgo. A pesar de que se han descrito muchas teorías sobre la insuficiente invasión trofoblástica, incluyendo la medioambiental, la genética [39] y/o factores inmunológicos [40], la principal causa aún es desconocida.

Los factores propuestos que contribuyen al desarrollo de PE se resumen en la Figura 4.



**Figura 4:** Factores que contribuyen al desarrollo de PE (Modificado de Pennington y cols. [41])

El factor de inicio en PE sería la reducción de la perfusión útero-placentaria, como resultado de la invasión anormal de las arterias espirales por el citotrofoblasto. Las células citotrofoblásticas invasoras se diferencian anormalmente a sincitio (células gigantes), que pierden su poder de penetración. Un hallazgo relacionado es la mayor frecuencia de PE y CIR en nulíparas; esto puede asociarse con el hecho de que las arterias colonizadas en un primer embarazo pueden ser invadidas más fácilmente en embarazos subsiguientes, pudiendo pensar en una tolerancia inmunológica de los anticuerpos paternos, mediada por las células NK [41].

La segunda invasión trofoblástica no ocurre o es incompleta. Esto se expresa por la persistencia de vasoconstricción uterina e hipoxia, con aumento de la peroxidación lipídica y de la relación tromboxano A<sub>2</sub>/prostaciclina, lo cual acentúa la vasoconstricción y la agregación de plaquetas, condicionando el CIR. Frecuentemente, se encuentra trombosis y depósitos de fibrina diseminados en la placenta en esta enfermedad. Además, la hipoxia aumenta la producción de endotelina-1 y disminuye la de óxido nítrico [42].

Hasta aquí, la PE se caracteriza por aumento en la resistencia vascular sistémica, presencia de reactividad vascular y modificación en la distribución del flujo sanguíneo en la pelvis, todo lo cual precede al inicio de la hipertensión.

Respecto a la alteración de la respuesta inmune en PE, las células del trofoblasto, expresan una combinación de antígenos de la clase HLA I: HLA-C, HLA-E y HLA-G. Las células NK, que expresan varios receptores (CD94, KIR, ILT) reconocen a las moléculas de clase I, infiltrando la decidua materna, estando en contacto con las células del trofoblasto. Se ha hipotetizado que la interacción entre las células NK y las células del trofoblasto controla la implantación placentaria. En PE se cree que la incompatibilidad entre los genes de la madre y el padre induce alteración en la implantación a través de un aumento en la actividad de las células NK. Aunque existe aún un déficit de evidencia en esta teoría, estudios genéticos en busca de polimorfismos en los receptores inmunoglobulin Killer (KIR), en las células maternas NK y en el haplotipo fetal HLA-C, sugieren que mujeres con genotipo KIR-AA y fetal HLA-C2 tienen mayor riesgo de PE [34].



La PE es una enfermedad caracterizada por disfunción generalizada de la célula endotelial, relacionada a varios factores: ácidos grasos, lipoproteínas, peroxidación lipídica, el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) y productos de degradación de fibronectina. Todos estos factores juntos, resultan de una respuesta inflamatoria intravascular generalizada presente durante el embarazo, pero exacerbada en PE. Durante la inflamación, aumentan las proteínas de adhesión de leucocitos en el sistema vascular, estimuladas muy tempranamente por la trombina e histamina y posteriormente, por IL-1 o TNF $\alpha$ . La permeabilidad vascular aumenta junto con extravasación y quimiotaxis celular con fagocitosis.

### ***1.5.2 Establecimiento de una respuesta sistémica materna***

Los efectos de una alteración en el desarrollo trofoblástico se manifiestan en un tiempo posterior de la gestación, cuando los requerimientos nutricionales para el desarrollo fetal comienzan a superar la capacidad placentaria para suministrar la cantidad de flujo sanguíneo necesario. Llegado este momento, se produce una situación de progresiva hipoxia placentaria en la que se cree que la placenta reacciona liberando a la circulación una serie de sustancias responsables de la disfunción endotelial sistémica materna que caracteriza a la PE.

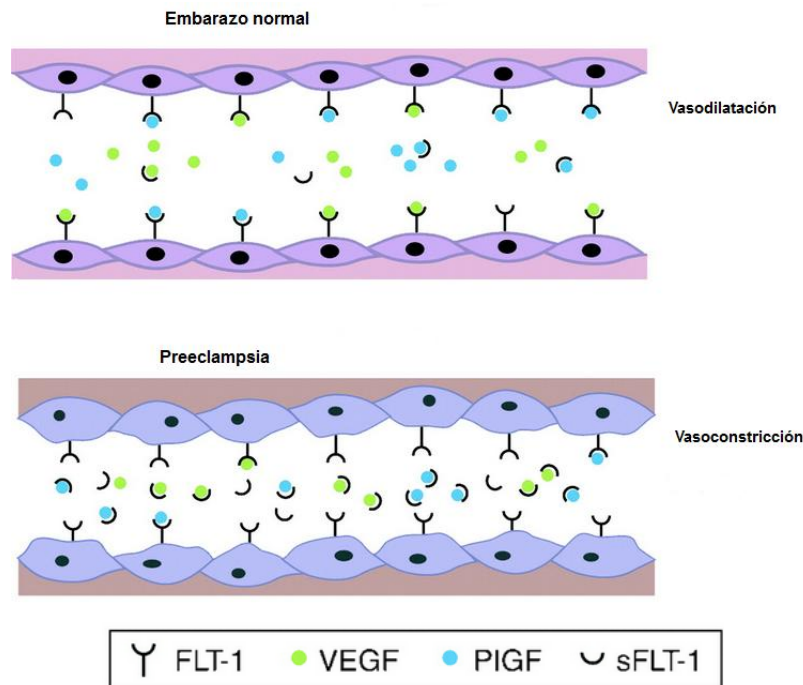
Las células endoteliales tapizan todos los vasos sanguíneos, siendo uno de los tejidos más extensos del organismo. Realizan múltiples funciones, entre las que cabe destacar el mantenimiento de la integridad vascular, impedir la adhesión plaquetaria, regular el tono del músculo liso vascular subyacente y en determinados órganos, desempeñan funciones especializadas, como la filtración glomerular en el riñón.

El cuadro clínico es desencadenado por la disfunción de las células endoteliales junto a otras alteraciones vasculares como la vasoconstricción, el aumento de la permeabilidad capilar y la agregación plaquetaria.

En PE, existe un desequilibrio en la producción y liberación a la circulación materna de factores reguladores de la angiogénesis desde la placenta en situación de isquemia. Algunos grupos de investigación familiarizados con el estudio de la angiogénesis comenzaron a interrogarse acerca del aumento de la expresión en estos tejidos de la forma soluble de la tirosín kinasa 1 (sFlt-1), que reconocieron como un importante factor implicado en la angiogénesis y la vasculogénesis en enfermedades

oncológicas y nefrológicas. Esta proteína actúa como un potente factor antiangiogénico endógeno antagonista de dos factores proangiogénicos como VEGF y el factor de crecimiento placentario (PIGF), que se adhiere a los dominios de unión de PIGF y VEGF, variando la configuración de estas proteínas. Esta situación impide su interacción con los receptores endoteliales de superficie y por tanto induce la disfunción endotelial [33] (Figura 5).

El efecto del sFlt-1 ya ha sido observado en los estadios preclínicos de pacientes con PE, en los que existe un aumento de las concentraciones de sFlt-1 y descenso de las concentraciones libres de VEGF y PIGF. El gen que codifica el sFlt-1 se ha localizado en el cromosoma 13, por lo que se planteó la hipótesis de que en fetos afectados del síndrome de Patau, (trisomía del cromosoma 13), se deberían sintetizar mayores concentraciones de sFlt-1 que en sus equivalentes disómicos. Esta hipótesis se ha visto respaldada por el hallazgo de que la incidencia de PE en madres portadoras de fetos con trisomía 13 está aumentada respecto a madres portadoras de otras trisomías o respecto a un grupo control de embarazadas [42].



**Figura 5:** Esquema representativo del equilibrio normal entre factores angiogénicos circulatorios, comparado con la disfunción endotelial inducida en PE (Modificado de Davison JM y cols. [43]).

## I.6 Aspectos genéticos en la preeclampsia

El estudio de los factores genéticos involucrados en el origen de la PE podría contribuir al esclarecimiento de su etiología, la cual, hasta el momento, no ha sido bien determinada. Múltiples investigaciones han demostrado la evidencia de que tiene un componente genético importante. El modo de herencia de la PE ha sido motivo de investigación y debate. Inicialmente, algunos investigadores propusieron que la susceptibilidad podría ser heredada por un gen único materno, autosómico recesivo, o por un gen dominante con penetrancia incompleta [44].

Posteriormente, se postuló que la susceptibilidad a PE se condiciona por interacciones complejas entre dos o más genes maternos con factores ambientales, genotipos fetales y genotipos paternos. Es muy probable que la susceptibilidad se deba a la acción de varios genes que actúan en la madre y en el feto, modificados por factores ambientales. Esta heterogeneidad hace que la PE sea considerada actualmente como una enfermedad genéticamente compleja que no sigue un patrón de herencia mendeliana [39;45].

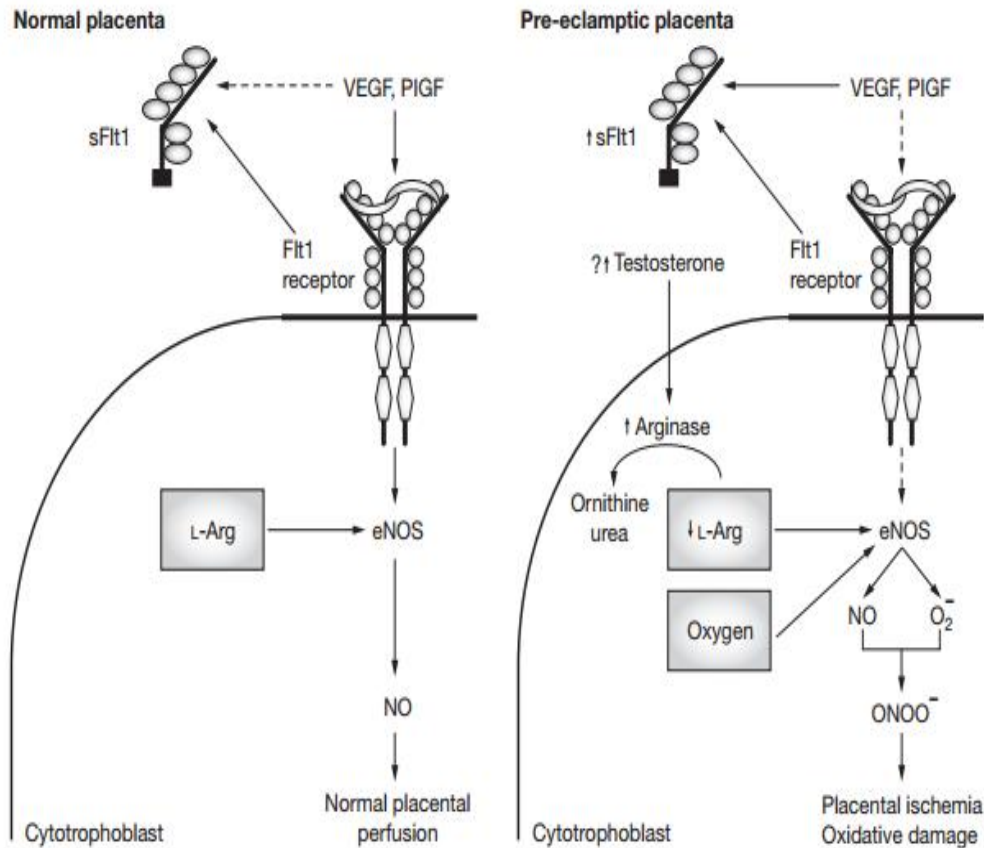
Diversos estudios de asociación han relacionado algunos genes con el desarrollo de PE (Tabla 3). Está considerada una enfermedad genéticamente compleja porque presenta variabilidad fenotípica y genotípica. Ello explica las limitaciones para reproducir un estudio de asociación a un gen candidato.

| <b>Mecanismo Fisiopatológico</b>               | <b>Nombre del gen</b>  | <b>Polimorfismo predominante investigado</b>           |
|--|--|--|
| <b>Trombofilia</b>                             | Factor V Leiden<br>Metilentetrahidrofolato<br>Protombiana<br>Factor activador del plasminógeno<br>Integrina glicoproteína IIIa | 506Gln>Arg<br>C667T<br>G20210A<br>I/D promotor<br>C98T |
| <b>Función endotelial</b>                      | Óxido nítrico sintetasa 3<br>Receptor 1 del VEGF<br>VEGF   | 298Glu>Asp<br>TG repetido<br>C936T                     |
| <b>Proteínas vasoactivas</b>                   | Angiotensinógeno<br>ECA  | 235Met>Thr<br>I/D intrón 16                            |
| <b>Estrés oxidativo y Metabolismo lipídico</b> | Apoproteína E<br>Epóxido hidrolasa microsomal<br>Glutathion s transferasa  | C866T<br>113Tyr>His<br>A313G                           |
| <b>Inmunogenética</b>                          | Tumor de necrosis tumoral $\alpha$<br>Interleuquina 10   | G-308A<br>G1082A                                       |

**Tabla 3:** Principales genes candidatos estudiados en la PE (Modificado de Williams PJ y cols. [25]). ECA: enzima convertidora de angiotensina; I/D: Inserción/Delección; VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular.

## **I.7 Hipótesis unificada de la fisiopatología de la preeclampsia**

En PE, se observa una disminución de las reservas de L-Arginina que provocan una perfusión placentaria alterada y daño microvascular. La unión del VEGF y PlGF a su receptor estimula la producción de óxido nítrico (NO) por la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). En la Figura 6 se muestra como en la placenta normal, las concentraciones de L-Arginina son suficientes para la producción adecuada de NO por la eNOS. Por el contrario en PE, el aumento de las concentraciones de sFlt-1 inhibe la activación de la eNOS. Del mismo modo, el aumento de Arginasa II reduce las concentraciones de L-Arginina favoreciendo la formación de anión superóxido ( $O_2^-$ ), el cual reacciona con NO para formar peroxinitrito que disminuye la vida media del NO dando lugar a una perfusión placentaria alterada.

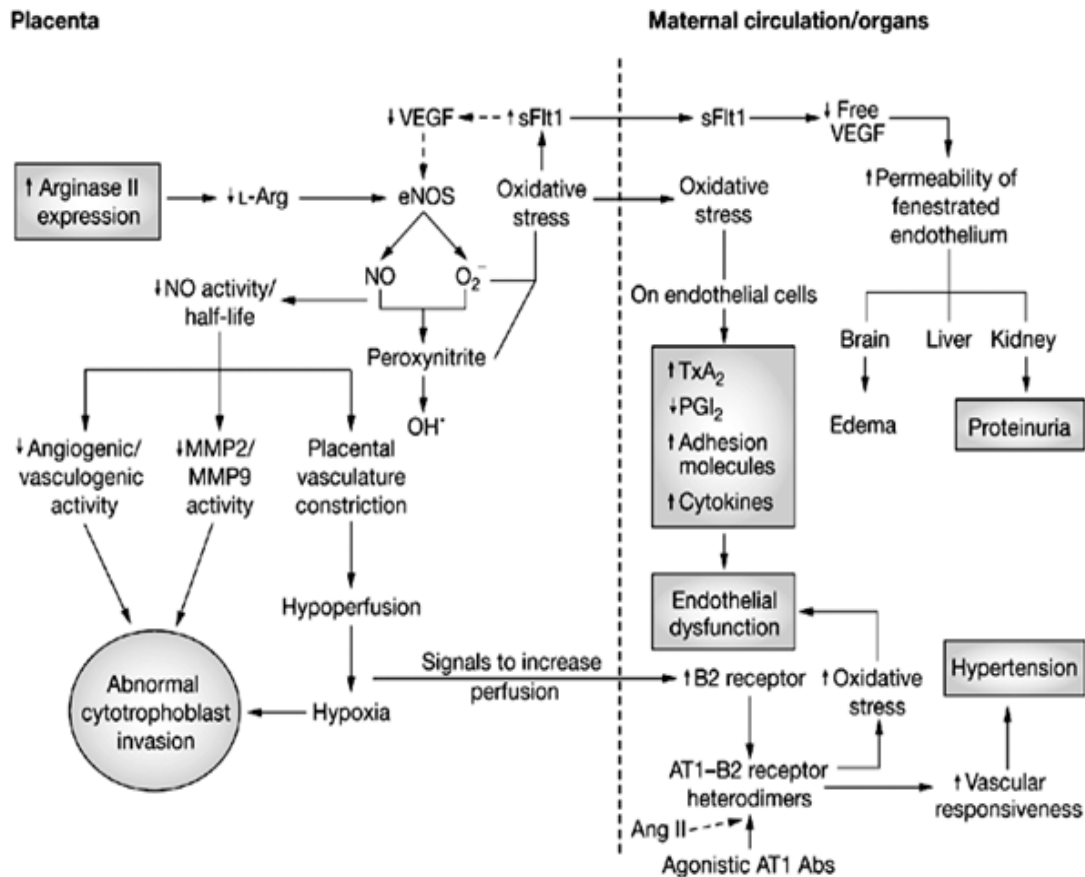


**Figura 6:** Esquema que ilustra la implicación de la L-Arginina en la preeclampsia [46].

eNOS: oxido nítrico sintasa; Flt-1:receptor de la tirosín kinasa 1; L-Arg: L-Arginina; NO: óxido nítrico; O<sub>2</sub><sup>-</sup>: anión superóxido; ONOO<sup>-</sup>: peroxinitrito; PlGF: factor de crecimiento placentario; sFlt-1: forma soluble de la tirosín kinasa 1; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular.

Noris y cols. [46] establecieron una hipótesis que unifica la fisiopatología de la PE. Proponen que este síndrome se produce como consecuencia de una reducción de la vida media del NO debido a que las concentraciones de L-arginina están disminuidas por una activación excesiva de la Arginasa II. Las bajas concentraciones de L-arginina estimulan al eNOS dando lugar a especies reactivas de oxígeno (peroxinitrito y el radical hidroxilo) incrementándose el estrés oxidativo. En respuesta a la restricción del flujo sanguíneo placentario y la consiguiente hipoxia, la placenta libera a la circulación materna una serie de factores como el sFlt-1 y especies reactivas de oxígeno, los cuales inician la disfunción vascular característica del síndrome materno. En un intento para mejorar la perfusión de la placenta, así como de los órganos maternos que participan en la PE, se produce una estimulación de los receptores  $\beta_2$  provocando una vasodilatación.

Los receptores  $\beta_2$  interactúan con el receptor I de la angiotensina II (ATI) dando lugar a un aumento de la angiotensina II y de la respuesta inflamatoria vascular. Paradójicamente, se reduce la perfusión del órgano sistémico y se promueve la generación de especies reactivas de oxígeno. De forma concomitante la producción de anticuerpos agonistas del ATI contribuye al estrés oxidativo. Se inicia un feed-back positivo que da como resultado el síndrome materno característico de la PE. En la Figura 7 se ilustra la hipótesis unificada de la fisiopatología de la PE.



**Figura 7: Esquema que ilustra la hipótesis unificada de la fisiopatología de la PE [46].**

Abs: anticuerpos; Ang II: angiotensina II; ATI: receptor I de la angiotensina II; eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial; L-Arg: L-arginina; MMP2: metaloproteína de la matriz tipo 2; MMP9: metaloproteína de la matriz tipo 9; NO: óxido nítrico; O<sub>2</sub><sup>-</sup>: anión superóxido; OH<sup>•</sup>: radical hidroxilo; PGI<sub>2</sub>: prostaciclina; sFlt-1: forma soluble de la tirosín quinasa 1; TxA<sub>2</sub>: tromboxano; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular.

## **I.8 Prevención de la preeclampsia**

Durante las últimas décadas, se han estado realizando diversos estudios que evalúan distintos métodos para la prevención de la PE. Levine y cols. [47] estudiaron la administración de suplementos de calcio como prevención del desarrollo de PE, concluyendo que éstos no previenen el desarrollo de PE, hipertensión gestacional o muertes neonatales.

La mayoría de los ensayos clínicos que investigan métodos para prevenir la PE, administran dosis bajas de aspirina. Los resultados de un meta-análisis [48] sugieren que la administración de bajas dosis de aspirina durante el embarazo en mujeres con aumento de la resistencia en las arterias uterinas en las 22-24 semanas de gestación no impidió el desarrollo de PE. En el mismo sentido, un estudio multicéntrico [49] que incluyó un total de 2.539 mujeres con factores de riesgo (diabetes mellitus, hipertensión crónica o PE en un embarazo anterior), la administración de dosis bajas de aspirina no mostró beneficios en estas pacientes.

El tratamiento con fármacos antihipertensivos en la hipertensión aguda, evita posibles complicaciones cerebrovasculares y cardiovasculares, que son la causa más común de mortalidad materna en los países desarrollados. El uso de estos fármacos en mujeres con PE leve no previene o altera el curso natural de la enfermedad [26].

## **I.9 Factores predictores de preeclampsia**

En la práctica clínica actual, no existe un método óptimo para seleccionar a aquellas gestantes con un mayor riesgo de desarrollar PE. Las gestantes con factores conocidos de muy alto riesgo son seguidas de forma más intensiva en consultas especializadas, según se recomienda en los protocolos de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia [50]. Sin embargo, la mayoría de los casos de PE suceden en gestantes clasificadas a priori como de bajo riesgo, mientras que entre las seleccionadas como de alto riesgo, más de tres cuartas partes no llegan a padecer nunca una PE. El estudio Doppler ecográfico de las arterias uterinas maternas, con el fin de valorar de forma indirecta las resistencias al flujo útero-placentario, se ha propuesto como un método para mejorar la detección de las gestantes con mayor riesgo de desarrollar PE. Aunque es un método que alcanza una sensibilidad del 60-70% para detectar los casos de PE precoz, su empleo rutinario no se ha extendido ya que presenta un bajo valor

predictivo positivo (VPP), (situado alrededor del 20%) y hacen falta ecografistas experimentados para su medición [51]. El desarrollo de un método de cribado más allá de los criterios clínicos, podría servir para mejorar nuestra capacidad de discriminación, de manera que se pudiesen concentrar los esfuerzos en aquellas gestantes en las que el cribado resultara positivo y disminuir la ansiedad en el grupo de embarazadas con factores de riesgo en el que resultara negativo. La inexistencia de un tratamiento efectivo disponible es la principal limitación para considerar necesario el cribado de la PE en la actualidad. Sin embargo, la correcta selección puede ser la clave para identificar a aquellas mujeres que más se puedan beneficiar de medidas profilácticas y un mayor seguimiento [52].

### ***1.9.1 Estudio Doppler de las resistencias en las arterias uterinas***

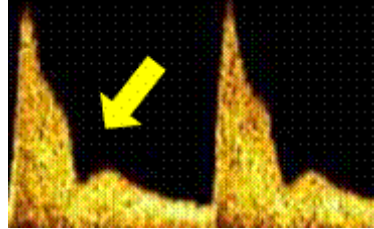
El estudio ecográfico Doppler de la onda de velocidad de flujo (OVF) que se genera en las arterias uterinas, permite orientar indirectamente acerca del estado de la circulación útero-placentaria, puesto que a través de ellas pasa todo el flujo útero-placentario, por lo que las resistencias en estos puntos reflejan los cambios ocurridos en el árbol vascular distal. Se podría decir que las arterias uterinas ofrecen un resumen global de las resistencias de la vascularización uterina.

La invasión trofoblástica supone la sustitución de la pared vascular normal de las arterias espirales por una nueva pared fibrinoide formada por el citotrofoblasto. El proceso de remodelado confiere a las paredes de las arterias espirales una mayor laxitud, que permite un aumento en su calibre con mayor paso de flujo a velocidad enlentecida hacia los espacios intervellosos. En un embarazo normal, el estudio Doppler pone de manifiesto que las resistencias al flujo en las arterias uterinas disminuyen gradualmente al aumentar la edad gestacional, siendo especialmente visible su transformación durante la segunda oleada trofoblástica.

Antes de la semana 10, las resistencias en las arterias uterinas persisten elevadas de forma similar al estado pregestacional. Estas resistencias van disminuyendo a medida que va finalizando el primer trimestre de gestación. Esta etapa coincide con la segunda oleada trofoblástica y en ella las arterias espirales todavía pueden conservar gran parte de sus propiedades elásticas, lo cual justifica la persistencia fisiológica en aproximadamente la mitad de los casos, de una incisura protodiastólica o “notch”



(Figura 8) en la OVF de las arterias uterinas en primer trimestre, que se dibuja como reflejo de la adaptación elástica del calibre de las arterias al brusco descenso del flujo [53].



**Figura 8.** Estudio Doppler de las arterias uterinas donde se muestra la persistencia del notch prodiastólico (Hernández Guillama G y cols. [54]).

Por el contrario, en aquellas gestantes que desarrollan una PE las resistencias en las arterias uterinas permanecen elevadas como resultado del fallo en la transformación de las arterias espirales, que impide su adecuada reconversión en vasos de mayor calibre y menor resistencia. A consecuencia de ello, no se produce una adecuada reducción de las resistencias vasculares en la circulación útero-placentaria y el aporte sanguíneo a esta región se ve comprometido. Esto condujo a la idea de que el estudio Doppler de la OVF de las arterias uterinas podría ser útil como método de cribado de la PE y el CIR, ya que en estados relacionados con una inadecuada invasión trofoblástica se reflejaría una mayor tendencia a la persistencia del estado pregestacional, con aumento en las resistencias y persistencia del “notch” (Figura 8) [55].

La revisión sistemática de Conde-Agudelo y cols. sobre pruebas de cribado para la PE, establece el momento óptimo de la gestación para predecir la PE mediante el Doppler en las 20 -24 semanas de gestación y, califica la utilidad del estudio Doppler como “moderada” [56]. Por el momento no se recomienda su incorporación en las ecografías de rutina realizadas durante el embarazo [57;58].

### ***1.9.2 Marcadores propuestos como posibles predictores de preeclampsia***

A pesar de las décadas de investigación no se ha logrado esclarecer qué marcador o marcadores permiten seleccionar a aquellas gestantes con riesgo “a priori” de desarrollar PE. De lograrlo, facilitaría la selección para una supervisión más cercana. Más aún, la predicción de PE en mujeres con patologías subyacentes (diabetes, hipertensión crónica, etc.) sería de gran valor clínico. Por tanto, son necesarios más

estudios en los que se investigue el papel de distintos biomarcadores, ya que podrían ser útiles y potenciales dianas terapéuticas de diagnóstico para una enfermedad que aún se basa exclusivamente sobre parámetros clínicos.

#### ***1.9.2.1 Forma soluble de la tirosín kinasa 1 (sFlt-1)***

Como hemos comentado en el apartado de fisiopatología, sFlt-1 es la proteína antiangiogénica por excelencia. Es el receptor del VEGF y PlGF y al unirse a ellos impide su funcionamiento adecuado que culmina con disfunción endotelial. Existen dos formas de este receptor: el de tirosín kinasa unido a la membrana placentaria, el cual transmite las señales angiogénicas (Flt1), y la forma soluble (sFlt-1), cuya única función importante es la captura del VEGF y PlGF. Como a este sFlt-1 le falta el dominio citosólico, su función es restringir o reducir las concentraciones libres del VEGF y PlGF, que son accesibles para interactuar con el receptor Flt1 [59;60].

En varios estudios se ha confirmado que los valores de sFlt-1 correlacionan positivamente con la edad gestacional y que a partir de la 35 semanas el aumento de este factor es considerable, presentando valores aumentados 5 semanas antes del desarrollo de PE [33].

#### ***1.9.2.2 Factor de crecimiento placentario (PlGF)***

Es un factor que pertenece a la familia del VEGF. De entre sus funciones destacamos que promueve la viabilidad de las células endoteliales, produce un efecto quimiotáctico sobre los monocitos e interviene en procesos de angiogénesis. Se estudió por primera vez en tejido placentario y más tarde en corazón y en pulmón.

En numerosos estudios, se ha demostrado una disminución del PlGF en las pacientes preeclámplicas. Esto es probable por su unión al sFlt-1, que se encuentra elevado, más que por una disminución en su síntesis por la placenta preeclámptica [33;61].

La tendencia esperada de las concentraciones de PlGF en gestaciones normales es un aumento ininterrumpido durante los dos primeros trimestres de embarazo, con un pico máximo en 29-32 semanas de gestación, disminuyendo posteriormente [33]. Su disminución, se piensa que se produce por un aumento del sFlt-1 entre la semana 33-36 hasta final del embarazo y de hecho, las concentraciones de ambos son recíprocos, es

decir, cuanto mayor son los valores de sFlt-1 menores son los de PlGF. Numerosos estudios han documentado que el descenso de PlGF se puede iniciar al principio del segundo trimestre, incluso en semana 10-11 en pacientes que van a desarrollar PE, en comparación con las pacientes control [33;62].

### ***1.9.2.3 Proteína plasmática A asociada al embarazo (PAPP-A)***

La PAPP-A es una glucoproteína de gran tamaño con un peso molecular de 200 KDa que pertenece a la superfamilia de las peptidasas dependientes del zinc. La PAPP-A fue aislada inicialmente en el suero de las embarazadas, donde su concentración aumenta permanentemente hasta la fecha del parto. Es producida por el trofoblasto y secretada al suero materno donde circula como un complejo heterotetramérico, junto con las dos subunidades de la proforma de la proteína básica más importante del eosinófilo [63].

El estudio de este marcador es interesante desde el punto de vista práctico-económico en el laboratorio, ya que al estar incluido en el test de cribado de cromosomopatías en el primer trimestre de gestación, es realizado a todas las gestantes junto a la subunidad  $\beta$  de la gonadotropina coriónica humana ( $\beta$ hCG). Si se confirmase su utilidad como predictor de PE y/o complicaciones asociadas al embarazo proporcionaría un valor adicional al diagnóstico clínico. Diversos estudios han demostrado que menores concentraciones de PAPP-A durante el primer trimestre están asociadas con PE y otras complicaciones del embarazo [64;65].

### ***1.9.2.4 Ácido úrico***

El ácido úrico es el producto final del metabolismo de las purinas. Es sintetizado por la enzima xantina oxidasa. Las concentraciones séricas de ácido úrico descienden en un 25-35% al principio del embarazo, pero después aumentan progresivamente hasta alcanzar al final del embarazo valores similares a los de las mujeres no embarazadas. El aumento en la concentración de ácido úrico se describió como un hallazgo asociado a las mujeres con PE, aunque la utilidad clínica del aumento en las cifras de ácido úrico sérico ha sido objeto de debate [66;67].

Una reducción en el aclaramiento del ácido úrico, secundario a la disminución en la tasa de filtración glomerular, el aumento de la reabsorción y la disminución en la secreción, que se produce cuando aparece la afectación renal, son los mecanismos

fisiopatológicos argumentados para relacionar el aumento del ácido úrico con la PE. Sin embargo, esta hipótesis no justifica por qué el ácido úrico elevado se ha hallado en etapas preclínicas. Probablemente, su papel predictor pueda estar en relación con su elevación en situaciones de alteración endotelial vascular y síndrome metabólico. Así, el ácido úrico es un marcador de estrés oxidativo, daño tisular y disfunción renal. Por tanto, es posible que el ácido úrico aumentado sea algo más que un simple marcador de severidad de PE y pueda elevarse antes de que el síndrome sea clínicamente evidente [67;68].

#### **I.9.2.5 Triglicéridos**

La hipertrigliceridemia se asocia a obesidad materna, diabetes mellitus e hipertensión crónica, que son todos ellos constituyentes del conocido síndrome metabólico, y asimismo factores de riesgo para el desarrollo de PE. Sin embargo, la relación entre la hipertrigliceridemia y el riesgo de PE no ha sido todavía suficientemente esclarecida. Probablemente esta relación se establezca a través del mayor riesgo de manifestar vasculopatía placentaria en mujeres con mayores concentraciones de triglicéridos, ya que existe en ellas mayor riesgo de hipercoagulabilidad y disfunción endotelial [69;70].

En una revisión sistemática de los trabajos publicados hasta 2005 sobre la relación entre hipertrigliceridemia y PE, se encontró un riesgo ajustado de PE cuatro veces superior, entre aquellas gestantes con valores más altos de triglicéridos respecto a las que presentaban valores más bajos [71]. Otro trabajo más reciente publicado en 2012 [72], confirma también la asociación de hipertrigliceridemia con el aumento del riesgo de PE.

#### **I.9.2.6 Antígeno sérico CA125 (CA125)**

El CA125 es una glicoproteína de elevado peso molecular que puede ser producida por diferentes estructuras (pleura, peritoneo y pericardio), trompa de Falopio, endocervix y fondo vaginal. El CA125 no es por tanto, un marcador específico tumoral, sino que puede ser sintetizado tanto por células normales como malignas de los epitelios donde se origina. Además de ser utilizado en la clínica, como un marcador de seguimiento de tumores de ovario, podría ser útil para otras enfermedades ginecológicas [73]. Los estudios sobre el CA125 en trastornos hipertensivos del embarazo son

limitados, aunque algunos de ellos sitúan al CA125 como un marcador que refleja el estado inflamatorio que se evidencia en pacientes con PE [74]. Debido a ello, son necesarios más estudios para poder explicar la elevación de las concentraciones séricas de CA125 en mujeres con PE y poder aclarar la utilidad clínica de este marcador en dicha patología.

### ***1.9.2.7 Enzima convertidora de angiotensina (ECA)***

La ECA es una enzima producida por varios tejidos corporales tan diversos como el sistema nervioso central, riñones y pulmón. Actúa sobre el sistema renina-angiotensina-aldosterona el cual regula la hemodinámica cardiovascular y el balance de electrolitos en los líquidos corporales. Esta enzima se encuentra ligada a membrana o circulando en distintos fluidos corporales. Convierte la angiotensina I en angiotensina II, la cual es un potente agente vasoconstrictor, lo que provoca que se eleve la resistencia vascular periférica y aumente la tensión arterial. Actúa de forma específica sobre las arteriolas, aunque tiene acción también sobre las vénulas.

Hay pocos estudios que han investigado las concentraciones séricas de ECA en pacientes con PE. Algunos de ellos apuntan que la ECA interviene en la vasoconstricción de la hipoxia placentaria y la peroxidación lipídica [75]. Por tanto es interesante el estudio de este marcador ya que a día de hoy su papel en la fisiopatología de la PE no ha sido esclarecido.

### ***1.9.3 Polimorfismo genético de la ECA y su asociación con la preeclampsia***

El gen de la ECA está localizado en el cromosoma 17. Este gen codifica 2 isoenzimas, una somática que se expresa en las células endoteliales y otra de tipo germinal que sólo se expresa en los testículos. Se han identificado un total de 78 variantes moleculares para este gen, pero la más estudiada es la inserción (I) o delección (D) de una secuencia Alu de 287 pb en el intrón 16. La inserción de la secuencia Alu en el gen de la ECA se ha relacionado con un efecto protector ya que su presencia disminuye las concentraciones de angiotensina II [76]. El polimorfismo de la ECA se caracteriza por la existencia de tres posibles genotipos en la población general: homocigotos II, homocigotos DD y heterocigotos ID. La prevalencia de los diferentes genotipos varía según las características étnicas y geográficas.

Este polimorfismo ha sido muy investigado en enfermedades cardiovasculares y renales. Ha sido asociado al infarto de miocardio, a la evolución de la glomerulonefritis, la nefropatía diabética y al desarrollo de hipertrofia cardíaca, entre otras enfermedades [77;78]. En todos los casos, el peor pronóstico corresponde al genotipo DD. Sin embargo, encontramos resultados contradictorios en la literatura respecto a la asociación de este polimorfismo y el desarrollo de PE [79;80]. Serían necesarios más estudios que investiguen el papel del polimorfismo de la ECA y su implicación en la fisiopatología de la PE así como su correlación con las concentraciones séricas de la ECA.

#### ***1.9.4 Polimorfismo genético de la Apolipoproteína E (ApoE) y su asociación con la preeclampsia***

La ApoE es una proteína con 299 aminoácidos y es sintetizada principalmente en el hígado, aunque se han encontrado también en otros tejidos, como el cerebro, riñón, bazo y sistema nervioso. El defecto en su producción causa un trastorno lipídico llamado disbetalipoproteinemia, en la que se eleva considerablemente la concentración de colesterol y triglicéridos en sangre. El gen de la ApoE se localiza en el cromosoma 19 y es pleomórfico con tres alelos principales, ApoE:  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$ , que traducen tres isoformas de la proteína ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$  respectivamente). Estas isoformas difieren una de la otra solo por un aminoácido sustituido en las posiciones 112 y 158. En la población, encontramos tres genotipos homocigotos ( $\epsilon 2/2$ ,  $\epsilon 3/3$  y  $\epsilon 4/4$ ) y tres heterocigotos ( $\epsilon 2/3$ ,  $\epsilon 2/4$ ,  $\epsilon 3/4$ ) [81]. Estudios realizados en poblaciones caucásicas demostraron que  $\epsilon 3$  es la isoforma de la proteína más común, con una frecuencia de 77-81%,  $\epsilon 2$  posee la frecuencia más baja (8%-11%) mientras que  $\epsilon 4$  se presenta en 12%-15% [82]. En general el alelo  $\epsilon 2$  está asociado con menores concentraciones de colesterol plasmático total, colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL) y apolipoproteína B (ApoB) y elevadas concentraciones de triglicéridos en comparación con la presencia del alelo  $\epsilon 3$ . Mientras que el alelo  $\epsilon 4$  se asocia con mayores concentraciones de colesterol total, lipoproteínas de baja densidad (LDL), ApoB e hipertriglicidemia.

El polimorfismo de ApoE es de interés en la investigación epidemiológica por estar implicado en la etiología de varias patologías cardiovasculares y neurodegenerativas. Los estudios de asociación de este polimorfismo con la PE son limitados.

### ***1.9.5 Otros marcadores de interés***

#### ***1.9.5.1 Endoglina soluble (sEng)***

La sEng es un correceptor de los TGF- $\beta$  y se expresa en forma importante en las membranas de las células endoteliales y el sincitiotrofoblasto. Es un marcador antiangiogénico al igual que sFlt-1. Se la ha relacionado con la enzima eNOS, sugiriendo que regula su actividad y el tono vascular. Al igual que los estudios sobre el sFlt-1, se ha demostrado que las concentraciones de sEng están elevadas en los sueros de las mujeres preeclámpticas y se correlaciona con la severidad de la enfermedad [83]. La sobreexpresión de la sEng en ratas embarazadas se ha asociado con incremento de la permeabilidad vascular e hipertensión, siendo estos síntomas más severos en los casos donde los valores de sFlt-1 se encuentran elevados [33].

#### ***1.9.5.2 Inhibina A***

La inhibina A es una glicoproteína dimérica que forma parte de la familia de los TGF $\beta$  y es sintetizada por múltiples tejidos, aunque durante el embarazo su principal fuente de producción es la placenta. El mecanismo subyacente por el cual la inhibina A juega un papel en la patogénesis de la PE es incierto, aunque existe evidencia de sus funciones autocrinas y paracrinas sobre el tejido trofoblástico [84].

En el embarazo normal, las concentraciones de esta hormona aumenta en el tercer trimestre y las concentraciones alcanzan 10 veces su valor en mujeres preeclámpticas comparado con los controles. Los estudios que han utilizado inhibina A durante el primer trimestre han mostrado un bajo valor predictivo [85]. No se conoce con exactitud la causa de la elevación de esta hormona y si tiene algún papel en la etiología de la PE.

#### ***1.9.5.3 Proteína placentaria 13 (PP13)***

Es una proteína de 32 KDa que es expresada en forma importante por la placenta. Se piensa que está involucrada en la implantación placentaria y la remodelación de la vasculatura materna [86]. Durante el embarazo normal, las concentraciones de PP13 aumentan gradualmente, pero se han demostrado concentraciones anormalmente bajas en las semanas 11-13 del embarazo en las pacientes que desarrollarán PE y CIR comparadas con las de los controles [87]. Un

estudio posterior, analizó las concentraciones de PP13 en las 9-11 semanas de gestación y también encontró bajas concentraciones en las pacientes que desarrollaron PE comparado con los controles [88].

Nicolaides *y cols.* [86] encontraron que las mujeres que desarrollan PE antes de las 34 semanas de gestación presentaron menores concentraciones de PP13 en el primer trimestre comparado con los controles.



## ***II. OBJETIVOS***



## II.1 Justificación e importancia del estudio

La PE es una enfermedad progresiva e impredecible, con una fase preclínica que sólo se detecta en una exploración prenatal de rutina mediante la detección de hipertensión, proteinuria y, en algunos casos, la velocitometría Doppler de la arteria uterina para determinar la insuficiencia placentaria.

Afecta al 6-8% de todos los embarazos y supone uno de los problemas asociados a la gestación que mayor morbimortalidad materna y fetal causa en todo el mundo, especialmente cuando se trata de casos severos y/o precoces. Su etiología sigue siendo un enigma, rodeado de múltiples hipótesis que nos llevan a la conclusión de que no está causado por un único factor sino por una etiología multifactorial.

Al ser considerado un problema obstétrico sin resolver y la evidencia de que muchos de los cambios asociados a la patogenia de la PE preceden en el tiempo al establecimiento de la enfermedad clínica, ha motivado la continua búsqueda de marcadores clínicos, bioquímicos y ecográficos de los cambios sucedidos en el entorno placentario y en la circulación materna, que puedan tener utilidad como predictores precoces de PE. Esto sería teóricamente posible, ya que las hipótesis más aceptadas opinan que el origen de la misma está íntimamente ligado a un anormal desarrollo placentario durante la primera mitad del embarazo, antes de que aparezcan los síntomas.

## II.2 Hipótesis del estudio

¿Pueden resultar de utilidad la determinación de biomarcadores relacionados con el desarrollo de PE, para el esclarecimiento de su etiología y/o fisiopatología?

¿Existe actualmente algún biomarcador o combinación de ellos que pueda predecir de forma fiable y precoz el posterior desarrollo de PE?

¿Existe asociación del polimorfismo genético de la ECA y Apo E con el desarrollo de PE?

## **II.3 Objetivos**

Partiendo de estos interrogantes, se plantearon varios objetivos que se describen a continuación:

1. Estudiar la utilidad clínica de los parámetros de laboratorio propuestos en el estudio (sFlt-1, PIGF, PAPP-A, ácido úrico, triglicéridos, CA125 y ECA) como posibles predictores de PE en gestantes con factores de riesgo.
2. Determinar aquellas combinaciones de marcadores más eficientes para la predicción de PE en el primer y segundo trimestre de gestación.
3. Analizar la asociación del polimorfismo genético de la ECA y Apo E con el desarrollo de PE.
4. Comparar los marcadores angiogénicos (sFlt-1 y PIGF) entre embarazos únicos y múltiples en el primer y segundo trimestre de gestación.

### ***III. MATERIAL Y MÉTODOS***



### III. 1 Diseño del estudio

Para la realización de este trabajo de investigación se han seguido las distintas etapas de la metodología científica.

En una primera etapa, tras varias reuniones con los directores del trabajo y expertos en el tema, se marcó un objetivo inicial y se realizó una revisión bibliográfica sobre la PE, con la finalidad de elaborar un marco teórico que sirviera de guía para el diseño, eligiendo una metodología cuantitativa.

A partir de ahí, se definió el objeto de la investigación, así como las características de los individuos que compondrían el estudio, y los recursos materiales y humanos necesarios para llevarla a cabo.

En una segunda etapa, se plantearon los objetivos específicos y se diseñó un estudio cuyos fundamentos metodológicos estaban basados en:

- establecer grupos de estudio y las características de cada uno de ellos.
- recoger datos y muestras clínicas en cada uno de los individuos incluidos.
- medir las diferentes variables bioquímicas potencialmente relacionadas con los objetivos fijados y realizar los análisis genéticos planteados.

La revisión bibliográfica se realizó en bases de datos nacionales e internacionales. La búsqueda fue limitada a artículos de la tipología: estudios de casos y controles, estudios de cohortes (tanto prospectivos como retrospectivos), estudios descriptivos transversales y revisiones de metaanálisis.

Se ha realizado un estudio prospectivo descriptivo y analítico en un período de 24 meses, comprendido entre los meses de Enero de 2010 a Octubre de 2012, de los cuales en los primeros doce meses se realizó el reclutamiento de las pacientes y el resto del tiempo se realizaron las determinaciones analíticas, análisis genético, recogida de datos y análisis de resultados. Se llevó a cabo en la Sección de Hormonas perteneciente al Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia), con la colaboración de la Unidad Medicina Fetal perteneciente al Servicio Ginecología y Obstetricia de dicho Hospital.

## **III. 2 Sujetos**

### ***III.2.1 Criterios de inclusión***

Se seleccionaron a aquellas gestantes que cumplieran al menos uno de los siguientes criterios de inclusión:

- Mujeres embarazadas que presentan dos o más de los siguientes factores de riesgo:
  - ❖ Nuliparidad.
  - ❖ Obesidad ( $IMC \geq 35 \text{ kg/m}^2$ ).
  - ❖ PA diastólica  $\geq 80$  mm Hg en el momento de la inclusión.
  - ❖ Edad  $\geq 40$  años.
  - ❖ Historia familiar de PE, eclampsia o síndrome de HELLP (madre o hermana)
- PE, eclampsia o síndrome de HELLP en un embarazo anterior.
- CIR en un embarazo anterior.
- Hipertensión crónica preexistente sin proteinuria.
- Hipertensión gestacional.
- Enfermedad renal preexistente
- Diabetes mellitus tipo I (insulino-dependiente) preexistente.
- Examen Doppler de la arteria uterina, índice de pulsatilidad medio (IP)  $> 1,45$ .
- Trombofilia:
  - ❖ Síndrome antifosfolípido.
  - ❖ Deficiencia de proteína C.
  - ❖ Deficiencia de proteína S.
  - ❖ Deficiencia de antitrombina.
  - ❖ Mutación del factor V Leiden.
- Mujeres sometidas a técnicas de reproducción asistida  $\geq 40$  años o que sean receptoras de ovodonación.



### III.2.2 Criterios de exclusión

- Embarazo múltiple
- Mujeres hipertensas y proteínas en orina (tira reactiva  $\geq 1+$ , antes de la semana gestacional 20+0 días).
- Malformaciones mayores.
- Cromosomopatías.
- Feto muerto.

### III.2.3 Grupos de estudio

- Grupo 1: Gestantes con factores de riesgo y que sí desarrollaron PE.
- Grupo 2: Gestantes con factores de riesgo pero que no desarrollaron PE.
- Grupo 3: Grupo control de gestantes normotensas que no cumplen ninguno de los criterios de inclusión descritos anteriormente.

Los criterios de clasificación y diagnóstico de los trastornos hipertensos en el embarazo utilizado en el estudio fueron los siguientes:

❖ **Hipertensión**: PA sistólica  $\geq 140$  mmHg y/o PA diastólica  $\geq 90$  mmHg (en dos ocasiones con un intervalo  $\geq 6$  horas) [1;89-91]

❖ **Hipertensión crónica**: hipertensión (PA sistólica  $\geq 140$  mmHg y/o PA diastólica  $\geq 90$  mmHg) diagnosticada antes del embarazo o en la primera mitad del embarazo (<20 semanas de gestación) y que continúe durante > 12 semanas después del parto [91].

❖ **Proteinuria**: análisis de proteínas en orina de 24 horas ( $\geq 0,3$  g proteínas/ 24 horas), en caso de emergencia si no se puede determinar proteínas en orina de 24 horas, la determinación de proteínas se realizará en una muestra puntual de orina ( $\geq 30$  mg/dl de proteínas) o ratio proteína/ creatinina ( $\geq 30$  mg proteína/mmol creatinina). En caso de urgencia se utilizará una tira reactiva ( $\geq 2+$ ) [91].

❖ **Hipertensión gestacional**: aparición “de novo” de hipertensión (PA sistólica  $\geq 140$  mmHg y/o PA diastólica  $\geq 90$  mmHg) sola sin proteinuria después de 20 semanas de gestación [91].

- ❖ **PE:** aparición “de novo” de hipertensión (PA sistólica  $\geq 140$  mmHg y/o PA diastólica  $\geq 90$  mmHg) y proteinuria después de la semana 20 de gestación [91].
- ❖ **PE severa** [90]: PE más uno de los siguientes criterios:
  - PA sistólica  $\geq 160$  mmHg y/o PA diastólica  $\geq 110$  mmHg (en dos ocasiones en un intervalo de  $\geq 6$  horas).
  - Proteinuria ( $> 5$  g proteína/24 horas o tira reactiva  $\geq 3+$  en dos muestras de orina recogidas con un intervalo mínimo de 4 horas).
  - Deterioro de la función renal (creatinina sérica  $\geq 1,2$  mg/dl salvo que se sepa que anteriormente era elevada u oliguria  $< 500$  ml/24 horas).
  - Edema pulmonar.
  - Deterioro de la función hepática.
  - Síntomas neurológicos (molestias cerebrales o visuales, cefalea severa).
  - Trastornos hematológicos (trombocitopenia, hemólisis).
  - CIR.
- ❖ **Eclampsia:** nueva aparición de convulsiones tónico-clónicas en mujeres con preeclampsia que no se pueden asignar a ninguna otra causa [90].
- ❖ **Preeclampsia precoz y tardía** [92]:
  - PE precoz: aparición de la enfermedad  $< 34+0$  semanas de gestación.
  - PE tardía: aparición de la enfermedad  $\geq 34+0$  semanas de gestación.
- ❖ **Síndrome de HELLP:** aumento de las enzimas hepáticas, de las concentraciones de lactato deshidrogenasa (LDH) y reducción de la cifra de plaquetas ( $< 100.000/\mu\text{L}$ ) [93].
- ❖ **CIR** [94]: peso fetal estimado (PFE) o circunferencia abdominal  $<$  percentil 10 (ajustado por sexo y raza). Presencia de proceso patológico que inhibe la expresión del potencial de crecimiento intrínseco normal. Se debe demostrar el proceso

patológico al menos una vez después de la semana 22 de gestación según uno de los siguientes criterios:

- Oligohidramnion: (índice de fluido amniótico < percentil 10).
- Flujo patológico en la arteria umbilical (IP > percentil 95).

❖ **Neonato pequeño para la edad gestacional:** PFE < percentil 10. Ausencia de proceso patológico [94].

❖ **Parto prematuro:** nacimiento antes de la finalización de las 37 semanas de gestación [95].

### III. 3 Método

#### III.3.1 Parámetros de estudio

Tanto los parámetros de laboratorio como las variables clínicas se estudiaron en los dos primeros trimestres de gestación en las gestantes seleccionadas con los criterios de inclusión descritos anteriormente y un grupo control de gestantes normotensas.

Aunque nuestro estudio se centró en dos visitas que se realizaron en el primer y segundo trimestre de gestación, se realizó el seguimiento de las pacientes hasta el parto.

- **1ª visita:** entre las semanas 11-13 de gestación.
- **2ª visita:** entre las semanas 19-21 de gestación.

#### III.3.1.1 Parámetros de laboratorio

Los parámetros de estudio dependiendo del tipo de muestra fueron los siguientes:

1. Análisis de orina: muestra simultánea de orina para la determinación de proteinuria en tira de orina. En caso de ser positiva, se determinará la proteinuria en orina de 24 horas en los casos que sea posible.
2. Análisis hematológico: recuento de plaquetas.
3. Análisis bioquímico:
  - 3.1 *Parámetros bioquímicos clásicos:* creatinina, colesterol, LDH, aspartato aminotransferasa (GOT) y alanina aminotransferasa (GPT).

3.2 *Parámetros propuestos en el estudio como posibles marcadores predictores de PE:* ácido úrico, triglicéridos, sFlt-1, PlGF, PAPP-A, CA125 y ECA.

4. Análisis genético: estudio del polimorfismo genético de la ECA y Apo E.

#### ***III.3.1.2 Variables clínicas***

Se incluyeron en el estudio datos maternos y del neonato.

1. Datos maternos: edad, peso, IMC, fumadora, antecedentes familiares, nuliparidad, embarazo único o múltiple, abortos en embarazos anteriores, embarazo mediante técnicas de reproducción asistida, semana gestacional en el momento del parto, cesárea, datos de tensión arterial.
2. Datos neonatales: sexo, peso al nacer, complicaciones postparto (hemorragia intraventricular, síndrome de dificultad respiratoria, etc).
3. Datos ecográficos: estudio Doppler.

#### ***III.3.2 Recogida y procesamiento de las muestras***

Se realizó a todos las pacientes una extracción venosa a primera hora de la mañana, tras ayunas de más de 8 horas. Las muestras fueron recogidas en dos tubos, uno con anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) tripotásico y otro sin aditivos. Tras centrifugación a 3500 g, durante 10 minutos se extrajo plasma y suero respectivamente. Se realizaron 2 alícuotas de 1 ml de las muestras de suero restantes del análisis bioquímico y se congeló a -80°C para su posterior procesamiento, utilizándolas para la determinación de los marcadores propuestos como predictores de PE.

Se recogió además una muestra de orina simultánea para la determinación de de la proteinuria en tira de orina y las que fueron positivas se les determinó la proteinuria en orina de 24 horas en todos los casos que fue posible.

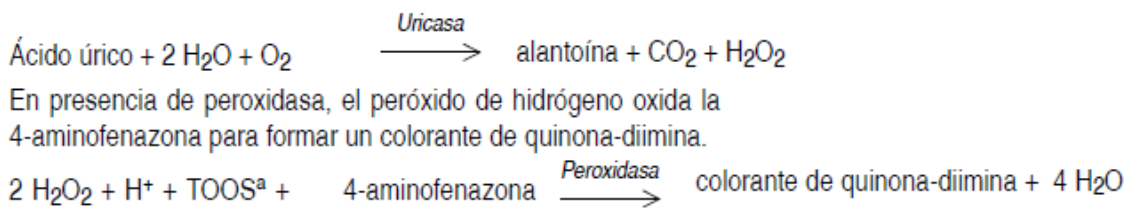
1. Análisis de orina: Las muestras de orina simultánea fueron procesadas antes de 1 hora desde su recogida mediante un analizador URISYS 2400 (Roche Diagnostics®), el cual determina cualitativa o semicuantitativamente in vitro los analitos de la orina, incluidos el pH, leucocitos, nitritos, proteínas, glucosa, cetonas, urobilinógeno, bilirrubina y eritrocitos. Si las muestras de orina presentaban proteínas positivas después de su análisis con el analizador URISYS 2400, se solicitaba una muestra de

orina de 24 horas para cuantificar las proteínas con un analizador cobas 6000 (Roche Diagnostics®).

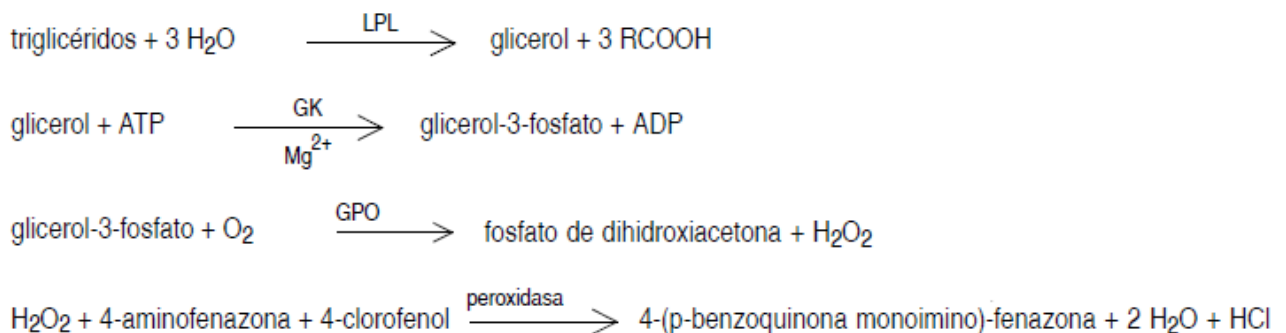
2. Análisis hematológico: Las muestras de sangre recogidas con anticoagulante EDTA tripotásico se les realizó un hemograma en un analizador Sysmex XE-5000 (Roche Diagnostics®) con agitación previa, para obtener datos hematológicos (recuento de plaquetas).

3. Análisis bioquímico: Las muestras de sangre recogidas sin anticoagulante, se centrifugaron a 3500 g y se extrajo el suero que posteriormente se utilizó para el análisis de los parámetros bioquímico clásicos. De las alícuotas congeladas se utilizó el suero para la determinación de los marcadores propuestos como posibles predictores de PE.

**Ácido úrico y Triglicéridos**: sus concentraciones séricas se determinaron mediante un test enzimático colorimétrico en un analizador COBAS 6000 (Roche Diagnostics®).



**Figura 9.** Esquema representativo del principio del test del ácido úrico.



**Figura 10.** Esquema representativo del principio del test de los triglicéridos.

La intensidad cromática del colorante rojo formado en ambos casos, es directamente proporcional a la concentración de ácido úrico y triglicéridos y puede medirse fotométricamente. A continuación en la Tabla 4 se describen las características analíticas de ambos marcadores.

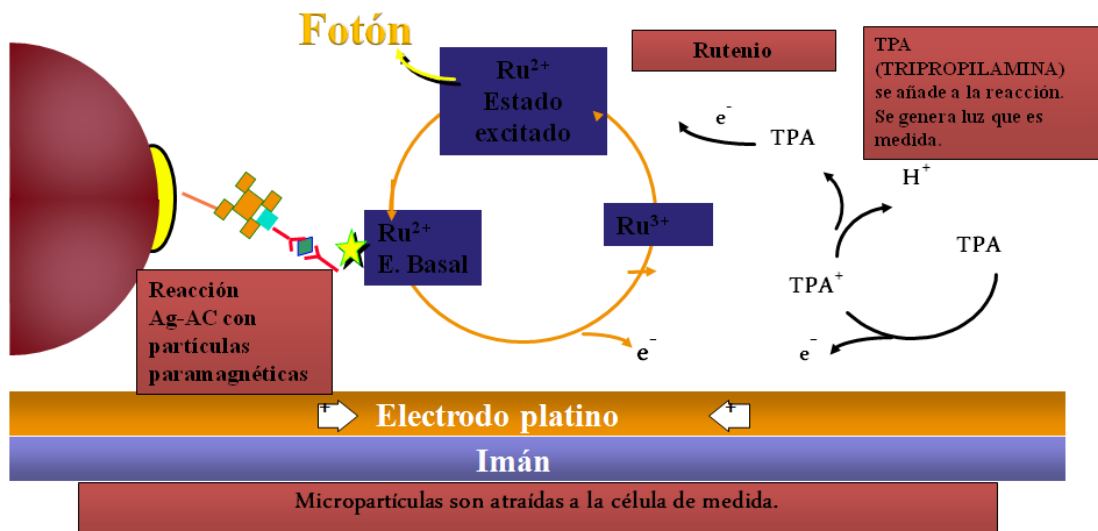
|   | <b>Ácido úrico</b>                    | <b>Triglicéridos</b>                  |
|---|---------------------------------------|---------------------------------------|
| <b>Estabilidad: T<sup>a</sup> ≤ -20°C</b> | <b>6 meses</b>                        | <b>3meses</b>                         |
| <b>Ciclos deshielo (n)</b>                | <b>1</b>                              | <b>1</b>                              |
| <b>Muestras válidas</b>                   | <b>Suero, Plasma (Heparina, EDTA)</b> | <b>Suero, Plasma (Heparina, EDTA)</b> |
| <b>Rango de medida</b>                    | <b>0,2-25 mg/dl</b>                   | <b>8,85-885mg/dl</b>                  |
| <b>CV interensayo (%)</b>                 | <b>≤ 1,5</b>                          | <b>≤ 1,9</b>                          |
| <b>Valores de referencia</b>              | <b>2,4-5,7 mg/dl</b>                  | <b>50-200 mg/dl</b>                   |

*Tabla 4: Características analíticas del ácido úrico y triglicéridos.*

*sFlt-1, PlGF, PAPP-A y CA125:* sus concentraciones séricas se determinaron mediante electroquimioluminiscencia (ECLIA) utilizando el analizador COBAS e 411 (Roche Diagnostics®) para todos ellos, exceptuando el CA125 que se determinó en un analizador elecsys 170 (Roche diagnostics®).

ECLIA combina la reacción convencional Antígeno-Anticuerpo (tipo sándwich) sobre la superficie de una micropartícula magnética con la reacción electroquímica sobre la superficie de un electrodo para generar luminiscencia.

Es un método basado en la interacción entre quelato de rutenio y tripropilamina (TPA) sobre la superficie de un electrodo de platino. Las dos reacciones de oxidación se inician simultáneamente tanto para el rutenio como para la TPA. La TPA se descompone electroquímicamente tras la oxidación del complejo de rutenio con el resultado neto de la emisión de un fotón. La reacción regenera el complejo de rutenio que puede producir múltiples ciclos, durante la fase de medida (Figura 11).



*Figura 11. Esquema representativo de la reacción electroquimioluminiscente.*

La estreptavidina es la base de los inmunoensayos de ECLIA y se acopla a todas las moléculas biotiniladas. El sistema estreptavidina-biotina es muy eficaz para proporcionar inmunorreactividad alta y constante de los antígenos y anticuerpos fijados

El gran número de puntos de unión de biotina en la fase sólida garantiza una alta capacidad de fijación de los componentes biotinilados. Las micropartículas paramagnéticas proporcionan una gran superficie para la inmovilización de antígenos y anticuerpos, facilitando una rápida cinética de reacción.

Para desencadenar la reacción ECLIA sólo se requiere una simple excitación eléctrica. Las reacciones quimioluminiscentes que llevan a la emisión de luz a partir del marcador de rutenio son activadas eléctricamente, por aplicación de un voltaje a la mezcla de reacción. El producto final de la reacción se forma en la misma fase de medida. La emisión de luz se mide con un fotomultiplicador situado por encima de la célula de excitación.

En la Tabla 5 se muestran las características analíticas de los marcadores determinados por electroquimioluminiscencia.

|   | <b>sFlt-1</b>                                     | <b>PlGF</b>                                       | <b>PAPP-A</b>                                     | <b>CA125</b>                                      |
|---|---|---|---|---|
| <b>Estabilidad:<br/>T<sup>a</sup> ≤ -20°C</b> | <b>1 mes</b>                                      | <b>4 meses</b>                                    | <b>3 meses</b>                                    | <b>3 meses</b>                                    |
| <b>Ciclos<br/>deshielo (n)</b>                | <b>1</b>  | <b>1</b>  | <b>1</b>  | <b>1</b>  |
| <b>Muestras<br/>válidas</b>                   | <b>Suero,<br/>Plasma<br/>(Heparina,<br/>EDTA)</b> | <b>Suero,<br/>Plasma<br/>(Heparina,<br/>EDTA)</b> | <b>Suero,<br/>Plasma<br/>(Heparina,<br/>EDTA)</b> | <b>Suero,<br/>Plasma<br/>(Heparina,<br/>EDTA)</b> |
| <b>Rango de<br/>medida</b>                    | <b>10-85000<br/>pg/mL</b>                         | <b>3-10000<br/>pg/dL</b>                          | <b>4-10000<br/>mUI/L</b>                          | <b>0,600-5000<br/>U/mL</b>                        |
| <b>CV<br/>interensayo<br/>(%)</b>             | <b>≤ 4,3</b>                                      | <b>≤ 4,1</b>                                      | <b>≤ 2,3</b>                                      | <b>≤ 1,8</b>                                      |
| <b>Valores de<br/>referencia</b>              |   |   |   | <b>0,6-35<br/>U/mL</b>                            |

**Tabla 5: Características analíticas de los marcadores determinados por electroquimioluminiscencia.**

CA125: *antígeno sérico CA125*; PlGF: *factor de crecimiento placentario*; MoM PAPP-A: *múltiplo de la mediana de la proteína plasmática A asociada al embarazo*; sFlt-1: *forma soluble de la tirosín kinasa 1*.

Los valores de referencia para sFlt-1 y PlGF no se muestran en la tabla anterior debido a que son marcadores que se encuentran en fase de investigación por la casa comercial. Los valores de PAPP-A calculados para cada semana de gestación se muestran en la Tabla 6. En nuestro caso hemos utilizado el múltiplo de la mediana (MoM) para la PAPP-A para nuestra población de estudio. Para el cálculo de los MoM se dividen los valores de PAPP-A de las gestantes del estudio, por la mediana calculada en cada una de las semanas de gestación. Los MoM de la mediana son corregidos por el peso materno, fumadora, etnia, embarazo múltiple, etc, mediante el programa Prisca v4.0 15.9® software (Typolog, Germany).



|                            |      |      |      |
|----------------------------|------|------|------|
| <b>Semana de gestación</b> | 11   | 12   | 13   |
| <b>Mediana (mUI/mL)</b>    | 2,13 | 3,02 | 4,29 |

**Tabla 6:** Valores de PAPP-A calculados para cada semana de gestación.

**ECA:** sus concentraciones séricas se determinaron mediante espectrofotometría en un analizador A-15 de Biosystem (ATOM). La ECA presente en el suero cataliza la hidrólisis de FAPGG (N-[3-(2-furil)acrilil]-L-fenilalanilglicilglicina) a FA (furilacrililfenilalanina). La disminución de la absorbancia a 340 nm es proporcional a la actividad de la ECA en la muestra. En la Tabla 7 se muestran las características analíticas de la ECA.

|                              |                                       |
|------------------------------|---------------------------------------|
|                              | <b>ECA</b>                            |
| <b>Estabilidad: Tª 2-8°C</b> | <b>1 Mes</b>                          |
| <b>Ciclos deshielo (n)</b>   | <b>1</b>                              |
| <b>Muestras válidas</b>      | <b>Suero, Plasma (Heparina, EDTA)</b> |
| <b>Rango de medida</b>       | <b>3-50 U/L</b>                       |
| <b>CV interensayo (%)</b>    | <b>≤ 4,77</b>                         |
| <b>Valores de referencia</b> | <b>8-52 U/L</b>                       |

**Tabla 7:** Características analíticas de la ECA.

*ECA: Enzima convertidora de angiotensina.*

#### 4. Análisis genético:

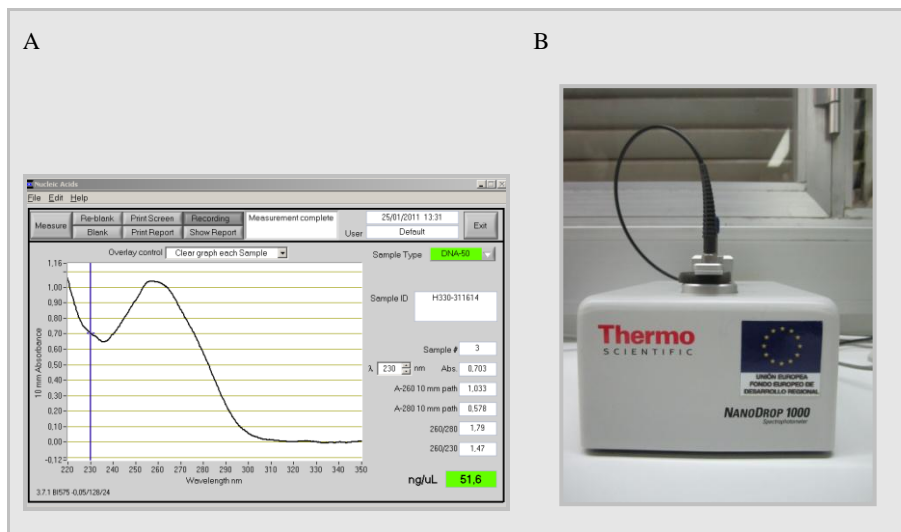
##### **4.1 Análisis genético de la ECA:**

**A. Obtención de ADN:** Para realizar la extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) se centrifugan los tubos con EDTA tripotásico durante 5´ a 3500 g y se extrae la capa de leucocitos (capa blanca) para conseguir mayor concentración del material genético extraído. Posteriormente, se extrajo el ADN genómico mediante el sistema automático de Promega (Maxwell 16 Blood DNA

Purification Kit) (Figura 12) a partir de 400 ml de sangre. La técnica se basa en la actuación de unas partículas paramagnéticas que funcionan como una fase sólida móvil que optimiza la captación, lavado y elución de la muestra. Tras el proceso de extracción, se midió la concentración y pureza del ADN mediante espectrofotometría utilizando el equipo de Thermo Scientific, Nanodrop 1000 (Figura 13). Para obtener la concentración se realizó una medida a 260 nm, a la que absorben los ácidos nucleicos, y se determinó la calidad del ADN extraído mediante la relación entre  $A_{260}/A_{280}$  nm, considerándose un ratio entre 1,5-1,8 como aceptable.



**Figura 12.** Sistema automático de Promega (Maxwell 16 Blood DNA Purification Kit).



**Figura 13.** A. Curva de absorbancia de una muestra de ADN. B. Nanodrop1000 (Termo).

Las muestras de ADN se llevan a una concentración de 20 ng/μL y se guardan a -20°C para su posterior análisis.

*B. Amplificación de la zona de estudio:* se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el modelo de termociclador 2720 Thermal Cycler de Applied Biosystems. El kit enzimático escogido para las amplificaciones fue Promega Go Taq Hot Start polymerase y los cebadores utilizados para la amplificación se muestran en la Figura 14. El cebador forward (F): sentido y el reverse (R): antisentido.

F5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3'  
R5'-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGA-3'

**Figura 14.** Cebadores utilizados en la Reacción en cadena de la polimerasa.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25μL. Los componentes de la PCR se muestran en la Tabla 8.

| <b>PCR</b>                | <b>V (μL)</b> |
|---------------------------|---------------|
| H <sub>2</sub> O          | 10,87         |
| Tampón (10X)              | 5             |
| Cl <sub>2</sub> Mg (25mM) | 2             |
| dNTP's (2mM)              | 2,5           |
| Cebadores F + R (10mM)    | 1+1           |
| Taq (0.5U/mL)             | 0,125         |
| DNA                       | 2,5           |
| <b>Volumen total</b>      | <b>25μL</b>   |

**Tabla 8:** Componentes de la Reacción en cadena de la polimerasa.

*dNTP's: desoxinucleótidos trifosfatos*

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: primeramente se realiza una fase de activación de la polimerasa a 94°C durante 2', seguido de un programa de 35 ciclos que incluye tres temperaturas: 94°C 1' (desnaturalización de hebra molde), T<sup>a</sup> anillamiento 64°C 45'', 72°C 1' (tiempo de extensión); por último una fase de extensión final 72°C 10' y 4°C indefinidamente.

*C. Verificación de la amplificación:* se verificó la correcta amplificación de los fragmentos mediante la técnica de electroforesis en un gel de agarosa al 2% con tampón TBE 1X (Tris 89mM –ácido bórico 89 mM–EDTA), (2mM) a pH 8,4 Bio-Rad (161-0770) utilizando para el revelado GelRed (0,1 mL GelRed/1mL gel) (GelRed Nucleic Acid Gel Satín, 10000X in Water. Catalog number: 41003. Biotium). Se carga aproximadamente 3µL de producto amplificado junto con 1 µL de tampón de carga (0,25% (W/V) azul de bromofenol, 0,25% (W/V) cianol xileno, 30% (V/V) de glicerol en agua). El tamaño de las muestras se compara con un marcador de tamaño de peso molecular (pGEM DNA Markers. Promega) Se utilizó para el revelado el trasiluminador Alpha Innotech y la cámara PowerShot A640 AiAF de Canon (Figura 15).



**Figura 15. Cámara PowerShot A640 AiAF de Canon.**

*D. Purificación de amplicones:* A continuación se purificaron los amplicones mediante un método enzimático, con el kit Exosap-It. Este kit incluye dos enzimas, la exonucleasa I, que elimina las cadenas simples de ADN residuales que se puedan formar en la PCR o restos de cebadores y una fosfatasa alcalina que elimina los restos de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP's). Se mezclan 5 µL del producto de reacción de PCR con 2 µL de Exosap-It, se incuba 15' a 37 °C y seguidamente 15' a 80°C para la inactivación enzimática.

*E. Reacción de secuenciación:* Se utilizó la secuenciación automática como técnica para la confirmación de la existencia del genotipo de la ECA: homocigoto I/I, homocigoto D/D y heterocigoto en tres de las pacientes con PE. Se empleó el Kit BigDye Terminador (BDt) v1.1 de Applied Biosystems, una adaptación de la reacción

enzimática dideoxi de Sanger (1977) (Figura 16). Los componentes de la reacción de secuenciación se muestran en la Tabla 9.

| <b>Reacción de secuenciación</b> | <b>V (μL)</b> |
|----------------------------------|---------------|
| H <sub>2</sub> O                 | 1,5           |
| Tampón enhancer sequencing       | 1,75          |
| Cebadores F ó R (3,2 mM)         | 0,5           |
| Big Dye                          | 0,25          |
| Producto PCR                     | 1,0           |
| <b>Volumen total</b>             | <b>5μL</b>    |

**Tabla 9: Reacción de secuenciación.**

1ª fase: Amplificación.

A. El segmento de ADN que se pretende secuenciar se amplifica por PCR, utilizando nucleótidos normales (es decir, dATP, dTTP, dGTP y dCTP) y dideoxinnucleótidos marcados con fluorescencia (es decir, ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP) (los dideoxinnucleótidos detienen la elongación de la cadena).



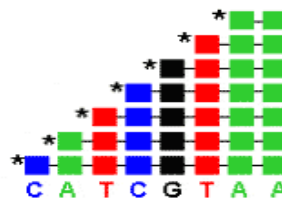
B. El segmento de ADN se copia cuando se incorporan nucleótidos normales. El proceso de copiado se interrumpe cuando se incorpora un dideoxinnucleótido. Mediante este proceso, se producen múltiples fragmentos de ADN de diferente tamaño, marcados con fluorescencia.

Clave: Nucleótidos utilizados en la reacción PCR

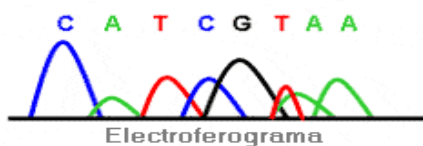
| Nucleótidos normales                      | Dideoxinnucleótidos marcados con fluorescencia |
|---|--|
| <span style="color: green;">■</span> dATP | <span style="color: green;">■</span> * ddATP   |
| <span style="color: red;">■</span> dTTP   | <span style="color: red;">■</span> * ddTTP     |
| <span style="color: black;">■</span> dGTP | <span style="color: black;">■</span> * ddGTP   |
| <span style="color: blue;">■</span> dCTP  | <span style="color: blue;">■</span> * ddCTP    |



2ª fase: Determinación de las secuencias. Se clasifican los fragmentos de acuerdo con su longitud. Una máquina secuenciadora lee las longitudes de onda fluorescentes para determinar qué nucleótido se encuentra en el extremo de cada fragmento.



3ª fase: Representación de las secuencias. Los datos de las secuencias se representan típicamente en un electroferograma, en forma de picos de color. Cada pico representa un nucleótido y lleva su correspondiente letra sobre él.



| Longitud de onda | Nucleótido |
|------------------|------------|
| Rojo             | T          |
| Verde            | A          |
| Azul             | C          |
| Negro            | G          |

**Figura 16. Proceso de secuenciación del ADN.**

Las condiciones de la secuenciación fueron las siguientes: una desnaturalización a 96 °C 1', seguido de un programa de 25 ciclos de tres temperaturas, 96 °C 10'', 50 °C 5'' y 4' a 60 °C terminando a 4 °C indefinidamente. Se utilizan los mismos cebadores que para la PCR pero a una concentración de 3,2 mM. Para confirmar los posibles cambios en la secuencia se realiza una secuencia bidireccional.

*F. Purificación de los amplicones:* Tras la reacción de secuenciación se eliminaron los restos de dNTP's sobrantes utilizando la purificación en placa de columnas de EdgeBio (96 pocillos). Se centrifugaron las placas a 850 g durante 3'. Al mismo tiempo se llevó el volumen de reacción de secuenciación hasta 20 µl. Una vez descartado el filtrado de las columnas se aplicó el volumen de reacción a cada uno de los 96 pocillos de la placa y se volvió a centrifugar a 850 g 3'.

*G. Obtención de ADN en forma de cadenas simples:* se añadieron 10 µl de formamida Hi-Di a cada pocillo.

*H. Electroforesis capilar:* las secuencias fueron analizadas con el analizador de cuatro capilares ABI 3130 (Applied Biosystems) (Figura 17), utilizando cuatro capilares de 50 cm con polímeros POP 7 (Applied Biosystems). Las condiciones electroforéticas fueron las siguientes: tiempo aproximado de carrera: 45', temperatura de 60°C y el tipo de análisis fue sequencing análisis.

*I. Análisis de resultados:* El análisis de las secuencias se realiza con los softwares suministrados por la casa Applied Biosystems, "Foundation Data Collection v. 3.0" y "Sequencing Analysis v. 5.2"



**Figura 17.** *Analizador ABI 3130 (Applied Biosystems).*

**4.2 Análisis genético de la Apo E:** se utilizaron las muestras de ADN extraído descrito en el apartado anterior para el correspondiente análisis de la Apo E en el analizador Light-Cycler 2.0 (Roche Applied Science) (Figura 18) mediante PCR a tiempo real que tiene la ventaja de que, a la vez que se amplifica el fragmento de ADN, se va cuantificando el producto obtenido en cada ciclo.



**Figura 18.** Analizador Light-Cycler 2.0 (Roche Applied Science).

Los pasos del análisis son los siguientes:

1º Amplificación del fragmento de ADN a estudio, en donde se encuentra la región de interés, utilizando cebadores específicos bajo las condiciones optimizadas del LightCycler 2.0 (Tabla 10 y 11). Una vez preparada la mezcla de reacción (Tabla 11) hay que transferir 15µL a un capilar, y sobre estos, añadir 5µl de la muestra problema, obteniendo un volumen total de 20µL.

| Parámetros | Desnaturalización | PCR a tiempo real  |      |      |                |      |    |              |
|------------|-------------------|--------------------|------|------|----------------|------|----|--------------|
|            |                   | PCR- Amplificación |      |      | Curvas Melting |      |    | Enfriamiento |
| Ciclos     | 1                 | 45                 |      |      | 1              |      |    | 1            |
| T(°C)      | 95                | 95                 | 60   | 72   | 95             | 40   | 85 | 40           |
| Duración   | 10'               | 5''                | 10'' | 15'' | 20''           | 20'' | 0  | 30''         |

**Tabla 10.** Características de la PCR a tiempo real.

| <u>Componentes de la reacción</u>       | <u>V (µL)</u> |
|---|---------------|
| H <sub>2</sub> O                        | 6,2           |
| Cl <sub>2</sub> Mg (25mM)               | 1,6           |
| Mezcla de reacción (cebadores y sondas) | 4             |
| Dimetilsulfóxido (DMSO)                 | 1,2           |
| Master (DNA polimerasa)                 | 2             |
| <b>Volumen total</b>                    | <b>15µL</b>   |

*Tabla 11. Componentes de la PCR.*

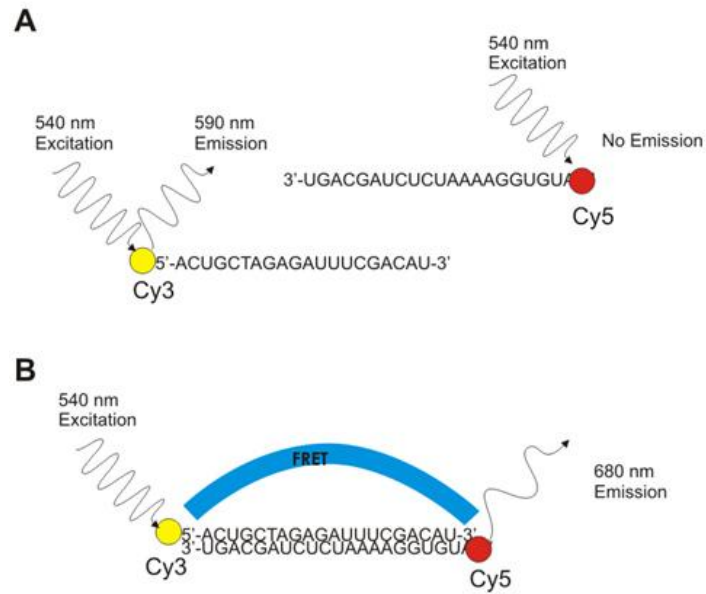
2° El amplicón es detectado gracias a dos sondas de oligonucleótidos que están marcadas con diferentes colorantes:

- Sonda donante: marcada en 3' con Fluoresceína.
- Sonda aceptor: marcada en 5' con LC-Red 640 o LC-Red 705.

Las sondas hibridan con una secuencia interna del fragmento de ADN amplificado durante la fase de anillamiento de cada ciclo de PCR. Cuando se da la hibridación de las dos sondas en una zona próxima se crea una transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) entre los dos fluoróforos, de tal forma que excita a la fluoresceína, y parte de esta energía de excitación es transferida al fluoróforo aceptor (Figura 19). La luz emitida es medida en el canal 2 (para LC-Red 640) o el canal 3 (para LC-Red 705).

3° Inmediatamente después de la amplificación del ADN, el Light-Cycler 2.0 realiza el análisis de la curva melting, elevando la temperatura lentamente (0.1–0.2°C/s), siendo medida la señal de fluorescencia continuamente. Conforme la temperatura aumenta, las dos sondas que no son completamente homólogas a la región de estudio (mismatch) se disocian, por lo que la señal de fluorescencia disminuye. Cuando las sondas hibridan completamente con la región de estudio (perfect match) se necesita una mayor temperatura de fusión o temperatura melting (T<sub>m</sub>) para que se produzca la separación. La T<sub>m</sub> es definida como la temperatura a la cual el 50% del DNA es monocatenario.





**Figura 19.** Detección de fluorescencia según la situación de las sondas [96].

Por último, se identifica el genotipo de los fragmentos obtenidos mediante el análisis de las curvas de Melting. Las  $T_m$  son específicas para cada genotipo (Tabla 12, Tabla 13, Figura 20 y Figura 21).

| Genotipo             | Número de picos | $T_m$       |
|----------------------|-----------------|-------------|
| Homocigoto CGC       | 1               | 62,5°C      |
| Heterocigoto CGC/TCG | 2               | 62,5°C/56°C |
| Homocigoto TCG       | 1               | 56°C        |

**Tabla 12.** Genotipo del codón 112 de la Apo E.

| Genotipo             | Número de picos | $T_m$       |
|----------------------|-----------------|-------------|
| Homocigoto CGC       | 1               | 66°C        |
| Heterocigoto CGC/TCG | 2               | 66°C/57,5°C |
| Homocigoto TCG       | 1               | 57,5°C      |

**Tabla 13.** Genotipo del codón 158 de la Apo E

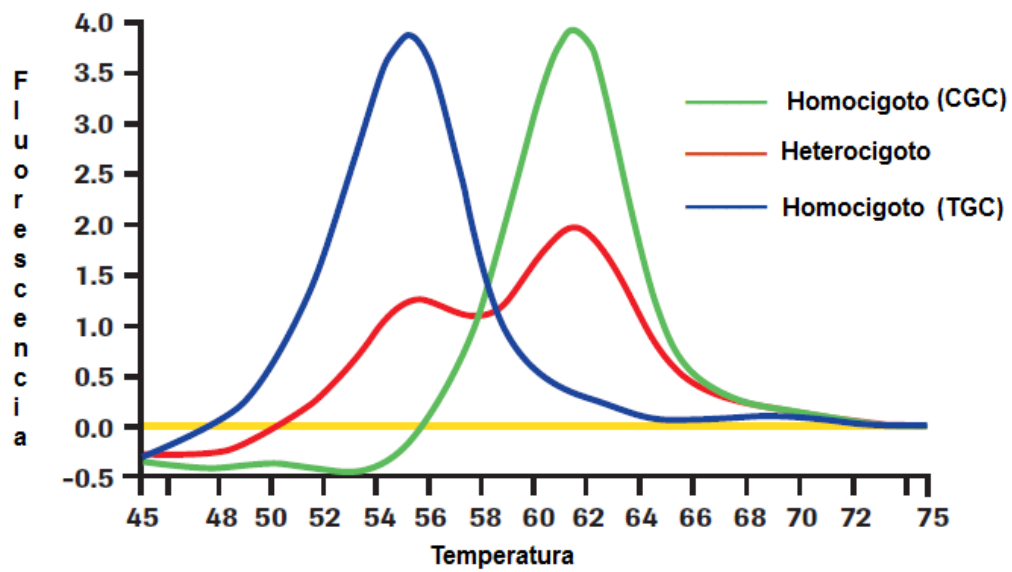


Figura 20. Curvas de Melting. Genotipo del codón 112 de la Apo E

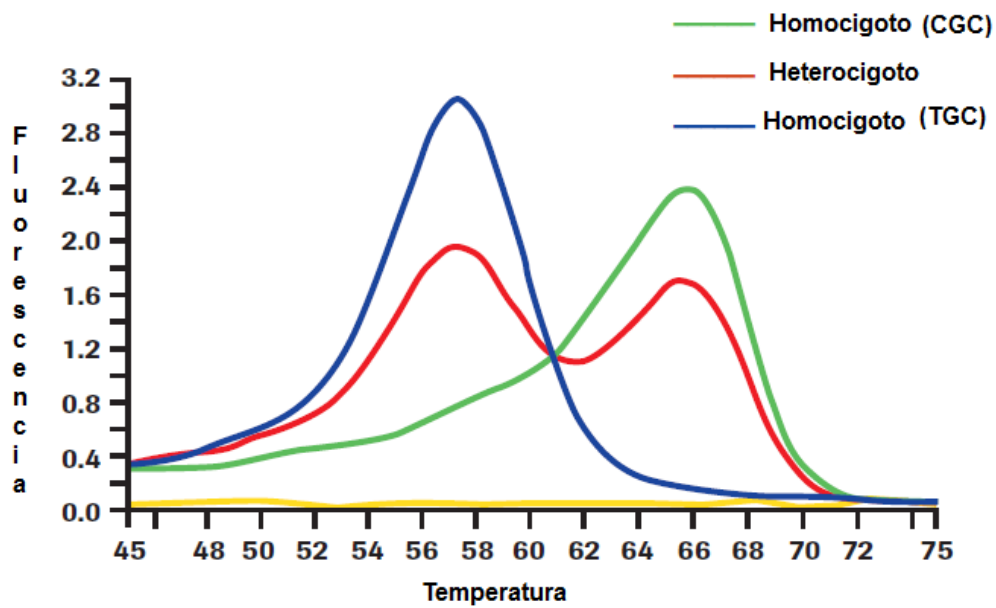


Figura 21. Curvas de Melting. Genotipo del codón 158 de la ApoE

La información que se deduce de las curvas de Melting permite identificar cada genotipo (Tabla 14).

| Genotipo del codón 112 | Genotipo del codón 158 | Alelos |
|------------------------|------------------------|--------|
| TGC                    | TGC                    | ε2/ε2  |
| TCG                    | CGC                    | ε3/ε3  |
| CGC                    | CGC                    | ε4/ε4  |
| TCG                    | CGC/TCG                | ε2/ε3  |
| CGC/TCG                | CGC/TCG                | ε2/ε4  |
| CGC/TCG                | CGC                    | ε3/ε4  |

**Tabla 14.** Resultados del análisis de las curvas Melting de la Apo E.

### III.3.3 Análisis estadístico

La distribución normal de las variables se comprobó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para realizar el estudio descriptivo de la población se utilizaron la media y la desviación estándar para las variables con distribución normal y la mediana y rango intercuartílico (RIC) para aquellas con distribución no normal. Las variables cualitativas se expresan como porcentaje. Para el estudio de correlaciones entre variables, se obtuvo el coeficiente de Pearson y de Sperman, respectivamente.

Para comparar medias se aplicó en el caso de variables con distribución normal el test paramétrico t- de student y el test de Anova. Para el estudio de variables que no seguían distribución normal se aplicó los test no paramétricos de U-Mann Whitney y H de Kruskal-Wallis. La comparación de variables discretas se llevó a cabo a través de la prueba de  $\chi^2$  o la prueba exacta de Fisher (según corresponda).

Se realizó un análisis univariante de la influencia de los factores de riesgo sobre los marcadores propuestos como posibles predictores de PE y se utilizó el test de t- de student y de U-Mann Whitney.

Además, se elaboraron curvas de rendimiento diagnóstico (ROC) para la obtención de posibles puntos de corte de los marcadores predictores de PE, y de los valores de sensibilidad (S) y especificidad (E).

Se ha realizado un análisis de regresión lineal múltiple de los principales factores de riesgo y la influencia que éstos ejercen sobre los marcadores propuestos como posibles predictores de PE. Para este análisis multivariante se han incluido aquellas variables que en el estudio univariante obtuvieron un nivel de significación  $p < 0,15$ .

Con la finalidad de conocer la probabilidad o riesgo de presentar PE, se ha realizado un análisis de regresión logística, tomando como referencia la Odds Ratio (OR) ajustada, con un intervalo de confianza del 95%. Se utilizaron los puntos de corte calculados en las curvas ROC.

En todos los contrastes de hipótesis realizados con técnicas estadísticas, se ha aceptado la existencia de significación estadística para una confianza superior al 95%, admitiendo un valor aleatorio inferior al 5% ( $p < 0,05$ ). El análisis estadístico se ha realizado con el programa SPSS v15.0. (Chicago, Illinois, USA).

#### ***III.3.4 Confidencialidad del estudio***

Este estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Anexo I). Se obtuvo un consentimiento informado por escrito para cada paciente (Anexo II y Anexo III). Sólo tienen acceso a los datos clínicos y de laboratorio, los facultativos del Servicio de Análisis Clínicos y Medicina Fetal que han participado en este ensayo, asegurando la confidencialidad de los mismos, estableciendo el protocolo pertinente para ello.

## ***IV. RESULTADOS***



## IV.1 Estudio descriptivo

Se reclutó un total de 72 gestantes con factores de riesgo de desarrollar PE. Finalizaron el estudio 68 gestantes. Una de ellas sufrió un aborto en la semana 27 de gestación y las tres restantes lo abandonaron en el tercer trimestre de gestación.

### IV.1.1 Características generales de la población de riesgo

| Características maternas de la población de riesgo (n=68) |                 |
|---|-----------------|
| Edad materna al inicio de la gestación                    | 34,7±5,5        |
| Raza (%)  |                 |
| Caucásica   | 97,1            |
| Sudamericana  | 2,9             |
| Árabe   | 0               |
| Nuliparidad (%)   | 42,6            |
| Índice de masa corporal (Kg/m <sup>2</sup> )              | 25,2[22,3-33,5] |
| Fumadora (%)  | 16,1            |
| Tensión arterial (mmHg)                                   |                 |
| Sistólica   | 121,5±11,8      |
| Diastólica  | 75,1±10         |
| Antecedentes familiares de preeclampsia (%)               | 2,9             |
| Antecedentes personales (%)                               |                 |
| Preeclampsia previa                                       | 29,4            |
| Hipertensión crónica                                      | 8,8             |
| Tensión arterial diastólica ≥ 80mmHg                      | 26,4            |
| Diabetes pregestacional                                   | 13,2            |
| Índice de masa corporal > 35 kg/m <sup>2</sup>            | 17,6            |
| Trombofilia   | 5,8             |
| Crecimiento intrauterino restringido previo               | 16,1            |
| Embarazo mediante fecundación in vitro                    | 8,8             |
| Aborto previo   | 16,1            |
| ≥ 2 factores presentes                                    | 39,7            |

*Tabla 15. Características maternas de la población de riesgo.*

**IV.1.2 Características de los distintos grupos de estudio**

Como ya se ha descrito en el apartado de material y métodos, la población total de estudio (n=148) fue clasificada en tres grupos: grupo 1 (gestantes con factores de riesgo que desarrollaron PE, n=8), grupo 2 (gestantes con factores de riesgo de desarrollar PE pero que finalmente no la desarrollaron, n=60) y grupo 3 (grupo control de gestantes normotensas que no cumplen ninguno de los criterios de inclusión de la población de riesgo, n=80). La descripción de las características maternas de los distintos grupos de estudio durante la inclusión en el estudio se muestra en las siguientes Tablas.

| <b>Características maternas del Grupo 1 (n=8)</b>  |                        |
|--|------------------------|
| <b>Edad materna al inicio de la gestación</b>      | <b>33,3±4,3</b>        |
| <b>Raza (%)</b>                                    |                        |
| Caucásica  | <b>87,5</b>            |
| Sudamericana                                       | <b>12,5</b>            |
| Árabe  | <b>0</b>               |
| <b>Nuliparidad (%)</b>                             | <b>37,5</b>            |
| <b>Índice de masa corporal (Kg/m<sup>2</sup>)</b>  | <b>25,1[21,7-35,2]</b> |
| <b>Fumadora (%)</b>                                | <b>0</b>               |
| <b>Tensión arterial (mmHg)</b>                     |                        |
| Sistólica  | <b>127,8±12,7</b>      |
| Diastólica   | <b>80,1±10,3</b>       |
| <b>Antecedentes familiares de preeclampsia (%)</b> | <b>12,5</b>            |
| <b>Antecedentes personales (%)</b>                 |                        |
| Preeclampsia previa                                | <b>62,5</b>            |
| Hipertensión crónica                               | <b>12,5</b>            |
| Tensión arterial diastólica ≥ 80mmHg               | <b>25</b>              |
| Diabetes pregestacional                            | <b>0</b>               |
| Índice de masa corporal > 35 kg/m <sup>2</sup>     | <b>25</b>              |
| Trombofilia  | <b>0</b>               |
| Crecimiento intrauterino restringido previo        | <b>25</b>              |
| Embarazo mediante fecundación in vitro             | <b>0</b>               |
| Aborto previo                                      | <b>0</b>               |
| ≥ 2 factores presentes                             | <b>50</b>              |

**Tabla 16.** *Descriptivo de las características maternas del grupo 1.*



| <b>Características maternas del Grupo 2 (n=60)</b> |                        |
|--|------------------------|
| <b>Edad materna al inicio de la gestación</b>      | <b>34,9±5,7</b>        |
| <b>Raza (%)</b>                                    |                        |
| Caucásica  | <b>98,4</b>            |
| Sudamericana                                       | <b>1,6</b>             |
| Árabe  | <b>0</b>               |
| <b>Nuliparidad (%)</b>                             | <b>43,3</b>            |
| <b>Índice de masa corporal (Kg/m<sup>2</sup>)</b>  | <b>25,3[22,6-33,5]</b> |
| <b>Fumadora (%)</b>                                | <b>18,3</b>            |
| <b>Tensión arterial (mmHg)</b>                     |                        |
| Sistólica  | <b>120,7±11,5</b>      |
| Diastólica   | <b>74,5±9,9</b>        |
| <b>Antecedentes familiares de preeclampsia (%)</b> | <b>1,6</b>             |
| <b>Antecedentes personales (%)</b>                 |                        |
| Preeclampsia previa                                | <b>25</b>              |
| Hipertensión crónica                               | <b>8,3</b>             |
| Tensión arterial diastólica ≥ 80mmHg               | <b>26,6</b>            |
| Diabetes pregestacional                            | <b>15</b>              |
| Índice de masa corporal > 35 kg/m <sup>2</sup>     | <b>16,6</b>            |
| Trombofilia  | <b>6,6</b>             |
| Crecimiento intrauterino restringido previo        | <b>15</b>              |
| Embarazo mediante fecundación in vitro             | <b>10</b>              |
| Aborto previo                                      | <b>18,3</b>            |
| ≥ 2 factores presentes                             | <b>38,3</b>            |

*Tabla 17. Descriptivo de las características maternas del grupo 2.*

| <b>Características maternas del Grupo 3 (n=80)</b> |                        |
|--|------------------------|
| <b>Edad materna al inicio de la gestación</b>      | <b>31,1±4,5</b>        |
| <b>Raza (%)</b>                                    |                        |
| Caucásica  | 95                     |
| Sudamericana                                       | 2,5                    |
| Árabe  | 2,5                    |
| <b>Nuliparidad (%)</b>                             | <b>33,7</b>            |
| <b>Índice de masa corporal (Kg/m<sup>2</sup>)</b>  | <b>22,3[20,2-25,8]</b> |
| <b>Fumadora (%)</b>                                | <b>8,7</b>             |
| <b>Tensión arterial (mmHg)</b>                     |                        |
| Sistólica  | 109,6±9,2              |
| Diastólica   | 66,3±6,9               |
| <b>Antecedentes familiares de preeclampsia (%)</b> | <b>0</b>               |
| <b>Antecedentes personales (%)</b>                 |                        |
| Preeclampsia previa                                | -                      |
| Hipertensión crónica                               | -                      |
| Tensión arterial diastólica ≥ 80mmHg               | -                      |
| Diabetes pregestacional                            | -                      |
| Índice de masa corporal > 35 kg/m <sup>2</sup>     | -                      |
| Trombofilia  | -                      |
| Crecimiento intrauterino restringido previo        | -                      |
| Embarazo mediante fecundación in vitro             | 1,2                    |
| Aborto previo                                      | 13,75                  |
| ≥ 2 factores presentes                             | -                      |

*Tabla 18. Descriptivo de las características maternas del grupo 3.*

#### ***IV.1.3 Descriptivo del grupo con preeclampsia***

La incidencia de PE en la población de estudio fue de 11,7% (8/68). La incidencia de PE tardía fue de 7,3% (5/68) y de PE precoz 4,4% (3/68). Dos de las mujeres con PE (una precoz y otra tardía) además desarrollaron CIR. La incidencia de PE severa fue de 50% (4/8). La media y desviación estándar de días transcurridos desde el debut de PE hasta el parto fue de  $19,6 \pm 25,1$ .

El 10,2% (7/68) de mujeres que desarrollaron hipertensión gestacional no presentaron criterios de PE, y el CIR aconteció en el 17,6% (12/68). De esas doce, dos presentaron PE y tres de ellas presentaron hipertensión gestacional sin criterios de PE.

No se registró ningún caso de síndrome de HELLP, eclampsia, muerte materna o neonatal.

Las características maternas de cada una de las gestantes que desarrollaron PE junto con las características neonatales, se muestra en la Tabla 19.

Tabla 19. Características de las ocho gestantes que han desarrollado PE durante el estudio.

| Números de gestantes                           | 1                            | 2                            | 3                            | 4                            | 5                            | 6                            | 7                            | 8                            |
|--|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| <b>Edad (años)</b>                             | 35                           | 31                           | 28                           | 41                           | 34                           | 29                           | 32                           | 37                           |
| <b>Nuliparidad</b>                             | Sí                           | No                           | No                           | Sí                           | Sí                           | No                           | No                           | No                           |
| <b>Fumadora</b>                                | No                           | No                           | No                           | No                           | No                           | No                           | No                           | No                           |
| <b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>                  | 38,33                        | 26,26                        | 50,78                        | 21,72                        | 38,33                        | 21,51                        | 25,10                        | 21,83                        |
| <b>Raza</b>                                    | Caucásica                    | Caucásica                    | Sudamericana                 | Caucásica                    | Caucásica                    | Caucásica                    | Caucásica                    | Caucásica                    |
| <b>Semana gestacional</b>                      | Parto: 37<br>Debut<br>PE: 36 | Parto: 37<br>Debut<br>PE: 29 | Parto: 38<br>Debut<br>PE: 36 | Parto: 39<br>Debut<br>PE: 37 | Parto: 33<br>Debut<br>PE: 32 | Parto: 39<br>Debut<br>PE: 38 | Parto: 36<br>Debut<br>PE: 36 | Parto: 37<br>Debut<br>PE: 27 |
| <b>TAS/TAD (mmHg)</b>                          |                              |                              |                              |                              |                              |                              |                              |                              |
| <b>Debut de PE</b>                             | 154/97                       | 142/91                       | 175/96                       | 146/85                       | 152/94                       | 160/82                       | 155/82                       | 145/91                       |
| <b>Proteinuria o Tira de (g/24horas) orina</b> | 3,5                          | 3,6                          | Tira:+++                     | Tira:+++                     | 3,5                          | 7,8                          | 8,5                          | 4,1                          |
| <b>IP/IR Arteria uterina</b>                   | 0,99/0,52                    | 1/0,6                        | 1,43/0,7                     | 1,06/0,62                    | 1,44/0,7                     | 0,81/1                       | 1,83/0,78                    | 1,49/0,69                    |
| <b>Notch</b>                                   | No                           | No                           | No                           | No                           | No                           | Sí                           | No                           | Sí                           |
| <b>Cesárea</b>                                 | Sí                           | No                           | Sí                           | No                           | Sí                           | Sí                           | Sí                           | Sí                           |
| <b>Peso (Kg) neonato</b>                       | 2,67                         | 2,68                         | 3,110                        | 3,160                        | 1,350                        | 4                            | 2,230                        | 3,370                        |
| <b>Complicaciones</b>                          |                              |                              |                              |                              | CIR                          |                              | CIR                          |                              |

CIR: Crecimiento intrauterino restringido; IMC: Índice de masa corporal; IP: Índice de pulsatilidad medio; IR: Índice de resistencia medio; PE: Preeclampsia; TAS: Tensión arterial sistólica; TAD: Tensión arterial diastólica.

## IV.2 Comparativa de las características maternas de los distintos grupos de estudio.

En primer lugar, se comparó las características descriptivas entre el grupo de riesgo (grupo 1 y 2) con respecto al grupo control (grupo 3). Las diferencias estadísticamente significativas se muestran en la Tabla 20.

| Características                        | Grupo 1 y 2<br>(n=68) | Grupo 3<br>(n=80) | p      |
|--|-----------------------|-------------------|--------|
| Edad materna al inicio de la gestación | 34,7±5,5              | 31,1±4,5          | <0,001 |
| Raza (%)                               |                       |                   |        |
| Caucásica                              | 97,1                  | 95                | 0,392  |
| Sudamericana                           | 2,9                   | 2,5               |        |
| Árabe                                  | 0                     | 2,5               |        |
| Nuliparidad (%)                        | 42,6                  | 33,7              | 0,668  |
| IMC (Kg/m <sup>2</sup> )               | 25,2[22,3-33,5]       | 22,3[20,2-25,8]   | 0,005  |
| Fumadora (%)                           | 16,1                  | 8,7               | 0,270  |
| Tensión arterial (mmHg)                |                       |                   |        |
| Sistólica                              | 121,5±11,8            | 109,6±9,2         | <0,001 |
| Diastólica                             | 75,1±10               | 66,3±6,9          | <0,001 |
| Antecedentes familiares de PE (%)      | 2,9                   | 0                 | 0,126  |
| Antecedentes personales (%)            |                       |                   |        |
| PE previa                              | 29,4                  | -                 | -      |
| Hipertensión crónica                   | 8,8                   | -                 | -      |
| PA diastólica ≥ 80mmHg                 | 26,4                  | -                 | -      |
| Diabetes pregestacional                | 13,2                  | -                 | -      |
| IMC > 35 kg/m <sup>2</sup>             | 17,6                  | -                 | -      |
| Trombofilia                            | 5,8                   | -                 | -      |
| CIR previo                             | 16,1                  | -                 | -      |
| Embarazo mediante FIV                  | 8,8                   | 1,2               | 0,033  |
| Aborto previo                          | 16,1                  | 13,75             | 0,893  |
| ≥ 2 factores presentes                 | 39,7                  | -                 | -      |

**Tabla 20.** Características maternas de la población de riesgo total (grupo 1 y 2) y el grupo control (grupo 3) durante su inclusión en el estudio.

CIR: crecimiento intrauterino restringido; FIV: fecundación in vitro; IMC: índice de masa corporal; PE: preeclampsia.

Se observaron diferencias significativas para la edad materna al inicio de la gestación ( $p < 0,001$ ), IMC ( $p = 0,005$ ), TA sistólica ( $p < 0,001$ ) y TA diastólica ( $p < 0,001$ ) y embarazo mediante fecundación in vitro (FIV) ( $p = 0,033$ ).

En segundo lugar se comparó las características maternas de los tres grupos. Las diferencias estadísticamente significativas se muestran en la Tabla 21.

| Características                        | Grupo 1<br>(n=8) | Grupo 2<br>(n=60) | Grupo 3<br>(n=80) | p      |
|--|------------------|-------------------|-------------------|--------|
| Edad materna al inicio de la gestación | 33,3±4,3         | 34,9±5,7          | 31,1±4,5          | <0,001 |
| Raza (%)                               |                  |                   |                   |        |
| Caucásica                              | 87,5             | 98,4              | 95                | 0,089  |
| Sudamericana                           | 12,5             | 1,6               | 2,5               |        |
| Árabe                                  | 0                | 0                 | 2,5               |        |
| Nuliparidad (%)                        | 37,5             | 43,3              | 33,7              | 0,633  |
| IMC (Kg/m <sup>2</sup> )               | 25,1[21,7-35,2]  | 25,3[22,6-33,5]   | 22,3[20,2-25,8]   | 0,018  |
| Fumadora (%)                           | 0                | 18,3              | 8,7               | 0,179  |
| Tensión arterial (mmHg)                |                  |                   |                   |        |
| Sistólica                              | 127,8±12,7       | 120,7±11,5        | 109,6±9,2         | <0,001 |
| Diastólica                             | 80,1±10,3        | 74,5±9,9          | 66,3±6,9          | <0,001 |
| Antecedentes familiares de PE (%)      | 12,5             | 1,6               | 0                 | 0,018  |
| Antecedentes personales (%)            |                  |                   |                   |        |
| PE previa                              | 62,5             | 25                | -                 | 0,030  |
| Hipertensión crónica                   | 12,5             | 8,3               | -                 | 0,698  |
| PA diastólica ≥ 80mmHg                 | 25               | 26,6              | -                 | 0,921  |
| Diabetes pregestacional                | 0                | 15                | -                 | 0,128  |
| IMC > 35 kg/m <sup>2</sup>             | 25               | 16,6              | -                 | 0,564  |
| Trombofilia                            | 0                | 6,6               | -                 | 0,521  |
| CIR previo                             | 25               | 15                | -                 | 0,385  |
| Embarazo mediante FIV                  | 0                | 10                | 1,2               | 0,001  |
| Aborto previo                          | 0                | 18,3              | 13,75             | 0,634  |
| ≥ 2 factores presentes                 | 50               | 38,3              | -                 | 0,469  |

**Tabla 21.** Características maternas de las gestantes de los tres grupos durante su inclusión en el estudio.

CIR: crecimiento intrauterino restringido; FIV: fecundación in vitro; IMC: índice de masa corporal; PE: preeclampsia.

Se observó diferencias significativas para la edad materna al inicio de la gestación ( $p<0,001$ ), IMC ( $p=0,018$ ), TA sistólica ( $p<0,001$ ) y TA diastólica ( $p<0,001$ ), PE previa ( $p=0,030$ ), antecedentes familiares de PE ( $p=0,018$ ) y embarazo mediante FIV ( $p=0,001$ ).

En tercer lugar, se comparó las características maternas del grupo 1 y 2. Las diferencias estadísticamente significativas se muestran en la Tabla 22.

| Características                        | Grupo 1<br>(n=8) | Grupo2<br>(n=60) | p     |
|--|------------------|------------------|-------|
| Edad materna al inicio de la gestación | 33,3±4,3         | 34,9±5,7         | 0,462 |
| Raza (%)                               |                  |                  |       |
| Caucásica                              | 87,5             | 98,4             | 0,006 |
| Sudamericana                           | 12,5             | 1,6              |       |
| Árabe                                  | 0                | 0                |       |
| Nuliparidad (%)                        | 37,5             | 43,3             | 0,823 |
| IMC (Kg/m <sup>2</sup> )               | 25,1[21,7-35,2]  | 25,3[22,6-33,5]  | 0,900 |
| Fumadora (%)                           | 0                | 18,3             | 0,215 |
| Tensión arterial (mmHg)                |                  |                  |       |
| Sistólica                              | 127,8±12,7       | 120,7±11,5       | 0,109 |
| Diastólica                             | 80,1±10,3        | 74,5±9,9         | 0,139 |
| Antecedentes familiares de PE (%)      | 12,5             | 1,6              | 0,226 |
| Antecedentes personales (%)            |                  |                  |       |
| PE previa                              | 62,5             | 25               | 0,030 |
| Hipertensión crónica                   | 12,5             | 8,3              | 0,698 |
| PA diastólica ≥ 80mmHg                 | 25               | 26,6             | 0,921 |
| Diabetes pregestacional                | 0                | 15               | 0,128 |
| IMC > 35 kg/m <sup>2</sup>             | 25               | 16,6             | 0,564 |
| Trombofilia                            | 0                | 6,6              | 0,521 |
| CIR previo                             | 25               | 15               | 0,385 |
| Embarazo mediante FIV                  | 0                | 10               | 0,400 |
| Aborto previo                          | 0                | 18,3             | 0,215 |
| ≥ 2 factores presentes                 | 50               | 38,3             | 0,469 |

**Tabla 22.** Características maternas del grupo 1 y 2 durante su inclusión en el estudio. CIR: crecimiento intrauterino restringido; FIV: fecundación in vitro; IMC: índice de masa corporal; PE: preeclampsia.

Se encontraron diferencias significativas para la raza ( $p=0,006$ ) y en PE previa en embarazo anterior ( $p=0,030$ ). El resto de variables estudiadas no fueron significativas cuando se compararon ambos grupos.

En cuarto lugar, se comparó el grupo 1 y 3. Las diferencias estadísticamente significativas se muestran en la Tabla 23.

| Características                                    | Grupo 1<br>(n=8)        | Grupo 3<br>(n=80)     | p                |
|--|-------------------------|-----------------------|------------------|
| Edad materna al inicio de la gestación             | 33,3±4,3                | 31,1±4,5              | 0,155            |
| Raza (%)<br>Caucásica<br>Sudamericana<br>Árabe     | 87,5<br>12,5<br>0       | 95<br>2,5<br>2,5      | 0,482            |
| Nuliparidad (%)                                    | 37,5                    | 33,7                  | 0,832            |
| IMC (Kg/m <sup>2</sup> )                           | 25,1[21,7-35,2]         | 22,3[20,2-25,8]       | 0,150            |
| Fumadora (%)                                       | 0                       | 8,7                   | 0,386            |
| Tensión arterial (mmHg)<br>Sistólica<br>Diastólica | 127,8±12,7<br>80,1±10,3 | 109,6±9,2<br>66,3±6,9 | <0,001<br><0,001 |
| Antecedentes familiares de PE (%)                  | 12,5                    | 0                     | <0,001           |
| Antecedentes personales (%)                        |                         |                       |                  |
| PE previa  | 62,5                    | -                     | -                |
| Hipertensión crónica                               | 12,5                    | -                     | -                |
| PA diastólica ≥ 80mmHg                             | 25                      | -                     | -                |
| Diabetes pregestacional                            | 0                       | -                     | -                |
| IMC > 35 kg/m <sup>2</sup>                         | 25                      | -                     | -                |
| Trombofilia  | 0                       | -                     | -                |
| CIR previo   | 25                      | -                     | -                |
| Embarazo mediante FIV                              | 0                       | 1,2                   | 0,246            |
| Aborto previo                                      | 0                       | 13,75                 | 0,265            |
| ≥ 2 factores presentes                             | 50                      | -                     | -                |

**Tabla 23.** Características maternas del grupo 1 y 3 durante su inclusión en el estudio. CIR: crecimiento intrauterino restringido; FIV: fecundación in vitro; IMC: índice de masa corporal; PE: preeclampsia.



Se encontraron diferencias significativas para la TA sistólica y diastólica ( $p < 0,001$ ) y antecedentes de PE ( $p < 0,001$ ).

Por último, se comparó el grupo 1 con el resto de las gestantes que no desarrollaron PE (grupo 2 y 3). Se observaron diferencias significativas para la TA sistólica ( $p = 0,006$ ) y diastólica ( $p = 0,036$ ) y antecedentes de PE previa ( $p = 0,046$ ).

| Características                                    | Grupo 1<br>(n=8)        | Grupo 2 y 3<br>(n=140) | p              |
|--|-------------------------|------------------------|----------------|
| Edad materna al inicio de la gestación             | 33,3±4,3                | 33±0,5                 | 0,854          |
| Raza (%)<br>Caucásica<br>Sudamericana<br>Árabe     | 87,5<br>12,5<br>0       | 96,5<br>2,1<br>1,4     | 0,299          |
| Nuliparidad (%)                                    | 37,5                    | 37,8                   | 0,475          |
| IMC (Kg/m <sup>2</sup> )                           | 25,1[21,7-35,2]         | 24,1[21,1-29,1]        | 0,482          |
| Fumadora (%)                                       | 0                       | 12,8                   | 0,342          |
| Tensión arterial (mmHg)<br>Sistólica<br>Diastólica | 127,8±12,7<br>80,1±10,3 | 115±11,9<br>70,6±9,5   | 0,006<br>0,036 |
| Antecedentes familiares de PE (%)                  | 12,5                    | 0,7                    | 0,081          |
| Antecedentes personales (%)                        |                         |                        |                |
| PE previa  | 62,5                    | 10,7                   | 0,046          |
| Hipertensión crónica                               | 12,5                    | 3,5                    | 0,226          |
| PA diastólica > 80mmHg                             | 25                      | 15,7                   | 0,637          |
| Diabetes pregestacional                            | 0                       | 5,7                    | 0,582          |
| IMC > 35 kg/m <sup>2</sup>                         | 25                      | 6,4                    | 0,611          |
| Trombofilia  | 0                       | 3,5                    | 0,518          |
| CIR previo   | 25                      | 6,4                    | 0,609          |
| Embarazo mediante FIV                              | 0                       | 8,5                    | 0,471          |
| Aborto previo                                      | 0                       | 7,8                    | 0,334          |
| ≥ 2 factores presentes                             | 50                      | 16,4                   | 0,070          |

**Tabla 24.** Características maternas del grupo 1 y grupo 2 y 3 durante su inclusión en el estudio.

CIR: crecimiento intrauterino restringido; FIV: fecundación in vitro; IMC: índice de masa corporal; PE: preeclampsia..

### IV.3 Estudio Doppler de las arterias uterinas

Se realizó un estudio Doppler de las arterias uterinas entre las 19-21 semanas de gestación. En primer lugar, se comparó el grupo de riesgo (grupo 1 y 2) con el grupo control (grupo 3) y no se encontraron diferencias significativas para ninguno de los parámetros estudiados (Tabla 25).

|                    | <b>IP</b> | <b>IR</b> | <b>Notch (%)</b> |
|--------------------|-----------|-----------|------------------|
| <b>Grupo 1 y 2</b> | 1±0,3     | 0,5±0,1   | 7,3              |
| <b>Grupo 3</b>     | 0,9±0,2   | 0,5±0,1   | 0                |
| <b>p</b>           | 0,057     | 0,759     | 0,062            |

**Tabla 25. Estudio Doppler de las arterias uterinas del grupo de riesgo y control.**

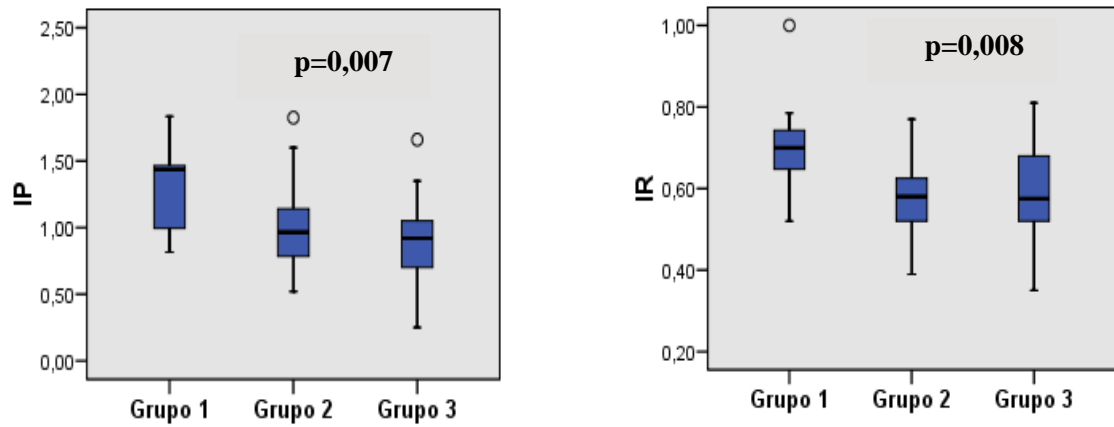
*IP: índice de pulsatilidad medio; IR: índice de resistencia medio.*

En segundo lugar, se comparó los tres grupos de estudio (Tabla 26). Se encontraron diferencias significativas para el IP ( $p=0,007$ ), índice de resistencia medio (IR) ( $p=0,008$ ) y el notch ( $p=0,002$ ), (Figura 22 y 23).

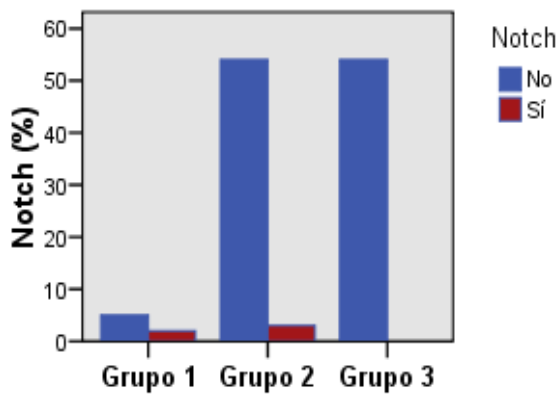
|                | <b>IP</b> | <b>IR</b> | <b>Notch (%)</b> |
|----------------|-----------|-----------|------------------|
| <b>Grupo 1</b> | 1,2±0,3   | 0,7±0,1   | 37,5             |
| <b>Grupo 2</b> | 1±0,3     | 0,5±0,1   | 3,3              |
| <b>Grupo 3</b> | 0,9±0,2   | 0,5±0,1   | 0                |
| <b>p</b>       | 0,007     | 0,008     | 0,002            |

**Tabla 26. Estudio Doppler de las arterias uterinas de los tres grupos de estudio.**

*IP: índice de pulsatilidad medio; IR: índice de resistencia medio.*



**Figura 22.** Diagramas de cajas en el que se muestra la distribución del IP e IR en los tres grupos de estudio.



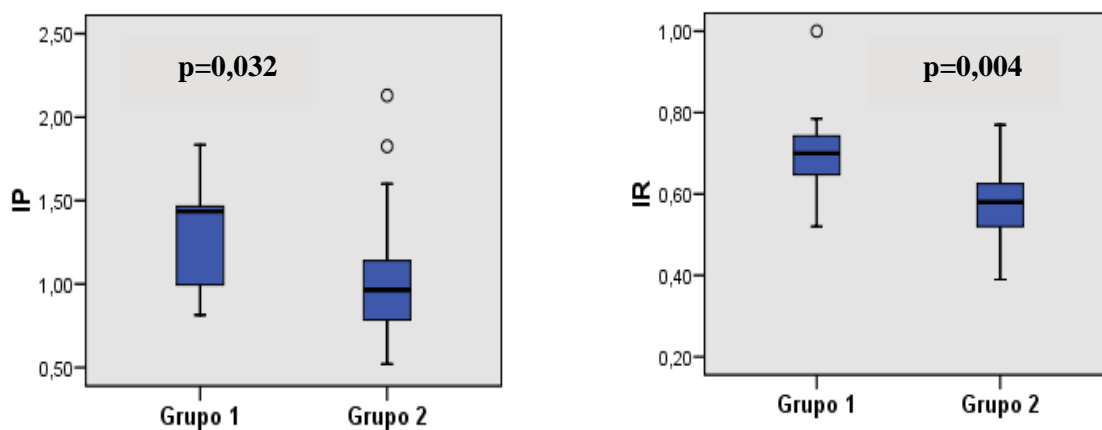
**Figura 23.** Diagrama de barras en el que se muestra la frecuencia de notch en los tres grupos de estudio.

En tercer lugar, se comparó el grupo 1 y 2 (Tabla 27) y se encontraron diferencias significativas para el IP ( $p=0,032$ ) e IR ( $p=0,004$ ) (Figura 24).

|         | IP      | IR      | Notch (%) |
|---------|---------|---------|-----------|
| Grupo 1 | 1,2±0,3 | 0,7±0,1 | 37,5      |
| Grupo 2 | 1±0,3   | 0,5±0,1 | 3,3       |
| p       | 0,032   | 0,004   | 0,088     |

**Tabla 27.** Estudio Doppler de las arterias uterinas del grupo 1 y 2.

IP: índice de pulsatilidad medio; IR: índice de resistencia medio.



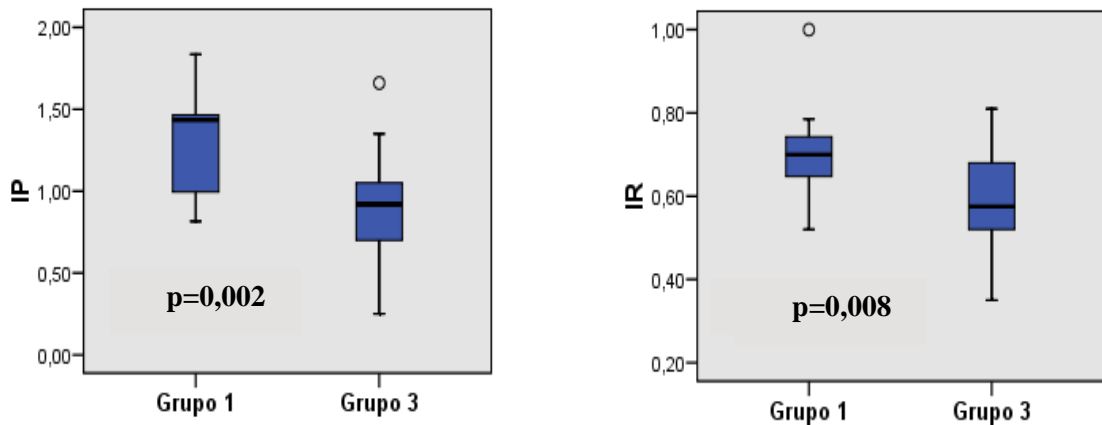
**Figura 24.** Diagramas de cajas en el que se muestra la distribución del IP e IR en el grupo 1 y 2.

En cuarto lugar, se comparó el grupo 1 y 3 (Tabla 28). Se observó diferencias significativas para IP ( $p=0,002$ ) e IR ( $p=0,008$ ) y el Notch ( $p=0,011$ ), (Figura 25 y Figura 26).

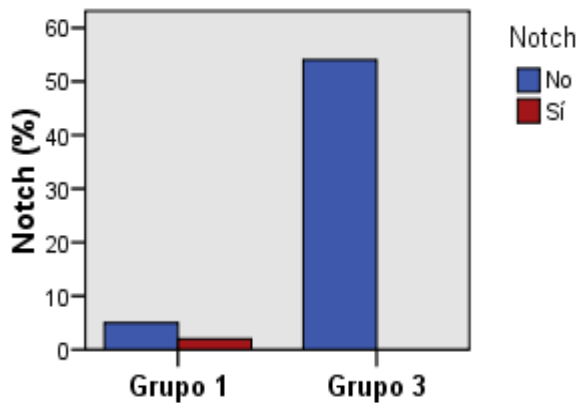
|         | IP      | IR      | Notch (%) |
|---------|---------|---------|-----------|
| Grupo 1 | 1,2±0,3 | 0,7±0,1 | 37,5      |
| Grupo 3 | 0,9±0,2 | 0,5±0,1 | 0         |
| p       | 0,002   | 0,008   | 0,011     |

**Tabla 28.** Estudio Doppler de las arterias uterinas del grupo 1 y 3.

IP: índice de pulsatilidad medio; IR: índice de resistencia medio.



**Figura 25.** Diagramas de cajas en el que se muestra la distribución del IP e IR en el grupo 1 y 3.



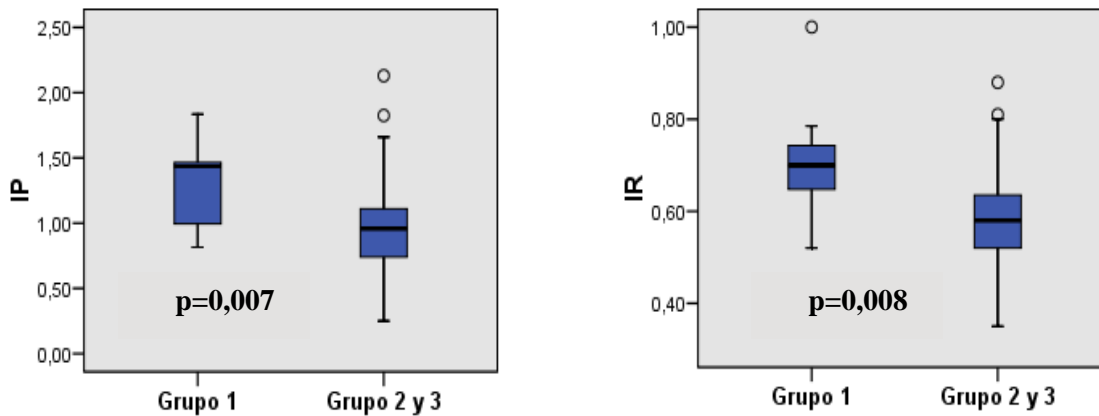
**Figura 26.** Diagrama de barras en el que se muestra la frecuencia de notch en el grupo 1 y 3.

Por último, se comparó el grupo 1 y el grupo 2 y 3 (Tabla 29). Se observó diferencias significativas para IP ( $p=0,007$ ), IR ( $p=0,001$ ) y el notch ( $p=0,028$ ), (Figura 27 y 28).

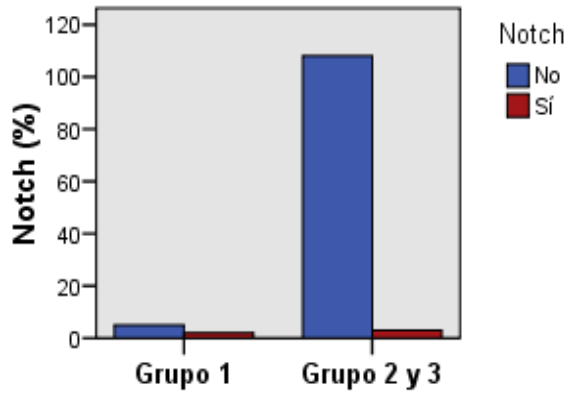
|             | IP      | IR      | Notch (%) |
|-------------|---------|---------|-----------|
| Grupo 1     | 1,2±0,3 | 0,7±0,1 | 37,5      |
| Grupo 2 y 3 | 0,9±0,2 | 0,5±0,0 | 1,4       |
| p           | 0,007   | 0,001   | 0,028     |

**Tabla 29.** Estudio Doppler de las arterias uterinas del grupo 1 y el grupo 2 y 3.

IP: índice de pulsatilidad medio; IR: índice de resistencia medio.



**Figura 27.** Diagramas de cajas en el que se muestra la distribución del IP e IR en el grupo 1 y grupo 2 y 3.



*Figura 28. Diagrama de barras en el que se muestra la frecuencia de notch en el grupo 1 y el grupo 2 y 3*

## IV.4 Estudio analítico

### *IV.4.1 Comparación de marcadores de variables cuantitativas*

Se compararon los marcadores de estudio en los distintos grupos en el primer y segundo trimestre de gestación.

#### *IV.4.1.1 Primer trimestre de gestación*

En primer lugar, se compararon los parámetros bioquímicos clásicos y el parámetro hematológico entre la población de riesgo (grupo 1 y 2) y el grupo control (grupo 3). No se observaron diferencias significativas para ningún marcador estudiado (Tabla 30).

| Variable                                | Grupo 1 y 2  | Grupo 3      | P     |
|---|--------------|--------------|-------|
| <b>Creatinina</b> (mg/dl)               | 0,5[0,4-0,6] | 0,5[0,5-0,6] | 0,390 |
| <b>Colesterol</b> (mg/dl)               | 208,1±33,9   | 201,2±44,6   | 0,302 |
| <b>GOT</b> (U/L)                        | 16[13-19]    | 16[13-19]    | 0,833 |
| <b>GPT</b> (U/L)                        | 14[11-18]    | 13[10-20]    | 0,981 |
| <b>LDH</b> (U/L)                        | 156,4±26,2   | 151,4±39,8   | 0,391 |
| <b>Plaquetas</b> (x10 <sup>3</sup> /μL) | 278,4±65,9   | 269,5±65,7   | 0,424 |

**Tabla 30.** Comparación de los parámetros bioquímicos clásicos y hematológicos en la población de riesgo y grupo control en el primer trimestre de gestación.

GOT: Aspartato aminotransferasa; GPT: Alanino aminotransferasa; LDH: Lactato- deshidrogenasa.

En segundo lugar, se compararon los parámetros bioquímicos clásicos y el parámetro hematológico en los tres grupos de estudio y no se encontraron diferencias significativas para ninguno de ellos (Tabla 31). Del mismo modo ocurriría al comparar el grupo 1 con el grupo 2 o comparar el grupo 1 con el grupo 3 o el grupo 1 con el 2 y 3.

| Variable                                | Grupo 1      | Grupo 2      | Grupo 3      | P     |
|---|--------------|--------------|--------------|-------|
| <b>Creatinina</b> (mg/dl)               | 0,5[0,4-0,7] | 0,5[0,4-0,6] | 0,5[0,5-0,6] | 0,600 |
| <b>Colesterol</b> (mg/dl)               | 212,5±42,7   | 207,5±33,1   | 201,2±44,6   | 0,557 |
| <b>GOT</b> (U/L)                        | 11[21-24]    | 16[13-19]    | 16[13-19]    | 0,617 |
| <b>GPT</b> (U/L)                        | 17[11-37]    | 14[11-18]    | 13[10-20]    | 0,547 |
| <b>LDH</b> (U/L)                        | 157,7±43,7   | 151,4±49,8   | 151,4±39,8   | 0,690 |
| <b>Plaquetas</b> (x10 <sup>3</sup> /μL) | 254,7±79,7   | 286,6±61,4   | 269,5±65,7   | 0,405 |

**Tabla 31.** Comparación de los parámetros bioquímicos clásicos y hematológicos en los tres grupos de estudio en el primer trimestre de gestación.

GOT: Aspartato aminotransferasa; GPT: Alanino aminotransferasa; LDH: Lactato- deshidrogenasa.



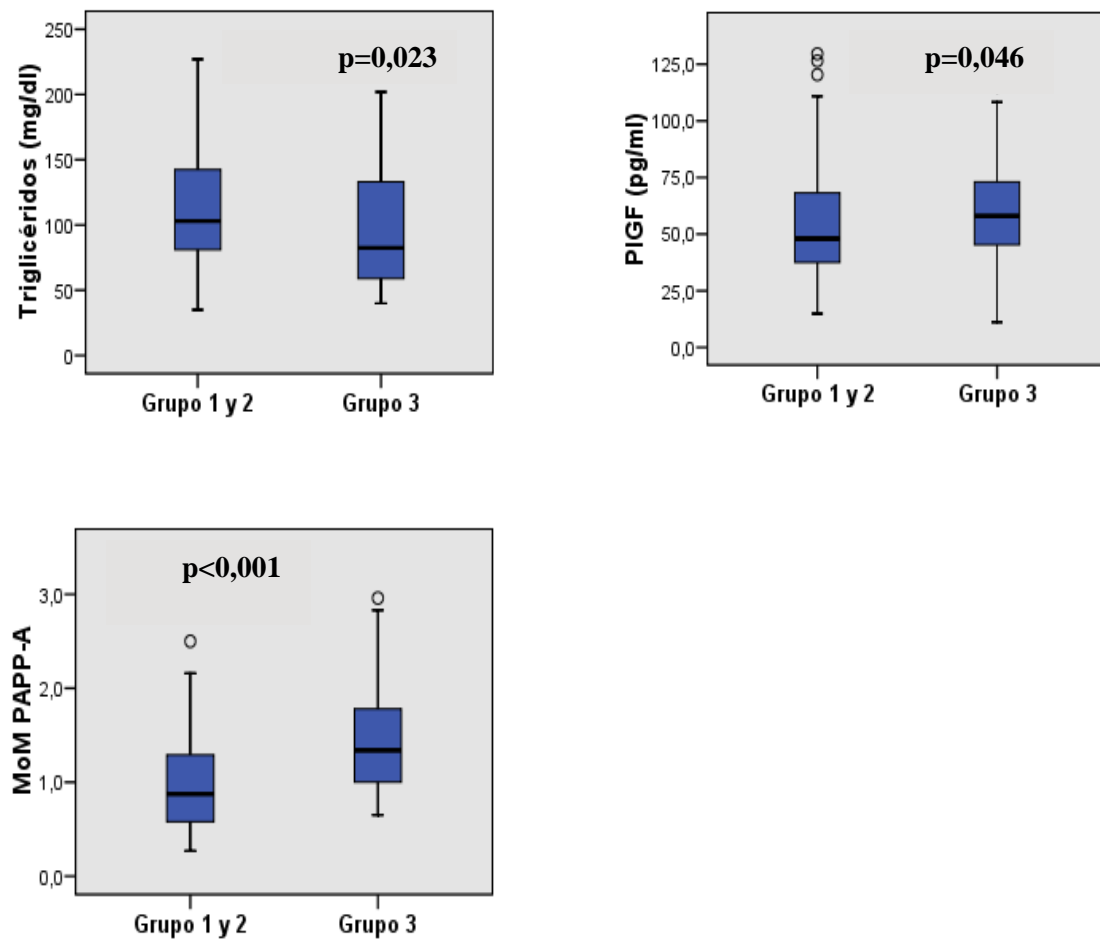
La comparación de los marcadores propuestos como posibles predictores de PE entre el grupo de riesgo (grupo 1 y 2) y el grupo control (grupo 3) se muestra en la Tabla 32.

| Variable            | Grupo 1 y 2            | Grupo 3                | P                |
|---------------------|------------------------|------------------------|------------------|
| Ácido úrico (mg/dl) | 2,9±0,7                | 2,8±0,6                | 0,246            |
| TG (mg/dl)          | <b>113,2±44,5</b>      | <b>95,7±44,1</b>       | <b>0,023</b>     |
| sFlt-1 (pg/ml)      | 1352[970-1653]         | 1323[1119-1594]        | 0,796            |
| PlGF (pg/ml)        | <b>47,9[37,4-68,7]</b> | <b>58,1[44,8-73,2]</b> | <b>0,046</b>     |
| Ratio sFlt-1/PlGF   | 27[19-37]              | 23[16-32]              | 0,202            |
| MoM PAPP-A          | <b>0,8[0,5-1,2]</b>    | <b>1,3[0,9-1,7]</b>    | <b>&lt;0,001</b> |
| CA125 (U/ml)        | 19,7[13,1 -26,2]       | 19,9[13,5-31,7]        | 0,216            |
| ECA (U/L)           | 34,2±13,1              | 32,2±12,7              | 0,371            |

**Tabla 32.** Comparación de los marcadores propuestos como predictores de PE en la población de riesgo y grupo control en el primer trimestre de gestación.

CA 125: Antígeno sérico CA125; ECA: Enzima convertidora de angiotensina; MoM PAPP-A: múltiplo de la mediana de la proteína plasmática A asociada al embarazo; PlGF: factor de crecimiento placentario; sFlt-1: forma soluble de la tirosín kinasa 1; TG: triglicéridos.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los triglicéridos ( $p=0,023$ ), PlGF ( $p=0,046$ ) y el MoM PAPP-A ( $p<0,001$ ), como se puede observar en la Tabla 32 y Figura 29.



*Figura 29. Diagramas de cajas en el que se muestra la distribución de los marcadores predictores de PE en el grupo de riesgo y grupo control en el primer trimestre de gestación.*

En segundo lugar, se comparó los marcadores propuestos como posibles predictores de PE (Tabla 33 y Figura 30) en los tres grupos de estudio. Se encontraron diferencias significativas para los triglicéridos ( $p=0,011$ ), PIGF ( $p=0,005$ ), el ratio sFlt-1/PIGF ( $p=0,038$ ) y el MoM PAPP-A ( $p<0,001$ ).

| Variable            | Grupo 1                | Grupo 2                | Grupo 3                | p                |
|---------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------|
| Ácido úrico (mg/dl) | 2,6±0,6                | 3±0,7                  | 2,8±0,6                | 0,171            |
| TG (mg/dl)          | <b>114,4±51,1</b>      | <b>115,8±40,7</b>      | <b>95,7±44,1</b>       | <b>0,011</b>     |
| sFlt-1 (pg/ml)      | 1284[1231-1561]        | 1365[939-1669]         | 1323[1119-1594]        | 0,964            |
| PIGF (pg/ml)        | <b>33,7[27,1-43,6]</b> | <b>50,1[39,4-71,2]</b> | <b>58,1[44,8-73,2]</b> | <b>0,005</b>     |
| Ratio sFlt-1/PIGF   | <b>40[25-50]</b>       | <b>25[17-36]</b>       | <b>23[16-32]</b>       | <b>0,038</b>     |
| MoM PAPP-A          | <b>0,8[0,5-1,1]</b>    | <b>0,9[0,5-1,3]</b>    | <b>1,3[0,9-1,7]</b>    | <b>&lt;0,001</b> |
| CA125 (U/ml)        | 22,8[13,5-40,2]        | 18,7[12,3-25,9]        | 19,9[13,5-31,7]        | 0,229            |
| ECA (U/L)           | 34,9±8,9               | 34,1±13,6              | 32,2±12,7              | 0,661            |

**Tabla 33. Comparación de los marcadores propuestos como predictores de PE en los tres grupos de estudio en el primer trimestre de gestación.**

CA 125: Antígeno sérico CA125; ECA: Enzima convertidora de angiotensina; MoM PAPP-A: múltiplo de la mediana de la proteína plasmática A asociada al embarazo; PIGF: factor de crecimiento placentario; sFlt-1: forma soluble de la tirosín kinasa 1; TG: triglicéridos.

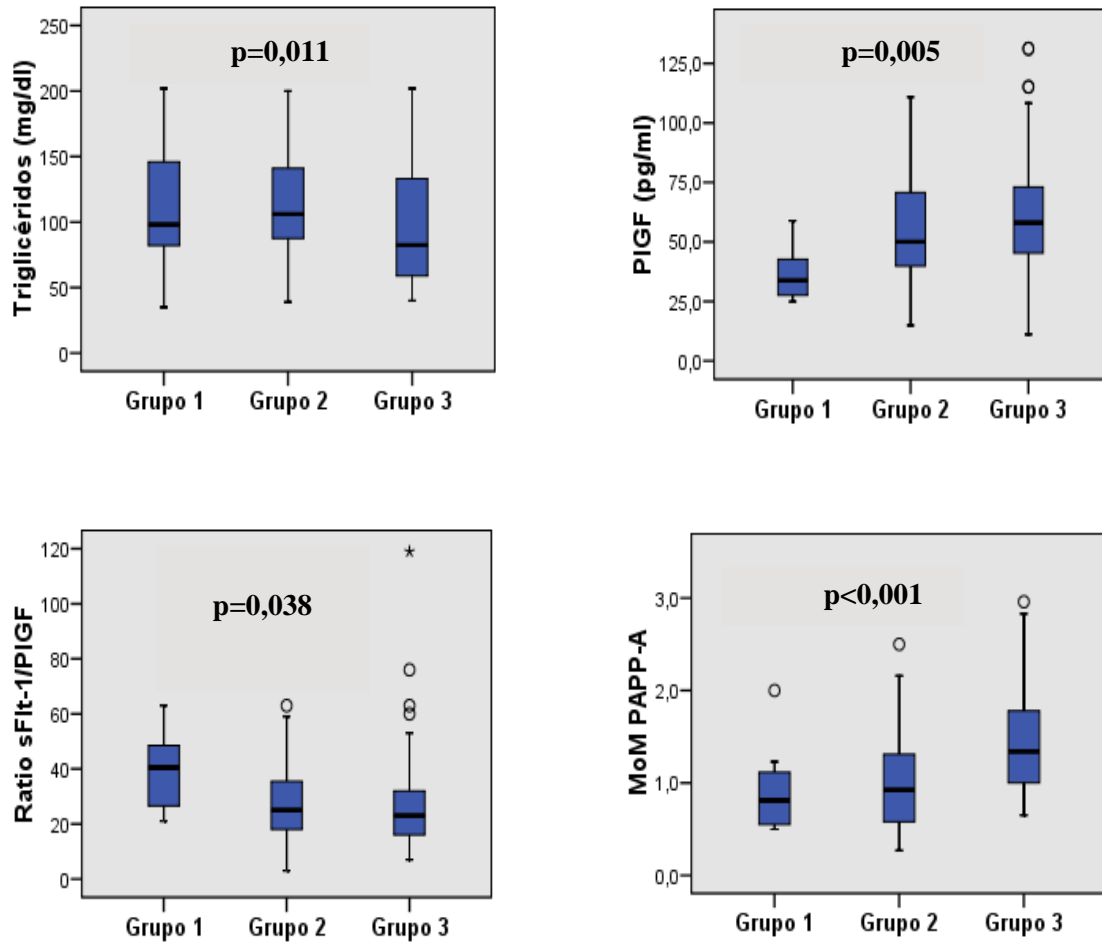


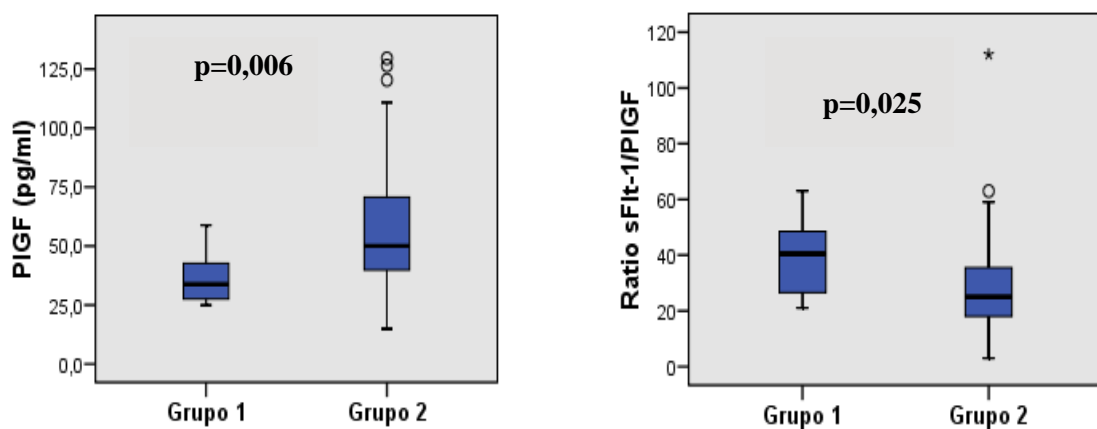
Figura 30. Diagramas de cajas en el que se muestra la distribución de los marcadores predictores de PE en los tres grupos de estudio en el primer trimestre de gestación.

En tercer lugar, se comparó el grupo de riesgo que desarrolló PE (grupo 1) con el grupo de riesgo que no la desarrolló (grupo 2), (Tabla 34 y Figura 31) sólo se encontraron diferencias significativas para los siguientes marcadores: PIGF ( $p=0,006$ ) y el ratio sFlt-1/PIGF ( $p=0,025$ ).

| Variable            | Grupo 1                | Grupo 2                | P            |
|---------------------|------------------------|------------------------|--------------|
| Ácido úrico (mg/dl) | 2,6±0,6                | 3±0,7                  | 0,167        |
| TG (mg/dl)          | 114,4±51,1             | 115,8±40,7             | 0,862        |
| sFlt-1 (pg/ml)      | 1284[1231-1561]        | 1365[939-1669]         | 0,985        |
| PIGF (pg/ml)        | <b>33,7[27,1-43,6]</b> | <b>50,1[39,4-71,2]</b> | <b>0,006</b> |
| Ratio sFlt-1/PIGF   | <b>40[25-50]</b>       | <b>25[17-36]</b>       | <b>0,025</b> |
| MoM PAPP-A          | 0,8[0,5-1,1]           | 0,9[0,5-1,3]           | 0,718        |
| CA125 (U/ml)        | 22,8[13,5-40,2]        | 18,7[12,3-25,9]        | 0,261        |
| ECA (U/L)           | 34,9±8,9               | 34,1±13,6              | 0,866        |

**Tabla 34. Comparación de los marcadores propuestos como predictores de PE en el grupo 1 y 2 en el primer trimestre de gestación.**

CA 125: Antígeno sérico CA125; ECA: Enzima convertidora de angiotensina; MoM PAPP-A: múltiplo de la mediana de la proteína plasmática A asociada al embarazo; PIGF: factor de crecimiento placentario; sFlt-1: forma soluble de la tirosín kinasa 1; TG triglicéridos.



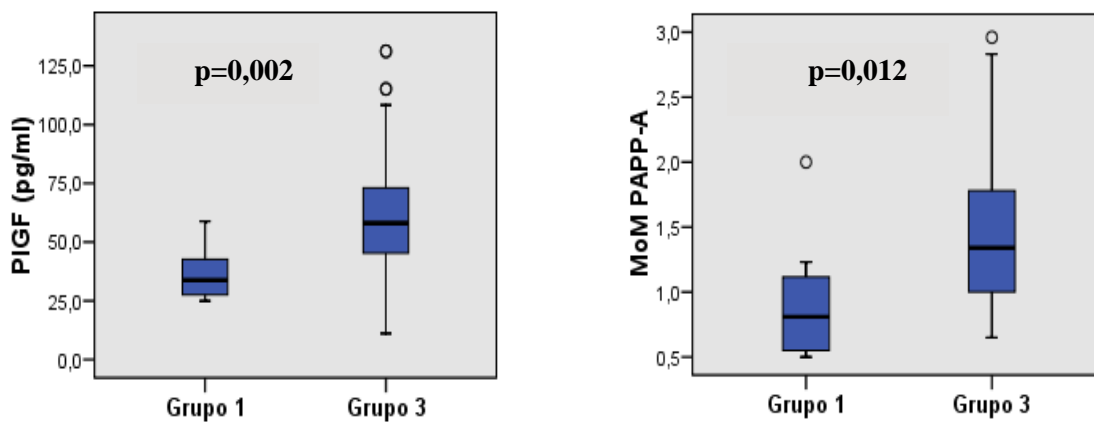
**Figura 31. Diagramas de cajas en el que se muestra la distribución de los marcadores predictores de PE en el grupo 1 y 2 en el primer trimestre de gestación.**

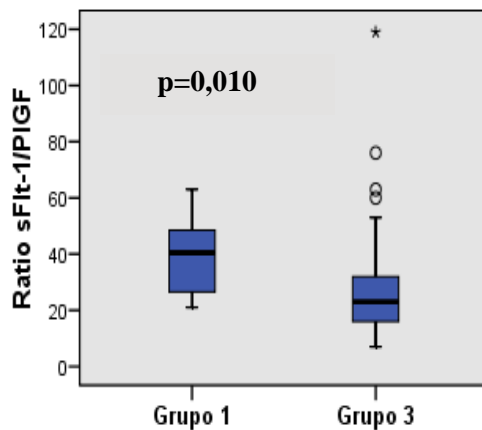
En cuarto lugar, se comparó el grupo de riesgo que desarrollo PE (grupo 1) y el grupo control (grupo 3) (Tabla 35 y Figura 32) y se encontraron diferencias significativas para los siguientes marcadores: PIGF ( $p=0,002$ ), ratio sFlt-1/PIGF ( $p=0,012$ ) y el MoM PAPP-A ( $p=0,010$ ).

| Variable            | Grupo 1                | Grupo 3                | p            |
|---------------------|------------------------|------------------------|--------------|
| Ácido úrico (mg/dl) | 2,6±0,6                | 2,8±0,6                | 0,376        |
| TG (mg/dl)          | 114,4±51,1             | 95,7±44,1              | 0,382        |
| sFlt-1 (pg/ml)      | 1284[1231-1561]        | 1323[1119-1594]        | 0,994        |
| PIGF (pg/ml)        | <b>33,7[27,1-43,6]</b> | <b>58,1[44,8-73,2]</b> | <b>0,002</b> |
| Ratio sFlt-1/PIGF   | <b>40[25-50]</b>       | <b>23[16-32]</b>       | <b>0,012</b> |
| MoM PAPP-A          | <b>0,8[0,5-1,1]</b>    | <b>1,3[0,9-1,7]</b>    | <b>0,010</b> |
| CA125 (U/ml)        | 22,8[13,5-40,2]        | 19,9[13,5-31,7]        | 0,580        |
| ECA (U/L)           | 34,9±8,9               | 32,2±12,7              | 0,560        |

**Tabla 35. Comparación de los marcadores propuestos como predictores de PE en el grupo 1 y 3 en el primer trimestre de gestación.**

CA 125: Antígeno sérico CA125; ECA: Enzima convertidora de angiotensina; MoM PAPP-A: múltiplo de la mediana de la proteína plasmática A asociada al embarazo; PIGF: factor de crecimiento placentario; sFlt-1: forma soluble de la tirosín kinasas 1; TG triglicéridos.





**Figura 32.** Diagramas de cajas en el que se muestra la distribución de los marcadores predictores de PE en el grupo 1 y 3 en el primer trimestre de gestación.

Por último, se comparó el grupo de riesgo que desarrolló PE (grupo 1) y el resto de gestantes que no la desarrollaron (grupo 2 y 3) y se encontraron diferencias significativas para el PIGF ( $p=0,003$ ) y el ratio sFlt-1/PIGF ( $p=0,015$ ).

| Variable            | Grupo 1                | Grupo 2 y 3            | P            |
|---------------------|------------------------|------------------------|--------------|
| Ácido úrico (mg/dl) | 2,6±0,6                | 2,9±0,6                | 0,257        |
| TG (mg/dl)          | 114,4±51,1             | 103,3±44,1             | 0,659        |
| sFlt-1 (pg/ml)      | 1284[1231-1561]        | 1341[1034-1607]        | 0,989        |
| PIGF (pg/ml)        | <b>33,7[27,1-43,6]</b> | <b>55,4[42,4-72,5]</b> | <b>0,003</b> |
| Ratio sFlt-1/PIGF   | <b>40[25-50]</b>       | <b>24[17-34]</b>       | <b>0,015</b> |
| MoM PAPP-A          | 0,8[0,5-1,1]           | 1,1[0,7-1,6]           | 0,097        |
| CA125 (U/ml)        | 22,8[13,5-40,2]        | 19,8[13,1-29,5]        | 0,414        |
| ECA (U/L)           | 34,9±8,9               | 33,1±13,1              | 0,693        |

**Tabla 36.** Comparación de los marcadores propuestos como predictores de PE en el grupo 1 y grupo 2 y 3 en el primer trimestre de gestación.

CA 125: Antígeno sérico CA125; ECA: Enzima convertidora de angiotensina; MoM PAPP-A: múltiplo de la mediana de la proteína plasmática A asociada al embarazo; PIGF: factor de crecimiento placentario; sFlt-1: forma soluble de la tirosín kinasa 1; TG triglicéridos.

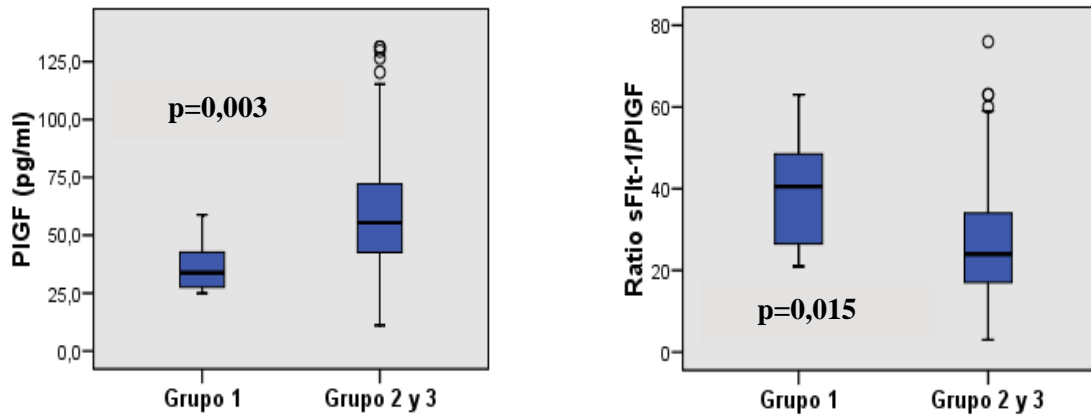


Figura 33. Diagramas de cajas en el que se muestra la distribución de los marcadores predictores de PE en el grupo 1 y grupo 2 y 3 en el primer trimestre de gestación.

#### IV.4.1.2 Segundo trimestre de gestación

Al analizar los resultados de los parámetros bioquímicos clásicos y el parámetro hematológico en el segundo trimestre de gestación (Tabla 37) en la población de riesgo (grupo 1 y 2) y el grupo control (grupo 3) sólo se encontraron diferencias significativas para el colesterol ( $p < 0,001$ ).

| Variable                                | Grupo 1 y 2       | Grupo 3           | p                |
|---|-------------------|-------------------|------------------|
| Creatinina (mg/dl)                      | 0,4[0,4-0,5]      | 0,5[0,4-0,5]      | 0,603            |
| Colesterol (mg/dl)                      | <b>233,6±36,2</b> | <b>195,8±48,9</b> | <b>&lt;0,001</b> |
| GOT (U/L)                               | 17[13-23]         | 15[13-18]         | 0,057            |
| GPT (U/L)                               | 10[14-24]         | 11[9-16]          | 0,066            |
| LDH (U/L)                               | 148,1±25,2        | 154,7±43,8        | 0,320            |
| Plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 269,2±68,5        | 259,4±73,1        | 0,626            |

Tabla 37. Comparación de los parámetros bioquímicos clásicos en la población de riesgo y grupo control en el segundo trimestre de gestación.

GOT: Aspartato aminotransferasa; GPT: Alanino aminotrasferasa; LDH: Lactato- deshidrogenasa.



En segundo lugar, se compararon los tres grupos de estudio (Tabla 38) y se obtuvieron diferencias significativas para el colesterol ( $p < 0,001$ ).

| Variable                                       | Grupo 1           | Grupo 2           | Grupo 3           | p                |
|--|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| <b>Creatinina</b> (mg/dl)                      | 0,5[0,4-0,6]      | 0,4[0,4-0,5]      | 0,5[0,4-0,5]      | 0,675            |
| <b>Colesterol</b> (mg/dl)                      | <b>234,3±41,2</b> | <b>233,2±35,9</b> | <b>195,8±48,9</b> | <b>&lt;0,001</b> |
| <b>GOT</b> (U/L)                               | 21[11-23]         | 17[13-23]         | 15[13-18]         | 0,112            |
| <b>GPT</b> (U/L)                               | 10 [12-31]        | 15[11-33]         | 11[9-16]          | 0,070            |
| <b>LDH</b> (U/L)                               | 153,5±24,6        | 148,1±25,4        | 154,7±43,8        | 0,569            |
| <b>Plaquetas</b> ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) | 249,3±84,1        | 271,2±66,4        | 259,4±73,1        | 0,636            |

**Tabla 38.** Comparación de los parámetros bioquímicos clásicos en los tres grupos de estudio en el segundo trimestre de gestación.

*GOT: Aspartato aminotransferasa; GPT: Alanino aminotransferasa; LDH: Lactato- deshidrogenasa.*

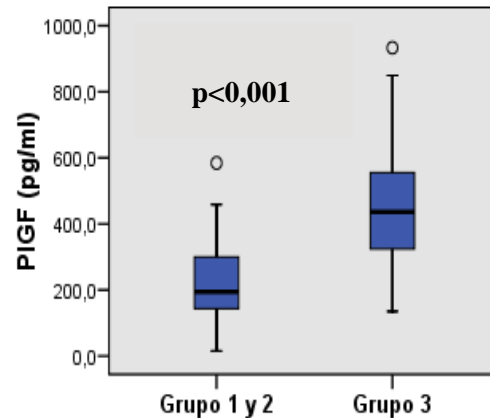
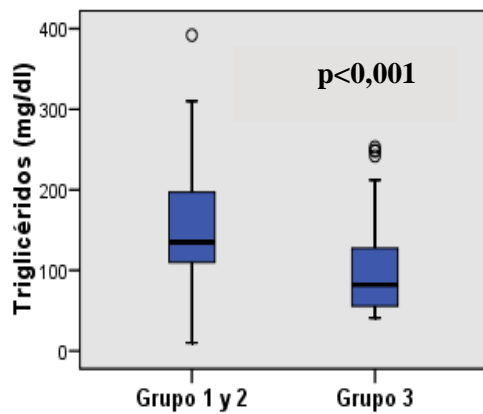
Al igual como ocurría en el primer trimestre de gestación, no hemos encontrado diferencias significativas para estos marcadores, al comparar el grupo 1 con el grupo 2 o comparar el grupo 1 con el grupo 3 o el grupo 1 con el 2 y 3.

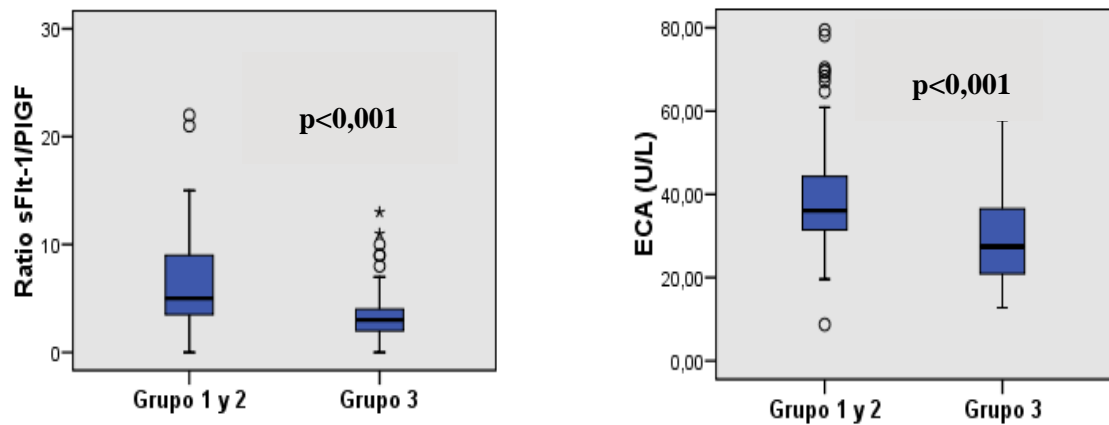
Respecto a los marcadores propuestos como posibles predictores de PE (Tabla 39 y Figura 34) encontramos diferencias significativas entre la población de riesgo (grupo 1 y 2) y el grupo control (grupo 3) para los triglicéridos ( $p < 0,001$ ), PIGF ( $p < 0,001$ ), el ratio sFlt-1/PIGF ( $p < 0,001$ ) y la ECA ( $p < 0,001$ ).

| Variable            | Grupo 1 y 2        | Grupo 3            | P                |
|---------------------|--------------------|--------------------|------------------|
| Ácido úrico (mg/dl) | 3,2±0,8            | 3,1±0,8            | 0,153            |
| TG (mg/dl)          | <b>152,2±66,2</b>  | <b>104,1±62,6</b>  | <b>&lt;0,001</b> |
| sFlt-1 (pg/ml)      | 1334 [958-1993]    | 1499[948-2033]     | 0,241            |
| PIGF (pg/ml)        | <b>255,4±187,3</b> | <b>457,2±183,2</b> | <b>&lt;0,001</b> |
| Ratio sFlt-1/PIGF   | <b>3[5-9]</b>      | <b>3[2-4]</b>      | <b>&lt;0,001</b> |
| CA125 (U/ml)        | 17,7±6,4           | 17,4±9,3           | 0,845            |
| ECA (U/L)           | <b>40,2±14,1</b>   | <b>30,4±12,2</b>   | <b>&lt;0,001</b> |

**Tabla 39. Comparación de los marcadores propuestos como predictores de PE en la población de riesgo y grupo control en el segundo trimestre de gestación.**

CA 125: Antígeno sérico CA125; ECA: Enzima convertidora de angiotensina; PIGF: factor de crecimiento placentario; sFlt-1: forma soluble de la tirosín kinasa 1; TG triglicéridos.





**Figura 34.** Diagramas de cajas en el que se muestra la distribución de los marcadores predictores de PE en la población de riesgo y el grupo control en el segundo trimestre de gestación

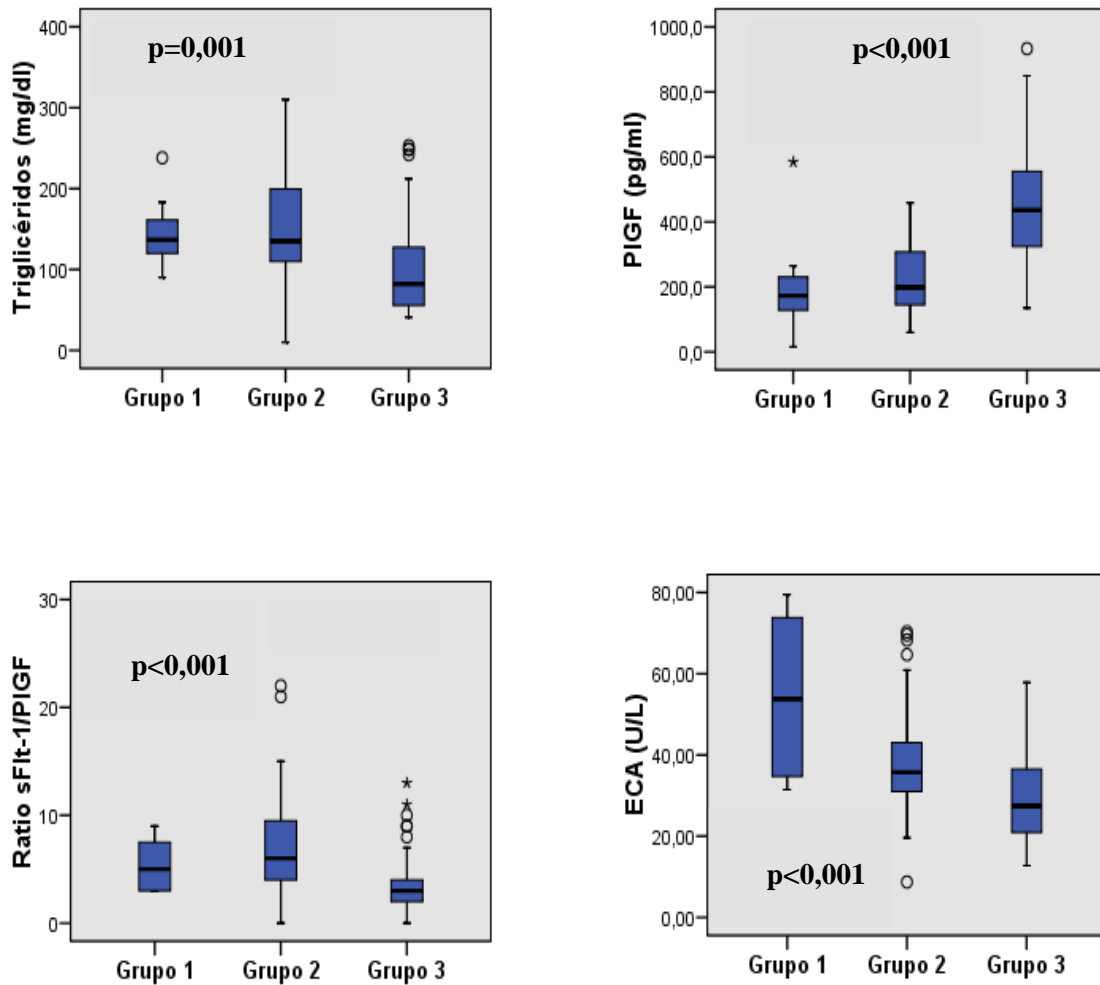
En segundo lugar, se comparó los marcadores propuestos como predictores de PE en los tres grupos de estudio (Tabla 40 y Figura 35).

| Variable            | Grupo 1            | Grupo 2            | Grupo 3            | p                |
|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------|
| Ácido úrico (mg/dl) | 3,6±1,4            | 3,2±0,7            | 3,1±0,8            | 0,175            |
| TG (mg/dl)          | <b>145,3±46,2</b>  | <b>153,4±68,1</b>  | <b>104,1±62,6</b>  | <b>0,001</b>     |
| sFlt-1 (pg/ml)      | 1038[968-1840]     | 1271[956-1993]     | 1499[948-2033]     | 0,367            |
| PlGF (pg/ml)        | <b>207,1±168,1</b> | <b>262,2±190,3</b> | <b>457,2±183,2</b> | <b>&lt;0,001</b> |
| Ratio sFlt-1/PlGF   | <b>5[3-8]</b>      | <b>6[4-10]</b>     | <b>3[2-4]</b>      | <b>&lt;0,001</b> |
| CA125 (U/ml)        | 17,9±9,2           | 17,6±8,5           | 17,4±9,3           | 0,913            |
| ECA (U/L)           | <b>54,2±21,2</b>   | <b>38,1±12,3</b>   | <b>30,4±12,2</b>   | <b>&lt;0,001</b> |

**Tabla 40.** Comparación de los marcadores propuestos como predictores de PE en los tres grupos de estudio en el segundo trimestre de gestación.

CA 125: Antígeno sérico CA125; ECA: Enzima convertidora de angiotensina; PlGF: factor de crecimiento placentario; sFlt-1: forma soluble de la tirosín kinasa 1; TG triglicéridos.

Se encontraron diferencias significativas en los tres grupos de estudio, para los triglicéridos ( $p=0,001$ ), PIGF ( $p<0,001$ ), el ratio sFlt-1/PIGF ( $p<0,001$ ) y ECA ( $p<0,001$ ).



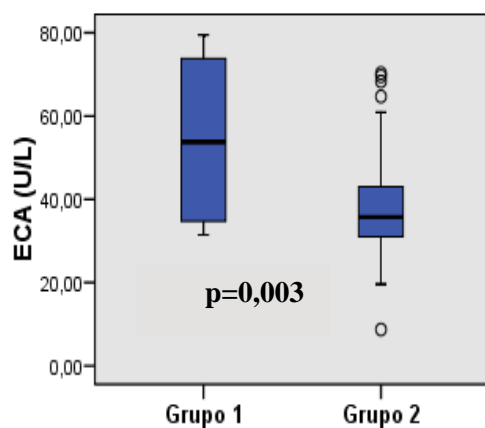
*Figura 35. Diagramas de cajas en el que se muestra la distribución de los marcadores predictores de PE en los tres grupos de estudio en el segundo trimestre de gestación.*

En tercer lugar, se compararon el grupo de riesgo que desarrolló PE (grupo 1) y el grupo de riesgo que no la desarrolló (grupo 2) (Tabla 41 y Figura 36) y se encontraron diferencias significativas para la ECA ( $p=0,003$ ).

| Variable            | Grupo 1        | Grupo 2        | P     |
|---------------------|----------------|----------------|-------|
| Ácido úrico (mg/dl) | 3,6±1,4        | 3,2±0,7        | 0,213 |
| TG (mg/dl)          | 145,3±46,2     | 153,4±68,1     | 0,737 |
| sFlt-1 (pg/ml)      | 1038[968-1840] | 1271[956-1993] | 0,406 |
| PlGF (pg/ml)        | 207,1±168,1    | 262,2±190,3    | 0,444 |
| Ratio sFlt-1/PlGF   | 5[3-8]         | 6[4-10]        | 0,712 |
| CA125 (U/ml)        | 17,9±9,2       | 17,6±8,5       | 0,913 |
| ECA (U/L)           | 54,2±21,2      | 38,1±12,3      | 0,003 |

**Tabla 41.** Comparación de los marcadores propuestos como predictores de PE en el grupo 1 y 2 en el segundo trimestre de gestación.

CA 125: Antígeno sérico CA125; ECA: Enzima convertidora de angiotensina; PlGF: factor de crecimiento placentario; sFlt-1: forma soluble de la tirosín kinasa 1; TG triglicéridos.



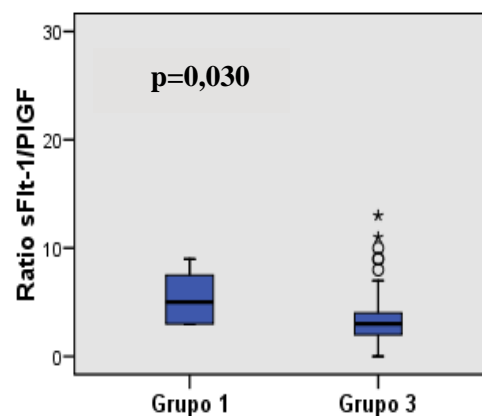
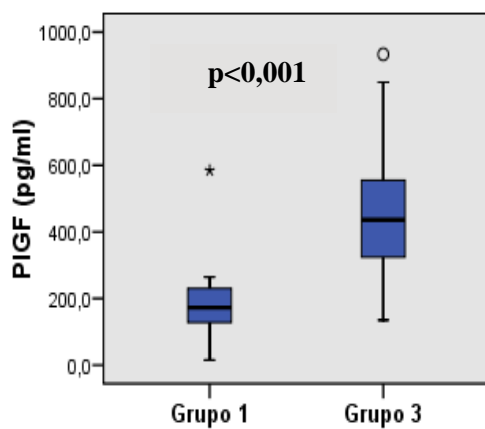
**Figura 36.** Diagrama de cajas en el que se muestra la distribución del marcador predictor de PE en el grupo 1 y 2 en el segundo trimestre de gestación.

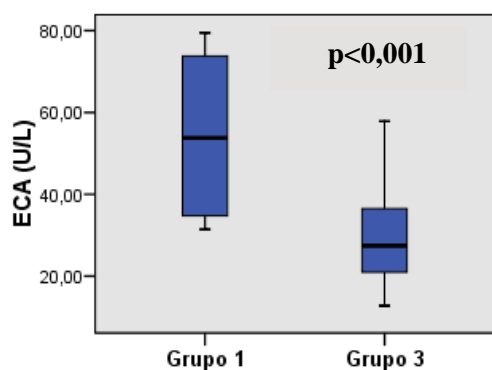
En cuarto lugar, se comparó el grupo de riesgo que desarrolló PE (grupo 1) y el grupo control (grupo 3) (Tabla 42 y Figura 37) y se encontraron diferencias significativas para los siguientes marcadores: PIGF ( $p < 0,001$ ), ratio sFlt-1/PIGF ( $p = 0,030$ ), ECA ( $p < 0,001$ ).

| Variable            | Grupo 1            | Grupo 3            | p                |
|---------------------|--------------------|--------------------|------------------|
| Ácido úrico (mg/dl) | 3,6±1,4            | 3,1±0,8            | 0,132            |
| TG (mg/dl)          | 145,3±46,2         | 104,1±62,6         | 0,084            |
| sFlt-1 (pg/ml)      | 1038[968-1840]     | 1499[948-2033]     | 0,299            |
| PIGF (pg/ml)        | <b>207,1±168,1</b> | <b>457,2±183,2</b> | <b>&lt;0,001</b> |
| Ratio sFlt-1/PIGF   | <b>5[3-8]</b>      | <b>3[2-4]</b>      | <b>0,030</b>     |
| CA125 (U/ml)        | 17,9±9,2           | 17,4±9,3           | 0,818            |
| ECA (U/L)           | <b>54,2±21,2</b>   | <b>30,4±12,2</b>   | <b>&lt;0,001</b> |

**Tabla 42.** Comparación de los marcadores propuestos como predictores de PE en el grupo 1 y 3 en el segundo trimestre de gestación.

CA 125: Antígeno sérico CA125; ECA: Enzima convertidora de angiotensina; PIGF: factor de crecimiento placentario; sFlt-1: forma soluble de la tirosín kinasa 1; TG triglicéridos.





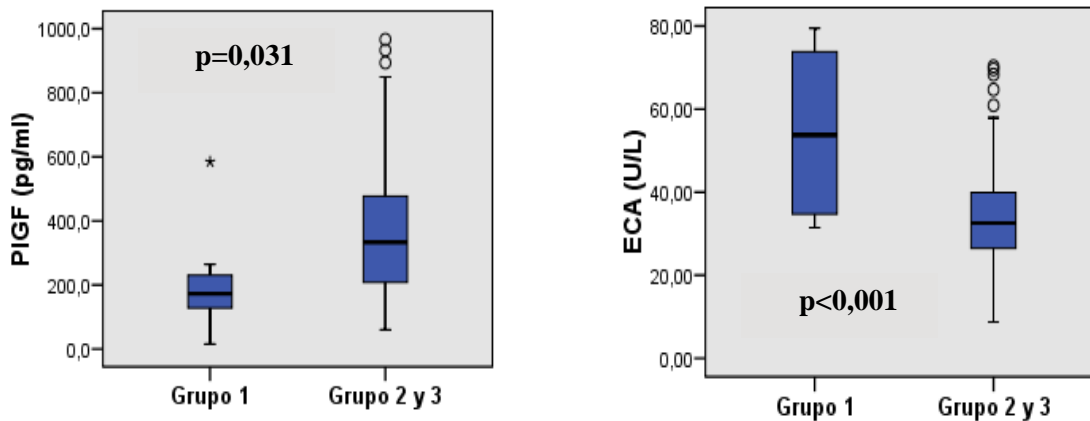
**Figura 37.** Diagramas de cajas en el que se muestra la distribución de los marcadores predictores de PE en el grupo 1 y 3 en el segundo trimestre de gestación.

Por último, se comparó el grupo de riesgo que desarrolló PE (grupo 1) con el resto de gestantes que no la desarrollaron (grupo 2 y 3) y se obtuvieron diferencias significativas para PIGF ( $p=0,031$ ) y la ECA ( $p<0,001$ ).

| Variable            | Grupo 1            | Grupo 2 y 3        | P                |
|---------------------|--------------------|--------------------|------------------|
| Ácido úrico (mg/dl) | 3,6±1,4            | 3,1±0,7            | 0,129            |
| TG (mg/dl)          | 145,3±46,2         | 129,8±66,8         | 0,521            |
| sFlt-1 (pg/ml)      | 1038[968-1840]     | 1488[956-1995]     | 0,262            |
| PIGF (pg/ml)        | <b>207,1±168,1</b> | <b>369,5±205,1</b> | <b>0,031</b>     |
| Ratio sFlt-1/PIGF   | 5[3-8]             | 4[2-7]             | 0,312            |
| CA125 (U/ml)        | 17,9±9,2           | 19,5±6,2           | 0,373            |
| ECA (U/L)           | <b>54,2±21,2</b>   | <b>33,4±12,3</b>   | <b>&lt;0,001</b> |

**Tabla 43.** Comparación de los marcadores propuestos como predictores de PE en el grupo 1 y el grupo 2 y 3 en el segundo trimestre de gestación.

CA 125: Antígeno sérico CA125; ECA: Enzima convertidora de angiotensina; PIGF: factor de crecimiento placentario; sFlt-1: forma soluble de la tirosín kinasa 1; TG triglicéridos.



**Figura 38.** Diagramas de cajas en el que se muestra la distribución de los marcadores predictores de PE en el grupo 1 y grupo 2 y 3 en el segundo trimestre de gestación.

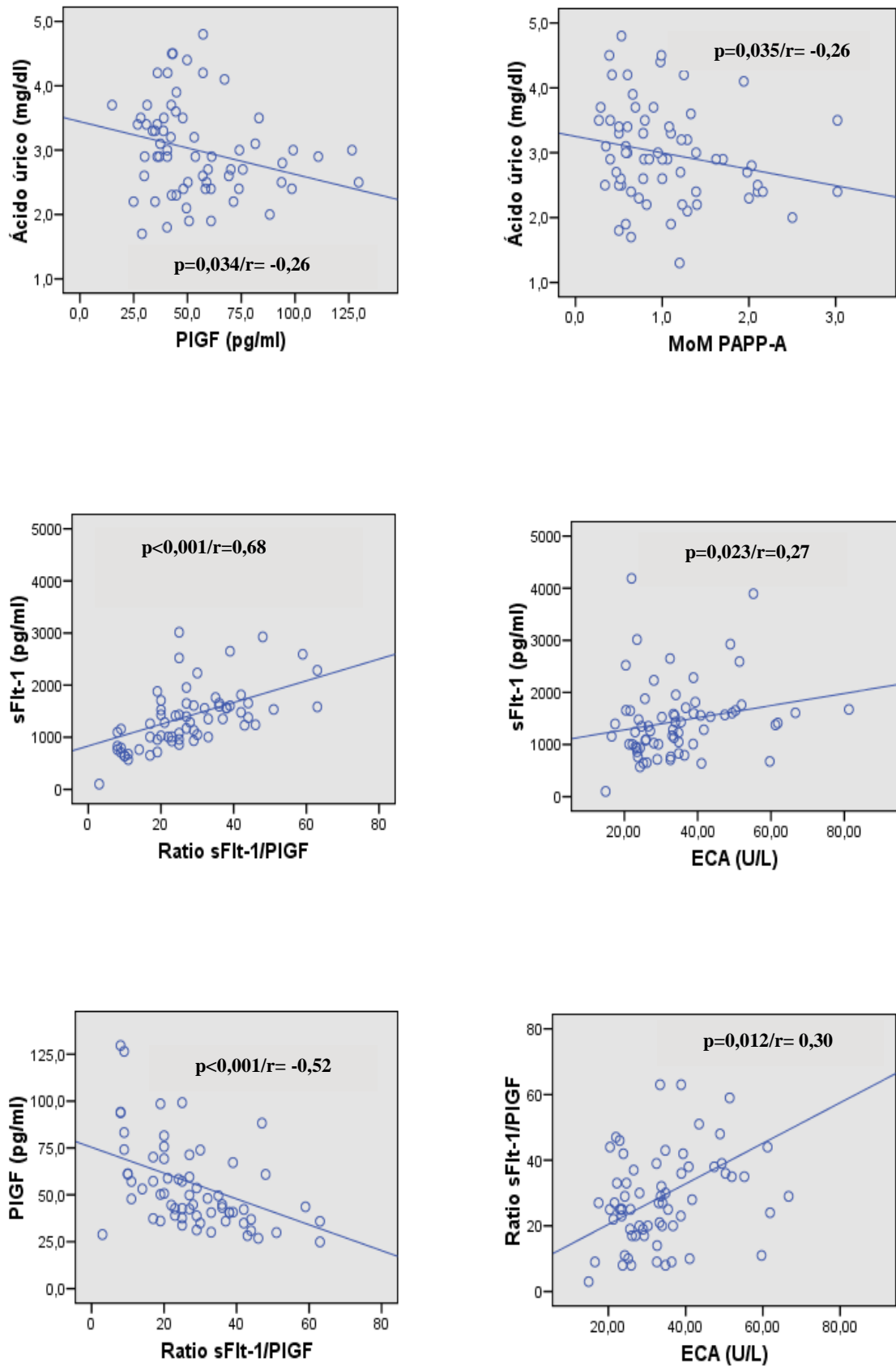
#### IV.4.2 Correlaciones bivariadas

Se han analizado las relaciones de dependencia entre los marcadores propuestos como posibles predictores de PE, estudiando las correlaciones entre ellos. Además se correlacionaron estos marcadores con factores de riesgo de desarrollar PE.

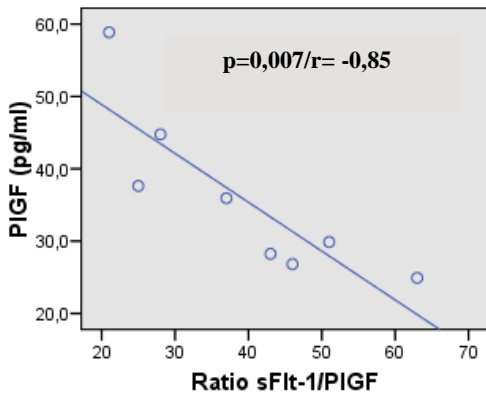
##### IV.4.2.1 Primer trimestre de gestación

En primer lugar, se estudió la correlación entre los marcadores propuestos como posibles predictores de PE de las 68 gestantes (grupo 1 y 2). Todas las correlaciones estadísticamente significativas se muestran en la Figura 39. Se observó una correlación negativa entre: ácido úrico y PIGF ( $p=0,034$ ,  $r= -0,26$ ), ácido úrico y el MoM PAPP-A ( $p=0,035$ ,  $r= -0,26$ ) y el PIGF con el ratio sFlt-1/PIGF ( $p<0,001$ ,  $r= -0,52$ ). Y una correlación positiva fue observada para los siguientes marcadores: sFlt-1 con el ratio sFlt-1/PIGF ( $p<0,001$ ,  $r=0,68$ ), sFlt-1 con la ECA ( $p=0,023$ ,  $r=0,27$ ) y el ratio sFlt-1/PIGF con la ECA ( $p=0,012$ ,  $r=0,30$ ). Se analizaron también dichos marcadores en el grupo con PE ( $n=8$ ) y sólo correlacionó el PIGF con el ratio sFlt-1/PIGF ( $p=0,007$ ,  $r=-0,85$ ) de forma significativa (Figura 40).



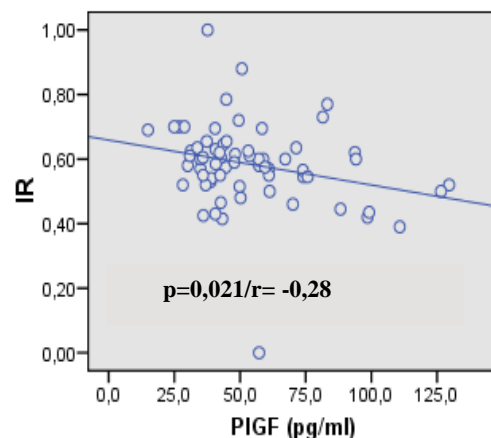
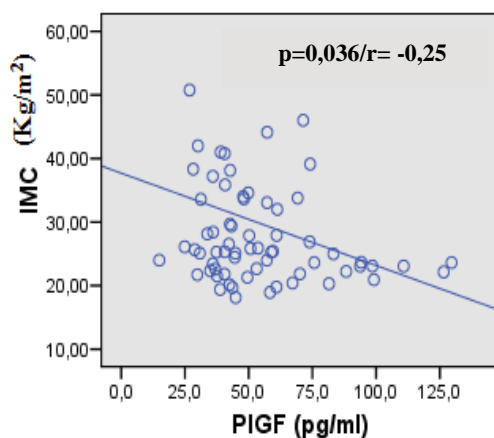


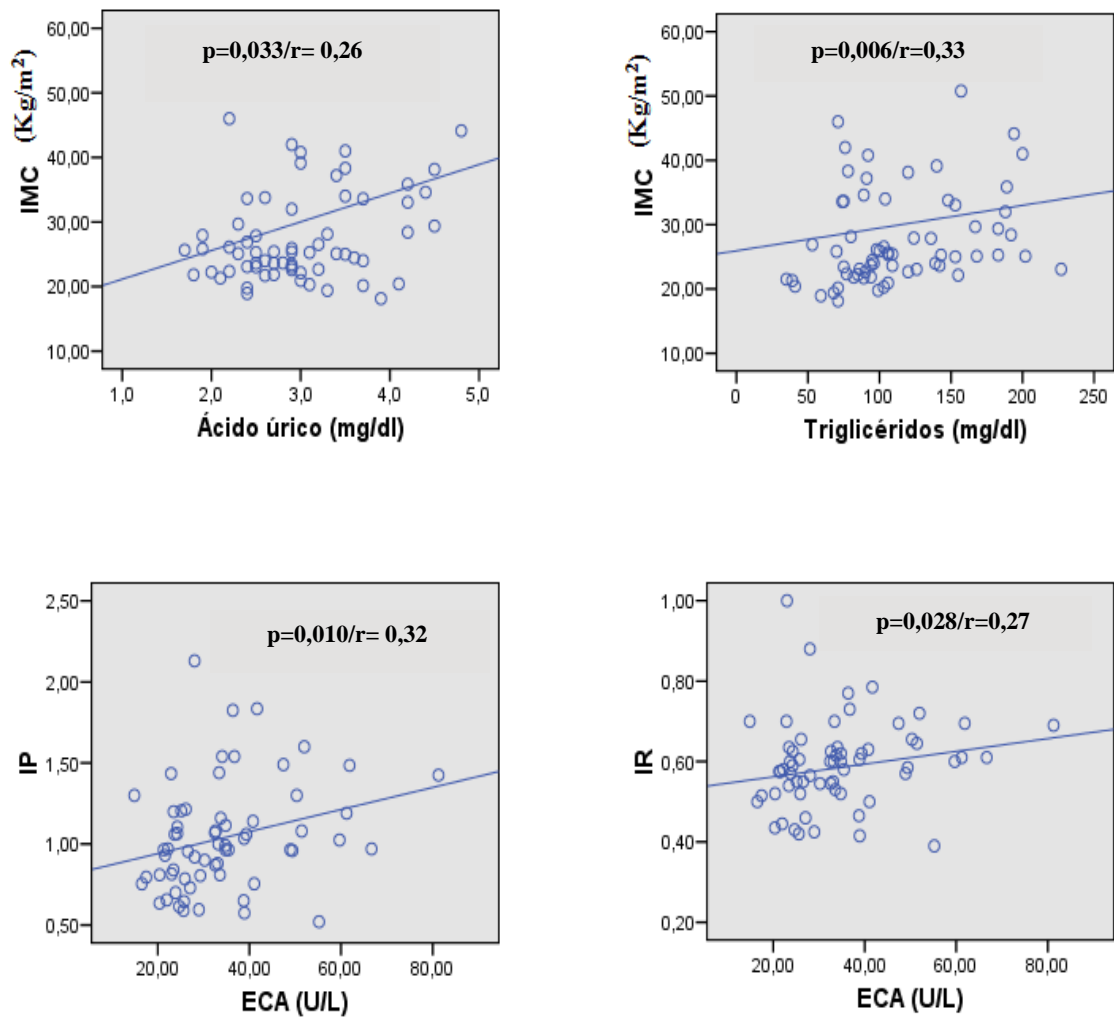
**Figura 39.** Diagrama de dispersión que representa las relaciones de linealidad entre los diferentes marcadores que resultan estadísticamente significativas en el primer trimestre de gestación en la población de riesgo.



**Figura 40.** Diagrama de dispersión que representa las relaciones de linealidad entre los diferentes marcadores que resultan estadísticamente significativas en el primer trimestre de gestación en el grupo con PE.

Además se correlacionaron los factores de riesgo de desarrollar PE (edad, IMC, TA sistólica y diastólica) y los marcadores ecográficos (IP e IR) con los marcadores estudiados como posibles predictores de PE en la población de riesgo (grupo 1 y 2). Se obtuvo una correlación negativa para el PIGF con el IMC ( $p=0,036$ ,  $r= -0,25$ ) y PIGF con el IR ( $p=0,021$ ,  $r= -0,28$ ). Y una correlación positiva para: el ácido úrico con el IMC ( $p=0,033$ ,  $r= 0,26$ ), los triglicéridos con el IMC ( $p=0,006$ ,  $r=0,33$ ), la ECA con IP ( $p=0,010$ ,  $r=0,32$ ) e IR ( $p=0,028$ ,  $r=0,27$ ). En la Figura 41 se muestran las correlaciones estadísticamente significativas.





*Figura 41. Diagrama de dispersión que representa las relaciones de linealidad que resultan estadísticamente significativas entre los factores de riesgo y los marcadores propuestos como predictores de PE en el primer trimestre de gestación.*

IV.4.2.2 Segundo trimestre de gestación

Al igual que en el primer trimestre de gestación, se estudió la correlación entre los marcadores propuestos como posibles predictores de PE de las 68 gestantes (grupo 1 y 2). Todas las correlaciones estadísticamente significativas se muestran en la Figura 42. Se obtuvo una correlación negativa entre el ácido úrico y PIGF ( $p=0,019$ ,  $r= -0,28$ ), y PIGF y el ratio sFlt-1/PIGF ( $p<0,001$ ,  $r=-0,54$ ). Y una correlación positiva para el ácido úrico y el ratio sFlt-1/PIGF ( $p=0,018$ ,  $r=0,29$ ) y sFlt-1 y el ratio sFlt-1/PIGF ( $p<0,001$ ,  $r=0,56$ ).

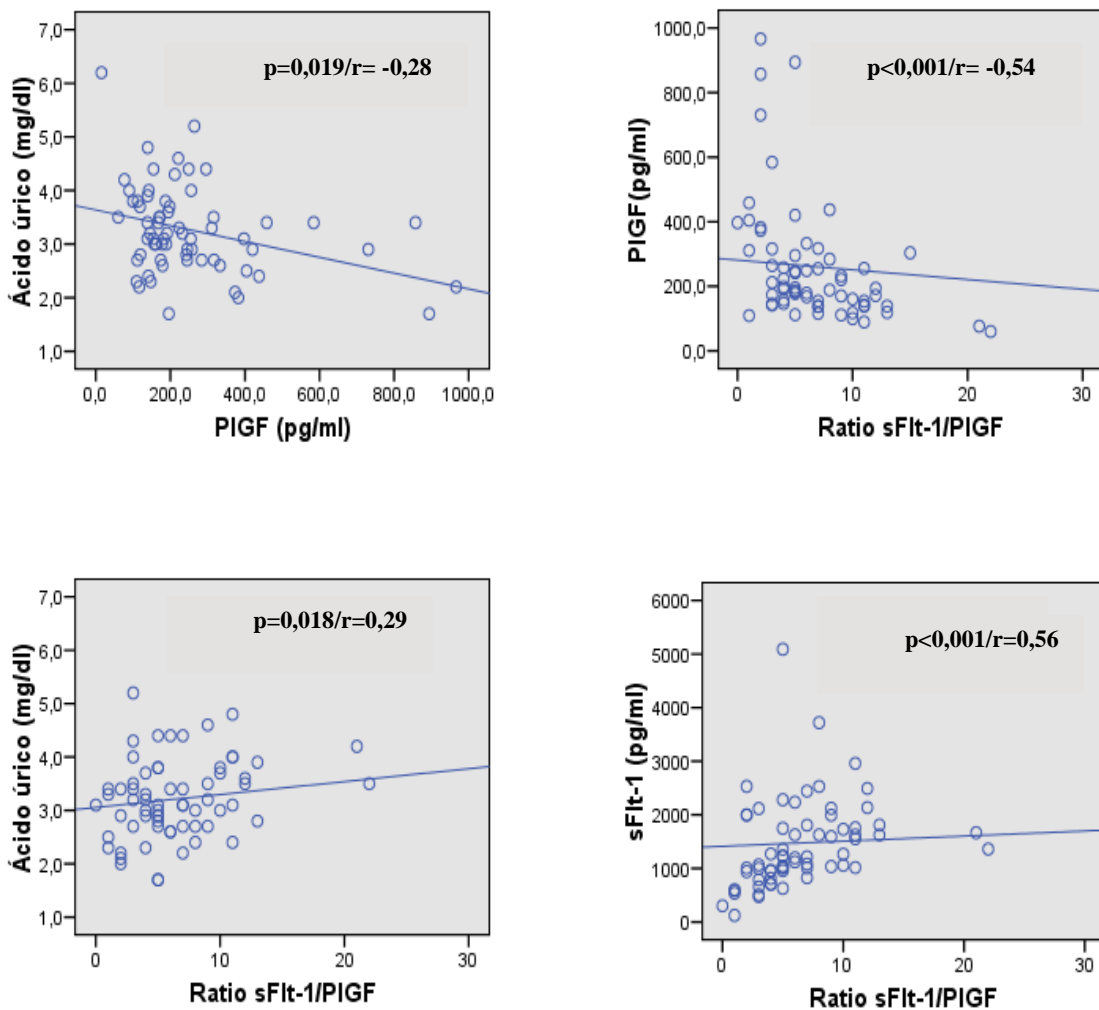
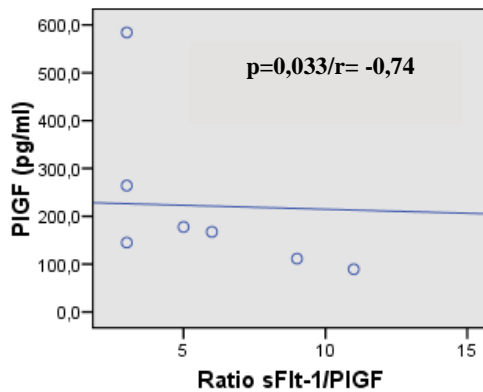


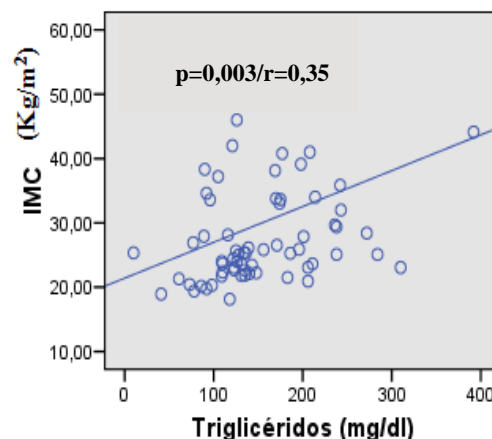
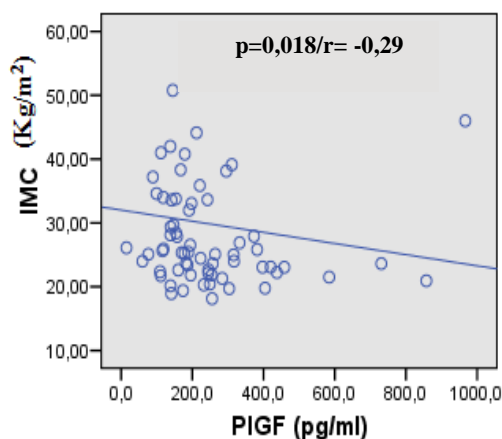
Figura 42. Diagrama de dispersión que representa las relaciones de linealidad entre los diferentes marcadores que resultan estadísticamente significativas en el segundo trimestre de gestación de la población de riesgo.

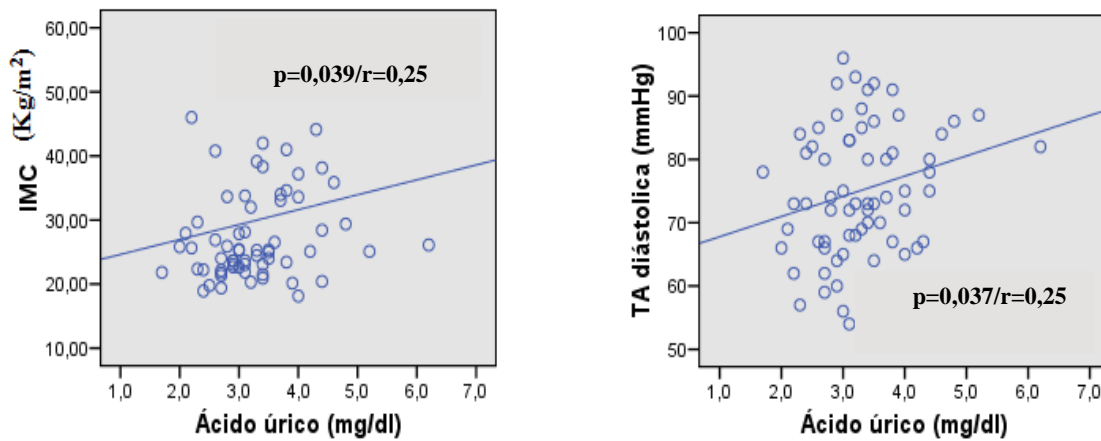
Se analizaron también dichos marcadores en el grupo con PE (grupo 1) y sólo correlacionó el PIGF con el ratio sFlt-1/PIGF ( $p=0,033$ ,  $r= -0,74$ ) de forma significativa como ocurría en el primer trimestre de gestación (Figura 43).



**Figura 43.** Diagrama de dispersión que representa las relaciones de linealidad entre los diferentes marcadores que resultan estadísticamente significativas en el segundo trimestre de gestación del grupo con PE.

Además se correlacionaron los factores de riesgo (edad, IMC, TA sistólica y TA diastólica) y los marcadores ecográficos (IP e IR) con los marcadores propuestos como posibles predictores de desarrollar PE, en la población total de riesgo (grupo 1 y 2). Se obtuvo una correlación negativa entre el IMC y el PIGF ( $p=0,018$ ,  $r= -0,29$ ) y una correlación positiva para: el IMC con los triglicéridos ( $p=0,003$ ,  $r=0,35$ ), el IMC con el ácido úrico ( $p=0,039$ ,  $r=0,25$ ) y la TA diastólica con el ácido úrico ( $p=0,037$ ,  $r=0,25$ ) (Figura 44).





**Figura 44.** Diagrama de dispersión que representa las relaciones de linealidad que resultan estadísticamente significativas entre los factores de riesgo y los marcadores propuestos como predictores de PE en el segundo trimestre de gestación.

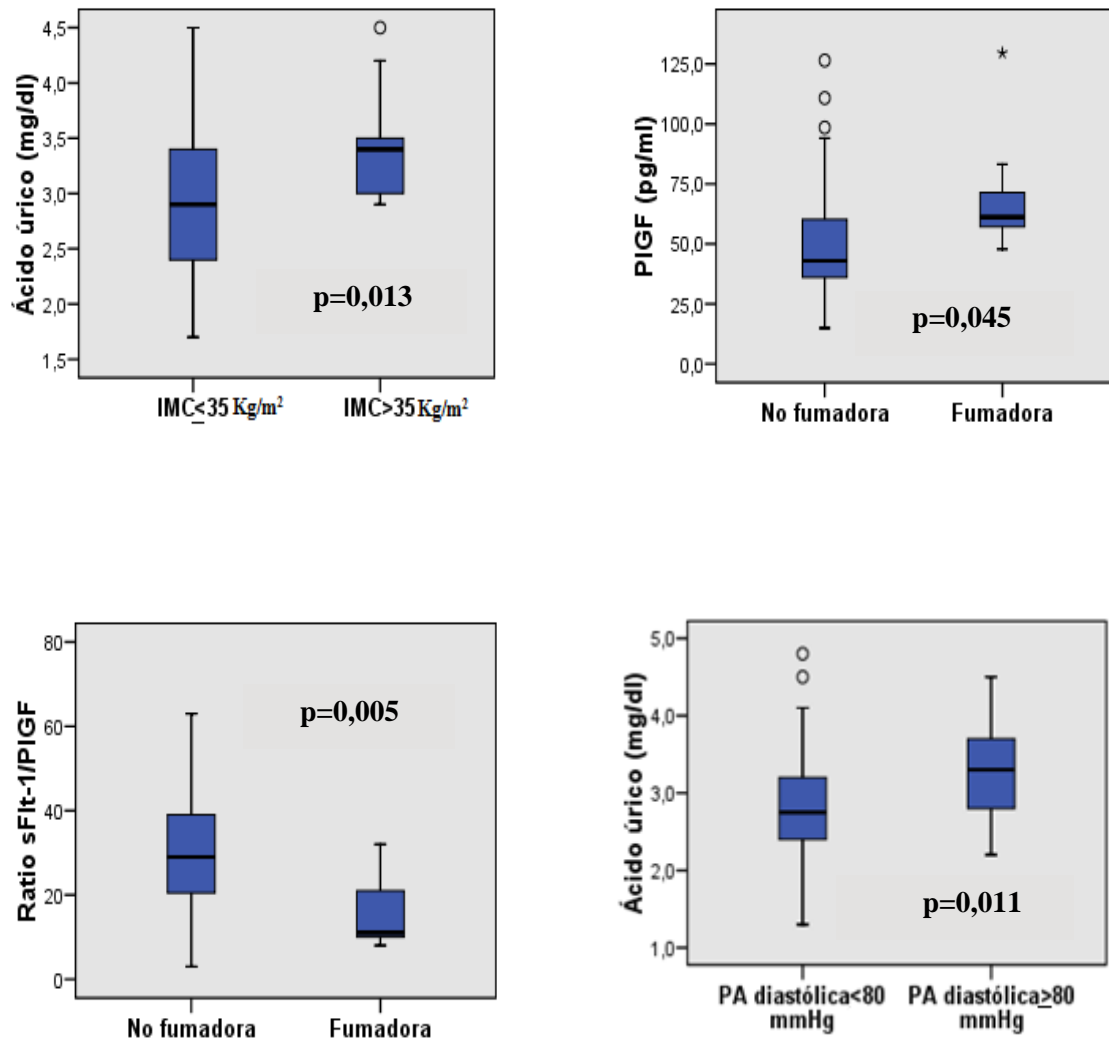
#### ***IV.4.3 Influencia de los factores de riesgo sobre los marcadores propuestos como predictores de preeclampsia***

Se realizó un análisis univariante para estudiar la influencia de los factores de riesgo sobre los marcadores propuestos como predictores de PE en la población de riesgo (Grupo 1 y 2).

##### ***IV.4.3.1 Primer trimestre de gestación***

No se encontraron diferencias significativas en los siguientes factores de riesgo: edad (gestantes >35 años n=30), nuliparidad (n=33), PE previa (n=19), CIR previo (n=11), aborto previo (n=11), embarazo mediante FIV (n=9), trombofilia (n=5) y diabetes (n=8).

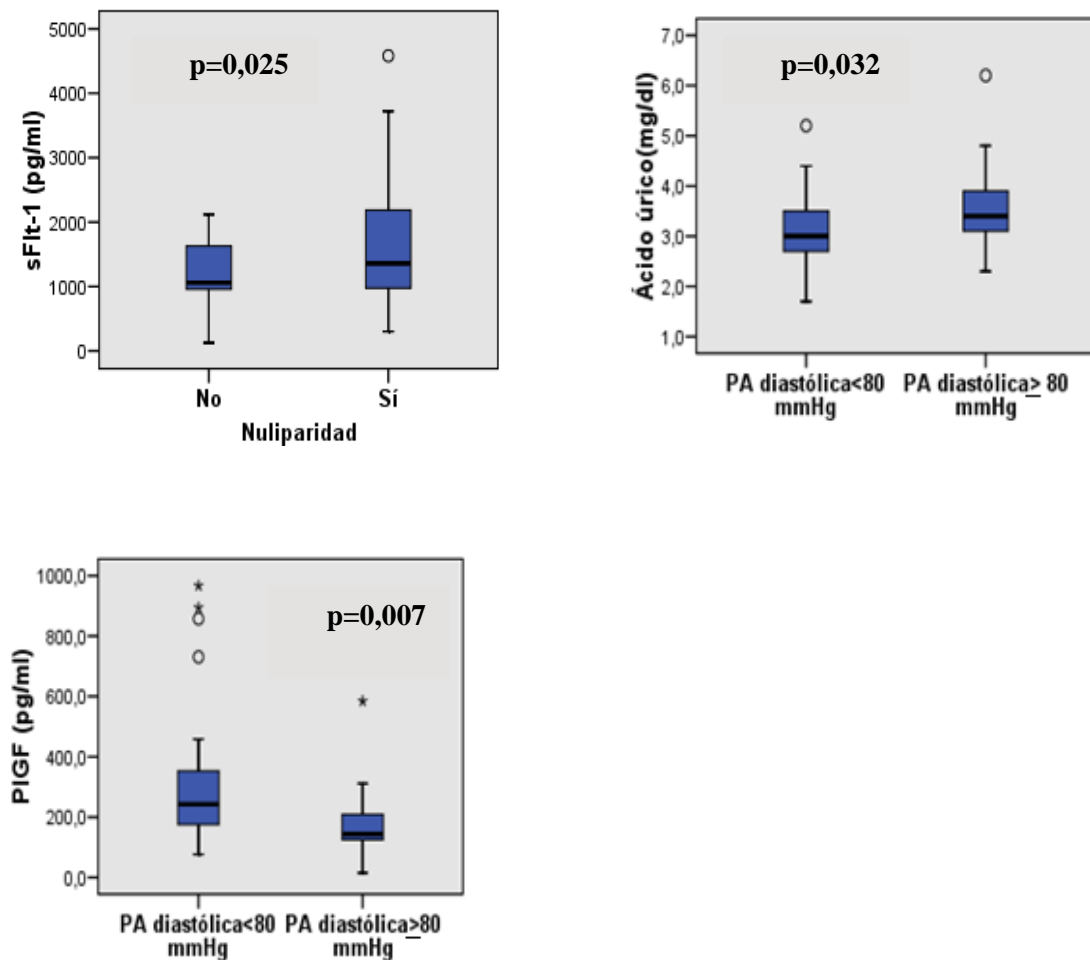
El resto de factores de riesgo sí mostraron diferencias significativas con algunos de los marcadores propuestos como predictores de PE (Figura 45): IMC (IMC >35 Kg/m<sup>2</sup>, n=12) con ácido úrico ( $2,9\pm 0,6/3,4\pm 0,7$ ), ( $p=0,013$ ), fumadora (n=11) con PIGF ( $51,7\pm 23,7/67,6\pm 22,9$ ), ( $p=0,045$ ) y ratio sFlt-1/PIGF ( $31\pm 17/16\pm 8$ , ( $p=0,005$ ), PA diastólica  $\geq 80$ mmHg (n=24) con el ácido úrico ( $2,8\pm 0,7/3,2\pm 0,6$ ), ( $p=0,011$ ).



*Figura 45. Diagramas de cajas en el que se muestra la distribución de los marcadores propuestos como predictores de PE y los factores de riesgo en el primer trimestre de gestación.*

#### IV.4.3.2 Segundo trimestre de gestación

Al estudiar la influencia de los factores de riesgo sobre los marcadores propuestos como predictores de PE en el segundo trimestre de gestación, encontramos diferencias significativas para: nuliparidad con sFlt-1 ( $1210,6 \pm 515,7 / 1643,7 \pm 945,5$ ), ( $p=0,025$ ) y PA diastólica  $\geq 80$  mmHg con el ácido úrico ( $3,1 \pm 0,7 / 3,5 \pm 0,8$ ), ( $p=0,032$ ) y el PIGF ( $300,8 \pm 207,1 / 174,6 \pm 27,1$ ), ( $p=0,007$ ). Todo ello se muestra en la Figura 46.



**Figura 46.** Diagramas de cajas en el que se muestra la distribución de los marcadores propuestos como predictores de PE y los factores de riesgo en el segundo trimestre de gestación.



#### IV.4.4 Análisis univariante de los marcadores predictores de preeclampsia

Se analizó el rendimiento diagnóstico de cada marcador predictor de PE que era capaz de discriminar entre el grupo de riesgo que desarrolló PE (grupo 1) y grupo de riesgo que no la desarrolló (grupo 2) y el grupo de riesgo que desarrolló PE (grupo 1) y el resto de gestantes que no la desarrollaron (grupo 2 y 3) en los dos trimestres de gestación.

##### IV.4.4.1 Primer trimestre de gestación

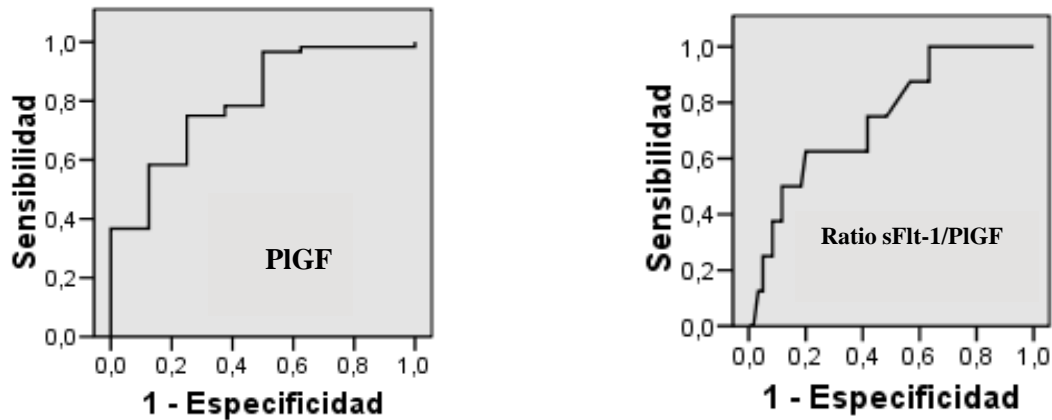
Como se mostraba en la Tabla 34, sólo PIGF y el ratio sFlt-1/PIGF eran capaces de discriminar el grupo 1 del grupo 2.

Se realizó el análisis de curvas ROC para el cálculo del área bajo la curva (ABC), S, E, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) y tasa de falsos positivos (TFP) (Tabla 44 y Figura 47).

|                                   | <b>p</b>     | <b>ABC<br/>(IC95%)</b> | <b>Punto<br/>de<br/>corte</b> | <b>S</b> | <b>E</b> | <b>VPP</b> | <b>VPN</b> | <b>TFP</b> |
|-----------------------------------|--------------|------------------------|-------------------------------|----------|----------|------------|------------|------------|
| <b>PIGF<br/>(pg/ml)</b>           | <b>0,006</b> | 0,800<br>(0,655-0,972) | 40,5                          | 75%      | 83,3%    | 37,5%      | 96,1%      | 17,7%      |
|                                   |              |                        | 37,6                          | 62,5%    | 90%      | 45,4%      | 94,7%      | 10%        |
| <b>Ratio<br/>sFlt-<br/>1/PIGF</b> | <b>0,025</b> | 0,745<br>(0,561-0,907) | 38                            | 62,5%    | 78,3%    | 27,7%      | 94%        | 21,7%      |
|                                   |              |                        | 43                            | 50%      | 86,6%    | 33,3%      | 92,8%      | 13%        |

**Tabla 44. Análisis de la eficacia diagnóstica de los marcadores predictores de PE en el grupo 1 y 2 en el primer trimestre de gestación.**

PIGF: Factor de crecimiento placentario; sFlt-1: forma soluble de la tirosín kinasa 1; ABC: Área bajo la curva; S: sensibilidad; E: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; TFP: tasa de falsos positivos.



**Figura 47.** Curvas ROC de los marcadores predictores de PE entre el grupo 1 y 2 en el primer trimestre de gestación.

Como se observa en la Tabla 44, el PIGF tiene un ABC y sensibilidad mejor que el ratio sFlt-1/PIGF y una menor TFP. Por tanto, de los dos marcadores que son capaces de discriminar entre el grupo 1 y el grupo 2, PIGF presenta mayor eficacia diagnóstica.

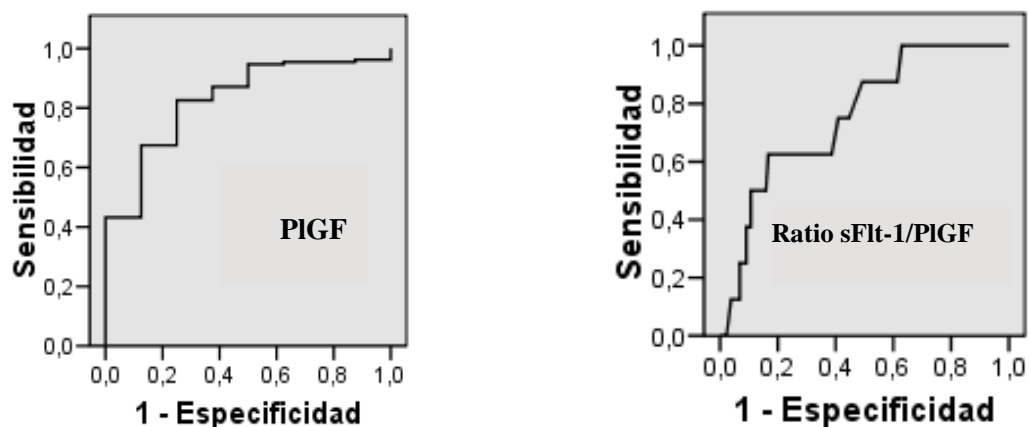
Posteriormente, se realizó también el análisis de curvas ROC de los marcadores que resultaron ser predictores entre el grupo de riesgo que desarrolló PE (grupo 1) y el resto de gestantes que no la desarrollaron (grupo 2 y 3) (Tabla 36), para establecer si es útil cribar la población previamente con los factores de riesgo o si tendríamos que determinar los marcadores seleccionados en la población total (Tabla 45 y Figura 48).

Se obtuvo un ABC y una sensibilidad mejor para el PIGF que para el ratio sFlt-1/PIGF. En caso de no cribar a la población con los factores de riesgo, el PIGF sería el marcador elegido por su mejor rendimiento diagnóstico.

|                                   | p            | ABC<br>(IC95%)         | Punto<br>de<br>corte | S     | E     | VPP   | VPN   | TFP   |
|-----------------------------------|--------------|------------------------|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <b>PIGF</b><br>(pg/ml)            | <b>0,003</b> | 0,828<br>(0,699-0,957) | 40,5                 | 75%   | 82,2% | 18,1% | 98,4% | 18%   |
|                                   |              |                        | 37,6                 | 62,5% | 85,5% | 18,5% | 97,7% | 14,5% |
| <b>Ratio<br/>sFlt-<br/>1/PIGF</b> | <b>0,015</b> | 0,757<br>(0,605-0,908) | 38                   | 62,5% | 83,5% | 17,8% | 97,5% | 16,5% |
|                                   |              |                        | 43                   | 50%   | 90,7% | 23,5% | 96,9% | 9,3%  |

**Tabla 45.** Análisis de la eficacia diagnóstica de los marcadores predictores de PE en el grupo 1 y el grupo 2 y 3 en el primer trimestre de gestación.

PIGF: Factor de crecimiento placentario; sFlt-1: forma soluble de la tirosín kinasa 1; ABC: Área bajo la curva; S: sensibilidad; E: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; TFP: tasa de falsos positivos.



**Figura 48.** Curvas ROC de los marcadores predictores de PE entre el grupo 1 y el grupo 2 y 3 en el primer trimestre de gestación.

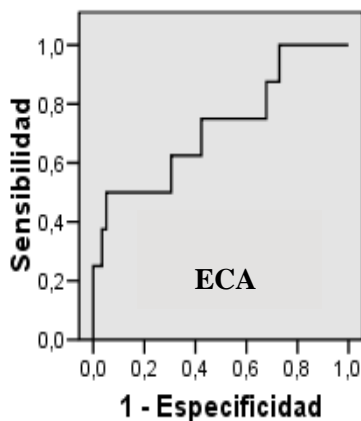
**IV.4.4.2 Segundo trimestre de gestación**

En primer lugar, se realizó el análisis de curvas ROC (Tabla 46 y Figura 49) de los marcadores que resultaron ser predictores de PE entre el grupo de riesgo que desarrolló PE (grupo 1) y el grupo de riesgo que no la desarrolló (grupo 2), (Tabla 41), obteniéndose una baja sensibilidad con una alta TFP.

|                      | <b>p</b>     | <b>ABC<br/>(IC95%)</b> | <b>Punto<br/>de<br/>corte</b> | <b>S</b> | <b>E</b> | <b>VPP</b> | <b>VPN</b> | <b>TFP</b> |
|----------------------|--------------|------------------------|-------------------------------|----------|----------|------------|------------|------------|
| <b>ECA<br/>(U/L)</b> | <b>0,003</b> | 0,724<br>(0,520-0,928) | 36,5                          | 62,5%    | 66,7%    | 20%        | 93%        | 33,3%      |
|                      |              |                        | 40,4                          | 50%      | 83,3%    | 28,5%      | 92,5%      | 16,7%      |

**Tabla 46. Análisis de la eficacia diagnóstica del marcador predictor de PE en el grupo 1 y 2 en el segundo trimestre de gestación.**

ECA: Enzima convertidora de angiotensina; ABC: Área bajo la curva; S: sensibilidad; E: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; TFP: tasa de falsos positivos.



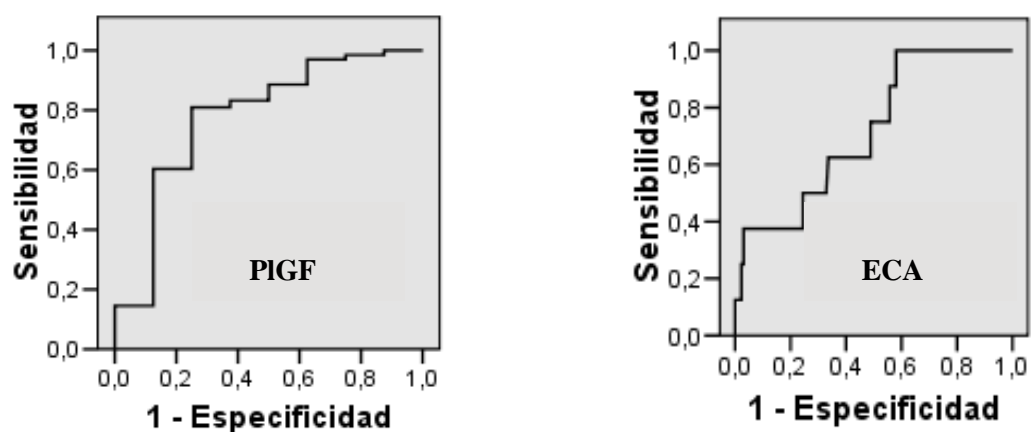
**Figura 49. Curva ROC del marcador predictor de PE entre el grupo 1 y 2 en el segundo trimestre de gestación.**

En segundo lugar, se realizó también el análisis de curvas ROC (Tabla 47 y Figura 50) entre el grupo de riesgo que desarrolló PE (grupo 1) y el resto de gestantes que no la desarrollaron (grupo 2 y 3), (Tabla 43). El marcador que mostró la mejor sensibilidad y menor TFP fue el PIGF. Por tanto, si no cribásemos a la población con los factores de riesgo sería el marcador elegido.

|                        | p            | ABC<br>(IC95%)         | Punto<br>de<br>corte | S     | E     | VPP   | VPN   | TFP   |
|------------------------|--------------|------------------------|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <b>PIGF</b><br>(pg/ml) | <b>0,019</b> | 0,746<br>(0,564-0,928) | 264,2                | 87,5% | 64,7% | 12,2% | 98,9% | 35%   |
|                        |              |                        | 195,6                | 75%   | 82,2% | 17,6% | 98,2% | 17,8% |
| <b>ECA</b>             | <b>0,003</b> | 0,796<br>(0,643-0,949) | 36,5                 | 75%   | 73,2% | 13,6% | 98,1% | 26,6% |
|                        |              |                        | 40,4                 | 62,5% | 79,5% | 14,7% | 97,4% | 21%   |

**Tabla 47.** Análisis de la eficacia diagnóstica de los marcadores predictores de PE en el grupo 1 y el grupo 2 y 3 en el segundo trimestre de gestación.

ECA: Enzima convertidora de angiotensina; PIGF: Factor de crecimiento placentario; ABC: Área bajo la curva; S: sensibilidad; E: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; TFP: tasa de falsos positivos.



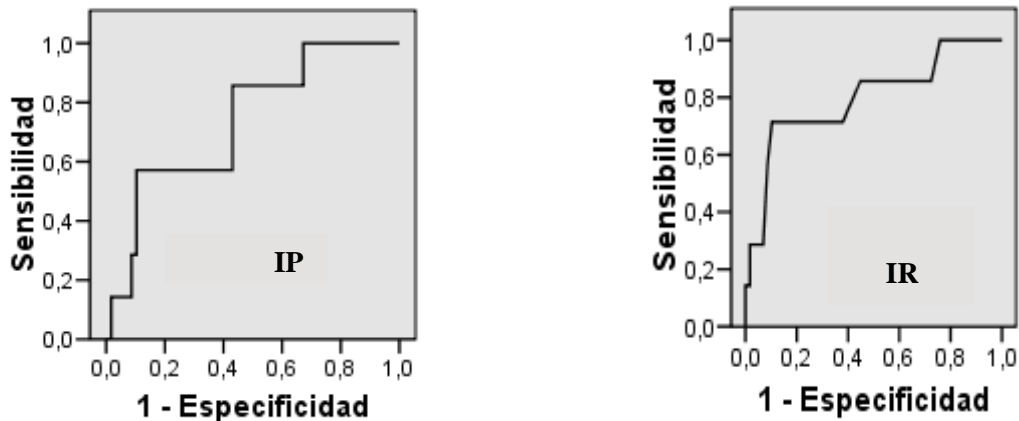
**Figura 50.** Curvas ROC de los marcadores predictores de PE entre el grupo 1 y en el grupo 2 y 3 en el segundo trimestre de gestación.

Además se realizó el análisis de curvas ROC del IP e IR del estudio Doppler en el grupo de riesgo que desarrolló PE (grupo 1) y el grupo de riesgo que no la desarrolló (grupo 1 y 2), (Tablas 48 y Figuras 51). El IR presentó mejor ABC y sensibilidad respecto al IP y menor TFP.

|           | p            | ABC<br>(IC95%)         | Punto<br>de<br>corte | S     | E     | VPP   | VPN   | TFP   |
|-----------|--------------|------------------------|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <b>IP</b> | <b>0,032</b> | 0,652<br>(0,455-0,848) | 1,01                 | 71,4% | 56,9% | 16,6% | 94,2% | 43%   |
|           |              |                        | 1,44                 | 57,1% | 93,1% | 50%   | 94,7% | 6,9%  |
| <b>IR</b> | <b>0,004</b> | 0,712<br>(0,484-0,940) | 0,60                 | 85,7% | 55,1% | 18,7% | 96,9% | 45%   |
|           |              |                        | 0,70                 | 71,4% | 89,6% | 45,4% | 96,3% | 10,4% |

**Tabla 48.** Análisis de la eficacia diagnóstica del estudio Doppler como predictor de PE en el Grupo 1 y 2 en el segundo trimestre de gestación.

IP: índice de pulsatilidad medio; IR: índice de resistencia medio; ABC: Área bajo la curva; S: sensibilidad; E: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; TFP: tasa de falsos positivos.



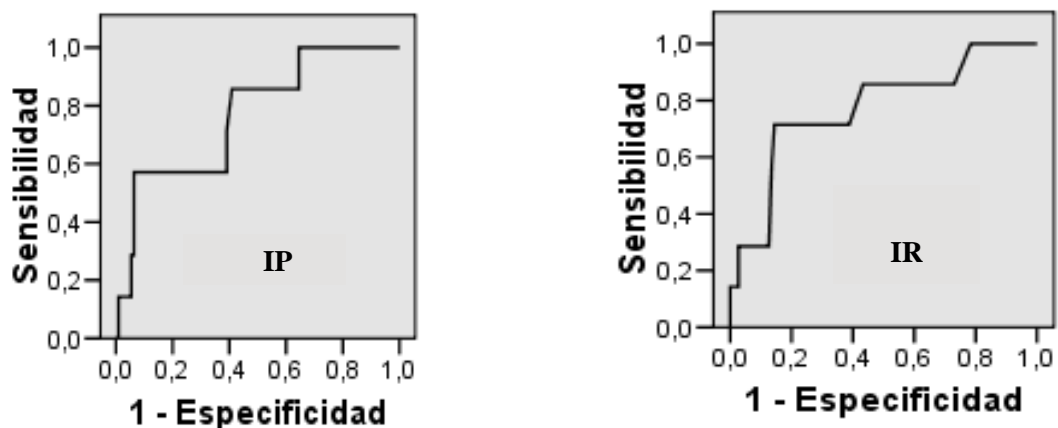
**Figura 51.** Curvas ROC del IP e IR como predictor de PE entre el grupo 1 y 2 en el segundo trimestre de gestación.

En segundo lugar, se realizó el análisis de curvas ROC del IP e IR del estudio Doppler entre el grupo de riesgo que desarrolló PE (grupo 1) y el resto de gestantes que no la desarrollaron (grupo 2 y 3) (Tabla 49 y Figura 52). De los dos marcadores, el IR presentó mejor ABC y sensibilidad y menor TFP.

|           | p            | ABC<br>(IC95%)         | Punto<br>de<br>corte | S     | E     | VPP   | VPN   | TFP   |
|-----------|--------------|------------------------|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <b>IP</b> | <b>0,044</b> | 0,768<br>(0,592-0,943) | 1,01                 | 71,4% | 59,5% | 7,8%  | 97,7% | 40%   |
|           |              |                        | 1,44                 | 57,1% | 97,8% | 57,1% | 97,8% | 2,2%  |
| <b>IR</b> | <b>0,009</b> | 0,772<br>(0,583-0,962) | 0,60                 | 85,7% | 65,2% | 11,1% | 98,9% | 34,8% |
|           |              |                        | 0,70                 | 71,4% | 89,8% | 26,3% | 98,4% | 10%   |

**Tabla 49.** Análisis de la eficacia diagnóstica del estudio Doppler como predictor de PE en el grupo 1 y el grupo 2 y 3 en el segundo trimestre de gestación.

IP: índice de pulsatilidad medio; IR: índice de resistencia medio; ABC: Área bajo la curva; S: sensibilidad; E: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; TFP: tasa de falsos positivos.



**Figura 52.** Curvas ROC del IP e IR como predictor de PE entre el Grupo 1 y el Grupo 2 y 3 en el segundo trimestre de gestación.

## **IV.5 Análisis multivariante**

### ***IV.5.1 Combinación de marcadores para el cálculo del rendimiento diagnóstico.***

En primer lugar, se realizó la combinación de marcadores entre el grupo de riesgo que desarrolló PE (grupo 1) y el grupo de riesgo que no la desarrolló (grupo 2), que tenían calculado su ABC anteriormente con el análisis de curvas ROC y se procedió a su combinación para ver si se podía incrementar el rendimiento diagnóstico.

Como se ha comentado a lo largo del estudio, los marcadores predictores de PE entre el grupo 1 y 2 en el primer trimestre de gestación fueron: PIGF y el ratio sFlt-1/PIGF. La combinación de ambos marcadores no supuso un incremento del ABC. Lo mismo ocurría al combinar el IP e IR no incrementando el ABC. A continuación en la Tabla 50 se expone las posibles combinaciones de marcadores (ecográficos y bioquímicos) que permitan incrementar el ABC entre el grupo 1 y 2 de estudio.

El ABC del PIGF del primer trimestre era de 0,800, combinándolo con el IR permitió incrementar el ABC a 0,860, considerando para que la prueba sea positiva algunos de los dos marcadores como positivo. La combinación del PIGF del primer trimestre con la ECA del segundo trimestre nos proporcionaba la peor ABC de las tres, considerando para que la prueba sea positiva algunos de los dos marcadores como positivo. Al combinar el PIGF del primer trimestre con el IR y la ECA del segundo trimestre obtuvimos la mejor ABC, considerando para que la prueba sea positiva, que tenga dos de los tres marcadores positivos.

Como se observa en la Tabla 50, si cribásemos la población con los factores de riesgo la mejor combinación sería el PIGF del primer trimestre e IR y la ECA del segundo, obteniendo con ella la menor TFP y mayor VPP.



|  | <b>p</b>         | <b>ABC<br/>(IC95%)</b> | <b>S</b> | <b>E</b> | <b>VPP</b> | <b>VPN</b> | <b>TFP</b> |
|--|------------------|------------------------|----------|----------|------------|------------|------------|
| <b>PIGF<br/>(<math>\leq 37,6</math>)<br/>+<br/>IR (<math>\geq 0,7</math>)</b>                                    | <b>0,001</b>     | 0,860<br>(0,681-1,034) | 87,5%    | 85%      | 43,7%      | 98%        | 15%        |
| <b>PIGF<br/>(<math>\leq 37,6</math>)<br/>+<br/>ECA (<math>\geq 40,4</math>)</b>                                  | <b>0,018</b>     | 0,837<br>(0,613-0,976) | 87,5%    | 55%      | 20,5%      | 97,06%     | 45%        |
| <b>PIGF (<math>\leq 37,6</math>)<br/>+<br/>IR (<math>\geq 0,7</math>)<br/>+<br/>ECA (<math>\geq 40,4</math>)</b> | <b>&lt;0,001</b> | 0,889<br>(0,670-1,070) | 87,5%    | 94,8%    | 70%        | 98,2%      | 5,2%       |

**Tabla 50. Análisis de la combinación de marcadores para el cálculo del rendimiento diagnóstico entre el grupo 1 y 2.**

ECA: Enzima convertidora de angiotensina; IR: índice de resistencia medio; PIGF: Factor de crecimiento placentario; ABC: Área bajo la curva; S: sensibilidad; E: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; TFP: tasa de falsos positivos.

En segundo lugar, se realizó la combinación de marcadores entre el grupo de riesgo que desarrolló PE (grupo 1) y el resto de gestantes que no la desarrollaron (grupo 2 y 3), que tenían calculado su ABC anteriormente con el análisis de curvas ROC y se procedió a su combinación para ver si se podía incrementar el rendimiento diagnóstico.

Los marcadores predictores de PE entre el grupo 1 y el grupo 2 y 3 en el primer trimestre de gestación fueron el PIGF y el ratio sFlt-1/PIGF. El PIGF presentó un ABC de 0,828 y al combinarlo con el ratio sFlt-1/PIGF no supuso un incremento del ABC.

Cuando se combinó el PIGF del primer trimestre con el IR, el ABC fue de 0,857, considerando para que la prueba sea positiva algunos de los dos marcadores como positivo. La combinación en este caso entre PIGF del primer trimestre y la ECA del segundo no supuso un incremento del ABC. Por último se combinó el PIGF del primer trimestre, el IR y la ECA del segundo trimestre y obtuvimos la mejor ABC de 0,870 y menor TFP, considerando para que la prueba sea positiva, que tenga dos de los tres marcadores positivos (Tabla 51).

|  | <b>p</b>     | <b>ABC<br/>(IC95%)</b> | <b>S</b> | <b>E</b> | <b>VPP</b> | <b>VPN</b> | <b>TFP</b> |
|--|--------------|------------------------|----------|----------|------------|------------|------------|
| <b>PIGF (<math>\leq 37,6</math>)<br/>+<br/>IR (<math>\geq 0,7</math>)</b>  | <b>0,003</b> | 0,857<br>(0,774-1)     | 87,5%    | 90,7%    | 35%        | 99,2%      | 12,5%      |
| <b>PIGF (<math>\leq 37,6</math>)<br/>+<br/>IR (<math>\geq 0,7</math>)<br/>+<br/>ECA (<math>\geq 40,4</math>)</b> | <b>0,002</b> | 0,870<br>(0,670-1,070) | 87,5%    | 95,6%    | 53,8%      | 99,2%      | 4,4%       |

**Tabla 51. Análisis de la combinación de marcadores para el cálculo del rendimiento diagnóstico entre el grupo 1 y el grupo 2 y 3 con el punto de corte de PIGF del primer trimestre de gestación.**

ECA: Enzima convertidora de angiotensina; IR: índice de resistencia medio; PIGF: Factor de crecimiento placentario; ABC: Área bajo la curva; S: sensibilidad; E: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; TFP: tasa de falsos positivos.

Los marcadores predictores de PE entre el grupo de riesgo que desarrolló PE (grupo 1) y el resto de gestantes que no la desarrollaron (grupo 2 y 3) en el segundo trimestre de gestación fueron PIGF y la ECA.

El ABC del PIGF en el segundo trimestre de gestación fue de 0,746 y combinándolo con el IR se incrementó hasta 0,832, considerando para que la prueba sea positiva algunos de los dos marcadores como positivo. La combinación del PIGF y la ECA, ambos en el segundo trimestre no supuso un incremento del ABC. Con la combinación de PIGF con IR y la ECA todos en el segundo trimestre, se consiguió la mejor ABC que fue de 0,870, considerando para que la prueba sea positiva, que tenga dos de los tres marcadores positivos (Tabla 52).

|   | <b>p</b>     | <b>ABC<br/>(IC95%)</b> | <b>S</b> | <b>E</b> | <b>VPP</b> | <b>VPN</b> | <b>TFP</b> |
|---|--------------|------------------------|----------|----------|------------|------------|------------|
| <b>PIGF<br/>(<math>\leq 195,6</math>)<br/>+<br/>IR (<math>\geq 0,7</math>)</b>                                    | <b>0,003</b> | 0,832<br>(0,665-0,999) | 75%      | 79,2%    | 17,1%      | 98,2%      | 20,2%      |
| <b>PIGF (<math>\leq 195,6</math>)<br/>+<br/>IR (<math>\geq 0,7</math>)<br/>+<br/>ECA (<math>\geq 40,4</math>)</b> | <b>0,002</b> | 0,870<br>(0,670-1,070) | 87,5%    | 92,7%    | 41,1%      | 99,2%      | 7,3%       |

**Tabla 52.** Análisis de la combinación de marcadores para el cálculo del rendimiento diagnóstico entre el grupo 1 y el grupo 2 y 3 con el punto de corte de PIGF del segundo trimestre de gestación.

ECA: Enzima convertidora de angiotensina; IR: índice de resistencia medio; PIGF: Factor de crecimiento placentario; ABC: Área bajo la curva; S: sensibilidad; E: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; TFP: tasa de falsos positivos.

#### IV.5.2 Regresión lineal múltiple

A continuación, se ha realizado un análisis multivariante de los principales factores de riesgo y la influencia que éstos ejercen sobre los marcadores propuestos como posibles predictores de PE en la población de riesgo (grupo 1 y 2), todo ello descrito en las siguientes tablas. Para este análisis multivariante se han incluido aquellas variables que en el estudio univariante obtuvieron un nivel de significación  $p < 0,15$ .

IV.5.2.1 Primer trimestre de gestación

| Modelo de Regresión lineal                     | sFlt-1              |                  |       |                       |                   |              |
|--|---------------------|------------------|-------|-----------------------|-------------------|--------------|
|  | Análisis Univariado |                  |       | Análisis multivariado |                   |              |
|  | $\beta$             | IC95%            | p     | $\beta$               | IC95%             | p            |
| <b>Edad</b>                                    | -16,26              | -50,89 a 18,36   | 0,350 |                       |                   |              |
| <b>Nuliparidad</b>                             | 330,16              | -118,15 a 778,4  | 0,145 | 240,14                | -82,38 a 562,67   | 0,142        |
| <b>IMC</b>                                     | -4,95               | -14,4 a 4,52     | 0,299 |                       |                   |              |
| <b>Tabaco</b>                                  | -489,94             | -985,29 a 5,39   | 0,052 | -541,71               | -1007,51 a -75,91 | <b>0,023</b> |
| <b>PA diastólica <math>\geq 80</math> mmHg</b> | -340,512            | -735,45 a 54,43  | 0,090 | -420,45               | -746,94 a -93,96  | <b>0,012</b> |
| <b>PE previa</b>                               | 194,22              | 286,23 a 674,68  | 0,421 |                       |                   |              |
| <b>CIR previo</b>                              | -154,78             | -692,42 a 382,86 | 0,566 |                       |                   |              |
| <b>Aborto previo</b>                           | -8,84               | -587,84 a 570,15 | 0,976 |                       |                   |              |
| <b>Diabetes</b>                                | -120,36             | -745,98 a 505,25 | 0,701 |                       |                   |              |
| <b>Trombofilia</b>                             | 188,67              | -571,34 a 948,68 | 0,620 |                       |                   |              |
| <b>Embarazo por FIV</b>                        | 542,58              | -41,63 a 1126,81 | 0,068 | 307                   | -154,65 a 768,65  | 0,188        |

**Tabla 53. Regresión lineal múltiple de los principales factores de riesgo sobre el sFlt-1 en la población de riesgo en el primer trimestre de gestación.**

CIR: crecimiento intrauterino restringido; FIV: fecundación in vitro; IMC: índice de masa corporal; PE: preeclampsia; sFlt-1: forma soluble de la tirosín kinasa 1.

Las concentraciones de sFlt-1 se asociaron de forma independiente con el tabaco y con cifras de PA  $\geq 80$  mmHg.

| Modelo de Regresión lineal                     | PIGF                |                 |       |                       |                |              |
|--|---------------------|-----------------|-------|-----------------------|----------------|--------------|
|  | Análisis Univariado |                 |       | Análisis multivariado |                |              |
|  | $\beta$             | IC95%           | p     | $\beta$               | IC95%          | p            |
| <b>Edad</b>                                    | 0,08                | -1,16 a -1,33   | 0,892 |                       |                |              |
| <b>Nuliparidad</b>                             | 0,66                | -15,33 a 16,85  | 0,935 |                       |                |              |
| <b>IMC</b>                                     | -0,22               | -0,56 a 0,11    | 0,192 |                       |                |              |
| <b>Tabaco</b>                                  | 16,57               | -1,31 a 34,46   | 0,069 | 14,17                 | -0,86 a 29,21  | 0,064        |
| <b>PA diastólica <math>\geq 80</math> mmHg</b> | -14,28              | -28,55 a -0,023 | 0,050 | -14,27                | -25,79 a -2,75 | <b>0,016</b> |
| <b>PE previa</b>                               | -0,06               | -17,41 a 17,29  | 0,994 |                       |                |              |
| <b>CIR previo</b>                              | -4,77               | -24,18 a 14,64  | 0,624 |                       |                |              |
| <b>Aborto previo</b>                           | -4,25               | -25,16 a 16,65  | 0,685 |                       |                |              |
| <b>Diabetes</b>                                | -15,22              | -37,82 a 7,3    | 0,182 |                       |                |              |
| <b>Trombofilia</b>                             | 2,93                | -24,51 a 30,38  | 0,831 |                       |                |              |
| <b>Embarazo por FIV</b>                        | 5,72                | -15,37 a 26,82  | 0,588 |                       |                |              |

**Tabla 54. Regresión lineal múltiple de los principales factores de riesgo sobre el PIGF en la población de riesgo en el primer trimestre de gestación.**

*CIR: crecimiento intrauterino restringido; FIV: fecundación in vitro; IMC: índice de masa corporal; PE: preeclampsia; PIGF: factor de crecimiento placentario.*

Las concentraciones de PIGF se asociaron de forma independiente con la PA diastólica  $\geq 80$  mmHg.

| Modelo de Regresión lineal                     | Ratio sFlt-1/PlGF   |                |       |                       |                |              |
|--|---------------------|----------------|-------|-----------------------|----------------|--------------|
|  | Análisis Univariado |                |       | Análisis multivariado |                |              |
|  | $\beta$             | IC95%          | p     | $\beta$               | IC95%          | p            |
| <b>Edad</b>                                    | 0,06                | -0,83 a 0,96   | 0,884 |                       |                |              |
| <b>Nuliparidad</b>                             | 6,24                | -5,40 a 17,89  | 0,287 |                       |                |              |
| <b>IMC</b>                                     | 0,00                | -0,24 a 0,25   | 0,972 |                       |                |              |
| <b>Tabaco</b>                                  | -17,49              | -30,36 a -4,62 | 0,009 | -15,64                | -26,32 a -4,96 | <b>0,005</b> |
| <b>PA diastólica <math>\geq 80</math> mmHg</b> | 4,16                | -6,09 a 14,42  | 0,419 |                       |                |              |
| <b>PE previa</b>                               | 2,47                | -10 a 14,95    | 0,693 |                       |                |              |
| <b>CIR previo</b>                              | -3,85               | -17,82 a 10,11 | 0,582 |                       |                |              |
| <b>Aborto previo</b>                           | -3,17               | -18,22 a 11,86 | 0,673 |                       |                |              |
| <b>Diabetes</b>                                | 5,36                | -10,88 a 21,62 | 0,511 |                       |                |              |
| <b>Trombofilia</b>                             | -0,13               | -19,88 a 19,61 | 0,989 |                       |                |              |
| <b>Embarazo por FIV</b>                        | 2,77                | -12,40 a 17,94 | 0,716 |                       |                |              |

**Tabla 55. Regresión lineal múltiple de los principales factores de riesgo sobre el ratio sFlt-1/PlGF en la población de riesgo en el primer trimestre de gestación.**

*CIR: crecimiento intrauterino restringido; FIV: fecundación in vitro; IMC: índice de masa corporal; PE: preeclampsia; PlGF: factor de crecimiento placentario sFlt-1: forma soluble de la tirosín kinasa 1.*

El ratio sFlt-1/PlGF se asoció de forma independiente con el tabaco como único factor de riesgo de los estudiados.

| Modelo de Regresión lineal                     | MoM PAPP-A          |              |       |                       |              |                  |
|--|---------------------|--------------|-------|-----------------------|--------------|------------------|
|  | Análisis Univariado |              |       | Análisis multivariado |              |                  |
|  | $\beta$             | IC95%        | p     | $\beta$               | IC95%        | p                |
| <b>Edad</b>                                    | -0,03               | -0,06 a 0,00 | 0,052 | -0,02                 | -0,05 a 0,00 | 0,061            |
| <b>Nuliparidad</b>                             | 0,13                | -0,25 a 0,51 | 0,498 |                       |              |                  |
| <b>IMC</b>                                     | -0,00               | -0,01 a 0,00 | 0,668 |                       |              |                  |
| <b>Tabaco</b>                                  | -0,32               | -0,75 a 0,09 | 0,128 | -0,24                 | -0,62 a 0,13 | 0,200            |
| <b>PA diastólica <math>\geq 80</math> mmHg</b> | -0,24               | -0,58 a 0,09 | 0,153 |                       |              |                  |
| <b>PE previa</b>                               | -0,04               | -0,46 a 0,36 | 0,812 |                       |              |                  |
| <b>CIR previo</b>                              | -0,00               | -0,47 a 0,45 | 0,969 |                       |              |                  |
| <b>Aborto previo</b>                           | -0,01               | -0,51 a 0,48 | 0,959 |                       |              |                  |
| <b>Diabetes</b>                                | -0,29               | -0,83 a 0,25 | 0,286 |                       |              |                  |
| <b>Trombofilia</b>                             | 1,01                | -0,35 a 1,6  | 0,003 | 1,11                  | 0,59 a 1,63  | <b>&lt;0,001</b> |
| <b>Embarazo por FIV</b>                        | 0,42                | -0,07 a 0,93 | 0,093 | 0,50                  | 0,09 a 0,91  | <b>0,016</b>     |

**Tabla 56. Regresión lineal múltiple de los principales factores de riesgo sobre el MoM PAPP-A en la población de riesgo en el primer trimestre de gestación.**

*CIR: crecimiento intrauterino restringido; FIV: fecundación in vitro; IMC: índice de masa corporal; MoM PAPP-A: múltiplo de la mediana de la proteína plasmática A asociada al embarazo; PE: preeclampsia.*

El MoM PAPP-A se asoció de forma independiente con la trombofilia y embarazo mediante FIV como factores de riesgo.

Respecto al CA125 y la ECA no mostraron asociación con ninguno de los factores de riesgo estudiados.

**IV.5.2.2 Segundo trimestre de gestación**

Se realizó también un análisis multivariante de los principales factores de riesgo y la influencia que estos ejercen sobre los marcadores determinados en el segundo trimestre de gestación.

| Modelo de Regresión lineal                     | sFlt-1              |                  |       |                       |                |              |
|--|---------------------|------------------|-------|-----------------------|----------------|--------------|
|  | Análisis Univariado |                  |       | Análisis multivariado |                |              |
|  | $\beta$             | IC95%            | p     | $\beta$               | IC95%          | p            |
| <b>Edad</b>                                    | -39,81              | -79,66 a 0,03    | 0,050 | -25,00                | -58,78 a 8,77  | 0,144        |
| <b>Nuliparidad</b>                             | 612,01              | 88,57 a 1135,45  | 0,023 | 472,89                | 96,45 a 849,33 | <b>0,015</b> |
| <b>IMC</b>                                     | -4,87               | -16,02 a 6,28    | 0,385 |                       |                |              |
| <b>Tabaco</b>                                  | -334,25             | -903,68 a 235,18 | 0,244 |                       |                |              |
| <b>PA diastólica <math>\geq 80</math> mmHg</b> | -82,15              | -553,05 a 388,75 | 0,728 |                       |                |              |
| <b>PE previa</b>                               | 151,81              | -403,57 a 707,20 | 0,586 |                       |                |              |
| <b>CIR previo</b>                              | 45,77               | -572,70 a 664,25 | 0,882 |                       |                |              |
| <b>Aborto previo</b>                           | 27,37               | -638,16 a 692,90 | 0,935 |                       |                |              |
| <b>Diabetes</b>                                | 101,11              | -619,49 a 821,72 | 0,779 |                       |                |              |
| <b>Trombofilia</b>                             | 33,34               | -841,52 a 908,20 | 0,939 |                       |                |              |
| <b>Embarazo por FIV</b>                        | 791,61              | 70,48 a 1512,73  | 0,032 |                       |                |              |

**Tabla 57. Regresión lineal múltiple de los principales factores de riesgo sobre el sFlt-1 en la población de riesgo en el segundo trimestre de gestación.**

*CIR: crecimiento intrauterino restringido; FIV: fecundación in vitro; IMC: índice de masa corporal; PE: preeclampsia; sFlt-1: forma soluble de la tirosín kinasa 1.*

Las concentraciones de sFlt-1 en el segundo trimestre de gestación se asociaron de forma independiente con la nuliparidad como factor de riesgo.



| Modelo de Regresión lineal                     | PIGF                |                  |       |                       |                  |              |
|--|---------------------|------------------|-------|-----------------------|------------------|--------------|
|  | Análisis Univariado |                  |       | Análisis multivariado |                  |              |
|  | $\beta$             | IC95%            | p     | $\beta$               | IC95%            | p            |
| <b>Edad</b>                                    | -4,59               | -12,50 a 3,32    | 0,250 |                       |                  |              |
| <b>Nuliparidad</b>                             | -25,15              | -129,12 a 78,80  | 0,629 |                       |                  |              |
| <b>IMC</b>                                     | -0,95               | -3,16 a 1,26     | 0,393 |                       |                  |              |
| <b>Tabaco</b>                                  | 11,30               | -101,80 a 124,40 | 0,842 |                       |                  |              |
| <b>PA diastólica <math>\geq 80</math> mmHg</b> | -100,74             | -194,27 a -7,21  | 0,035 | -126,19               | -217,16 a -35,22 | <b>0,007</b> |
| <b>PE previa</b>                               | -42,92              | -153,23 a 67,38  | 0,438 |                       |                  |              |
| <b>CIR previo</b>                              | 4,97                | -117,87 a 27,81  | 0,936 |                       |                  |              |
| <b>Aborto previo</b>                           | 5,96                | -126,22 a 138,15 | 0,928 |                       |                  |              |
| <b>Diabetes</b>                                | -83,34              | -226,46 a 59,78  | 0,248 |                       |                  |              |
| <b>Trombofilia</b>                             | -56,38              | -230,15 a 117,37 | 0,518 |                       |                  |              |
| <b>Embarazo por FIV</b>                        | 56,14               | -87,08 a 149,37  | 0,435 |                       |                  |              |

**Tabla 58.** Regresión lineal múltiple de los principales factores de riesgo sobre el PIGF en la población de riesgo en el segundo trimestre de gestación.

CIR: crecimiento intrauterino restringido; FIV: fecundación in vitro; IMC: índice de masa corporal; PIGF: factor de crecimiento placentario; PE: preeclampsia.

Las concentraciones de PIGF se asociaron de forma independiente con la PA diastólica  $\geq 80$  mmHg como factor de riesgo. En el caso del ratio sFlt-1/PIGF no mostró asociación con ningún factor de riesgo. Como ocurría en el primer trimestre de gestación, las concentraciones de CA125 y ECA no se asociaron de forma independiente con ninguno de los factores de riesgo.

**IV.5.3 Regresión logística**

Para estudiar la probabilidad o riesgo de presentar PE, se ha realizado un análisis de regresión logística, tomando como referencia la OR ajustada, con un intervalo de confianza del 95%. Este análisis se realizó en la población de riesgo (grupo 1 y 2), utilizando los puntos de corte calculados anteriormente en los marcadores predictores de PE. Se utilizó el punto de corte en el PIGF y en el ratio sFlt-1/PIGF del primer trimestre de gestación y de la ECA del segundo trimestre. Se obtuvo un riesgo de desarrollar PE de 10,77 (1,78-65,09) para el  $IR \geq 0,7$  y de 12,36(1,94-78,64) para el  $PIGF \leq 37,6$  pg/ml.

| Modelo de Regresión logística                | PREECLAMPSIA        |              |                       |              |
|--|---------------------|--------------|-----------------------|--------------|
|  | Análisis Univariado |              | Análisis multivariado |              |
|  | OR (IC95%)          | p            | OR (IC95%)            | p            |
| <b>IP <math>\geq 1,44</math></b>             | 2,12 (0,09-48,02)   | 0,635        |                       |              |
| <b>IR <math>\geq 0,70</math></b>             | 9,43 (1,37-64,58)   | <b>0,022</b> | 10,77 (1,78-65,09)    | <b>0,008</b> |
| <b>PIGF <math>\leq 37,6</math> (pg/ml)</b>   | 15,61 (1,79-135,62) | <b>0,013</b> | 12,36 (1,94-78,64)    | <b>0,010</b> |
| <b>RatiosFlt-1/PIGF <math>\geq 38</math></b> | 1,14 (0,14-8,79)    | 0,896        |                       |              |
| <b>ECA <math>\geq 40,4</math> (U/L)</b>      | 3,70 (0,45-30,04)   | 0,222        |                       |              |

**Tabla 59. Regresión lineal logística aplicada sobre la población de riesgo.**

ECA: Enzima convertidora de angiotensina; IP: índice de pulsatilidad medio; IR: índice de resistencia medio; OR: odds ratio; PIGF: factor de crecimiento placentario; sFlt-1: forma soluble de la tirosín kinasa I.

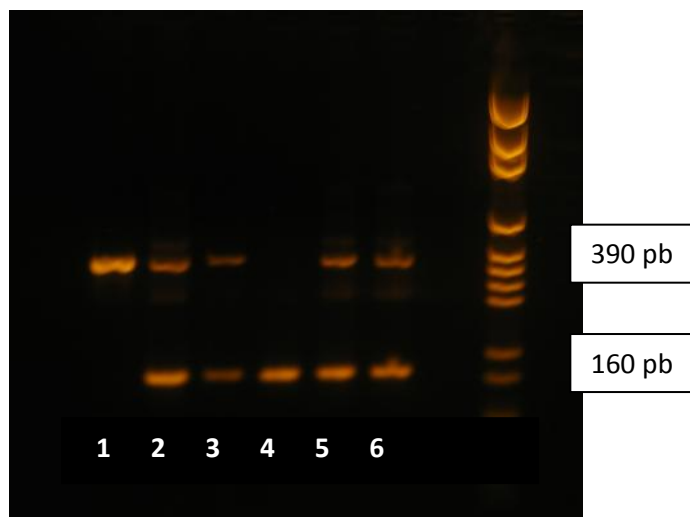
## IV.6 Estudio genético

Para el estudio genético se solicitó un consentimiento informado para tal análisis, a las pacientes que habían desarrollado PE y 30 pacientes del grupo control.

De las 8 pacientes que desarrollaron PE, 6 de ellas accedieron para realizarles el estudio genético.

### IV.6.1 Estudio genético de la ECA

Se obtuvieron los resultados del estudio genético de la ECA de las pacientes con PE mediante electroforesis en gel de agarosa, tal y como se muestra en la Figura 53.



**Figura 53.** Genotipo de la ECA de las gestantes con PE. Posición 1: homocigoto II con 390 pares de bases, Posición 4: homocigoto DD con 160 pares de bases y las posiciones 2, 3, 5 y 6 heterocigotos con 390 y 160 pares de bases.

A continuación, en la siguiente Figura se muestran los resultados obtenidos en las 30 pacientes del grupo control.



**Figura 54. Genotipo de la ECA del grupo control:** las posiciones de la 1-4, 6 y 7, 9,1, 12, 15, 16, 22, 26, 28 y 29 son heterocigotos con 390 y 160 pares de bases, las posiciones 5,13, 17, 18, 20,23-25, 27 y 30 homocigotos DD con 160 pares de bases y las posiciones 8, 10, 14, 19 y 21 homocigotos II con 390 pares de bases.

A continuación en las siguientes Tablas se resumen los resultados tanto del grupo con PE como el grupo control.

|                 | Grupo con preeclampsia | Grupo control |
|-----------------|------------------------|---------------|
| Homocigoto II   | 16,6%                  | 13,3%         |
| Homocigoto DD   | 16,6%                  | 33,3%         |
| Heterocigoto ID | 66,6%                  | 53,3%         |

**Tabla 60. Genotipo de la ECA en el grupo con PE y grupo control.**

Al comparar ambos grupos no encontramos diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,743$ ).



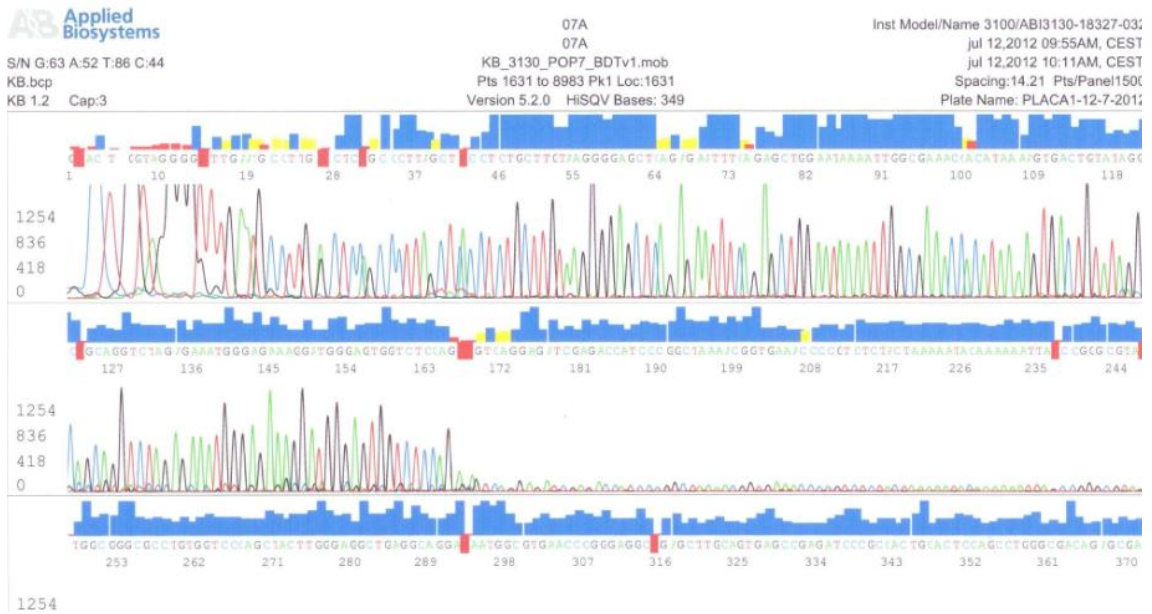


Figura 56. Secuencia de la ECA: heterocigoto ID.

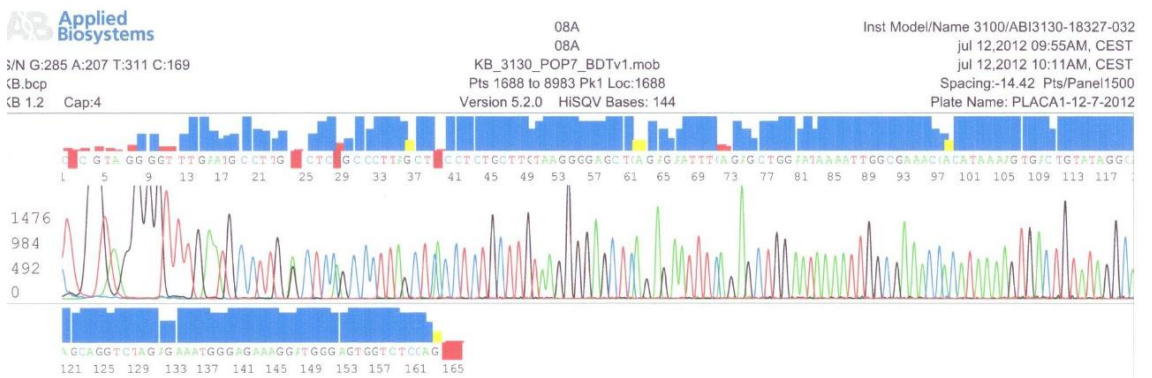


Figura 57. Secuencia de la ECA: homocigoto DD.

#### IV.6.2 Estudio genético de la Apo E

Se realizó el análisis genético de la Apo E en las mismas pacientes que en el estudio de la ECA. Los resultados obtenidos en ambos grupos se muestran en la siguiente Tabla.

| Alelos | Grupo con preeclampsia | Grupo control |
|--------|------------------------|---------------|
| ε2/ε2  | 0%                     | 0%            |
| ε3/ε3  | 33,3%                  | 83,3%         |
| ε4/ε4  | 0%                     | 0%            |
| ε2/ε3  | 16,6%                  | 10%           |
| ε2/ε4  | 0%                     | 0%            |
| ε3/ε4  | 50%                    | 6,6%          |

**Tabla 62.** Genotipo de la Apo E en el grupo con PE y grupo control.

Al comparar ambos grupos encontramos diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,003$ ).

#### **IV.7 Comparación de los marcadores angiogénicos (sFlt-1 y PlGF) entre embarazos únicos y múltiples en el primer y segundo trimestre de gestación.**

Como se describió en el capítulo de objetivos, uno de ellos era la comparación de los marcadores angiogénicos entre embarazos únicos y múltiples, ya que éstos podrían variar dependiendo del tipo de embarazo.

Se llevo a cabo con las pacientes del grupo control (grupo 3) y un grupo de gestantes con embarazo múltiple (n=73) y dentro de este grupo se dividieron en embarazo monocorial (n=20) y bicorial (n=53), ya que los marcadores podían verse afectados en caso de presentar dos placentas. A continuación en la Tabla 63 se muestra las características descriptivas de la población de estudio.

| <b>Características</b>                        | <b>Embarazo Único</b> | <b>Embarazo múltiple</b> |
|---|-----------------------|--------------------------|
| <b>Edad materna al inicio de la gestación</b> | 31,1±4,5              | 34,6±5                   |
| <b>Semana de gestación 1ºTrimestre</b>        | 12,1±0,6              | 11,9±0,6                 |
| <b>Semana de gestación 2ºTrimestre</b>        | 19,9±0,4              | 19,4±0,9                 |
| <b>Nuliparidad (%)</b>                        | 33,7                  | 54,7                     |
| <b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>                 | 22,3[20,2-25,8]       | 23,4[21,1-25,4]          |
| <b>Fumadora (%)</b>                           | 8,7                   | 6,8                      |

*Tabla 63. Características descriptivas del grupo de embarazo único y embarazo múltiple.*

##### ***IV.7.1 Primer trimestre de gestación***

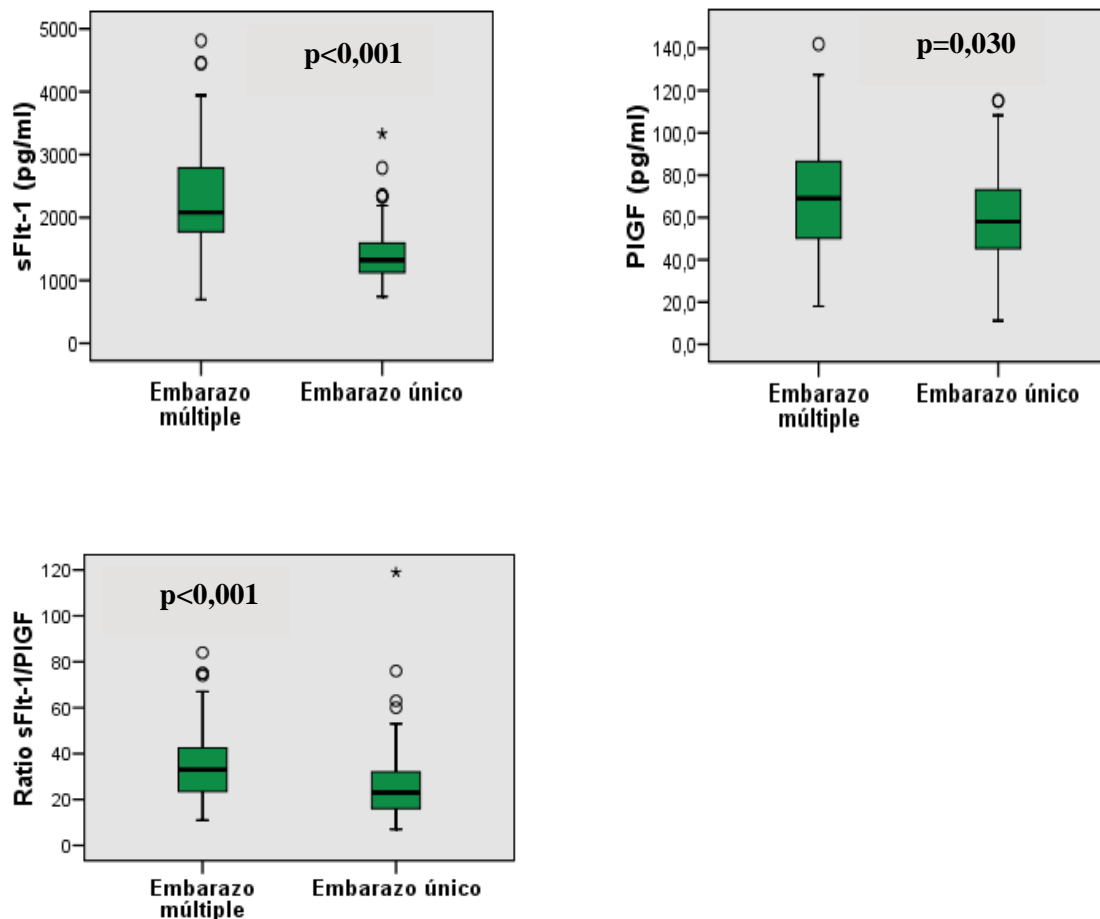
En primer lugar, se compararon el grupo de embarazo único con el de embarazo múltiple (Tabla 64 y Figura 58) y se encontraron diferencias significativas para todos los marcadores: sFlt-1 (p<0,001), PlGF (p=0,030) y el ratio sFlt-1/PlGF (p<0,001).



| Variable          | Embarazo único (n=80) | Embarazo múltiple (n=73) | p      |
|-------------------|-----------------------|--------------------------|--------|
| sFlt-1 (pg/ml)    | 1323[1119-1594]       | 2081[1764-2821]          | <0,001 |
| PlGF (pg/ml)      | 58,1[44,8-73,2]       | 69,1[49,8-88,1]          | 0,030  |
| Ratio sFlt-1/PlGF | 23[16-32]             | 33[23-43]                | <0,001 |

**Tabla 64.** Comparación de los marcadores angiogénicos en embarazo único y múltiple en el primer trimestre de gestación.

PlGF: Factor de crecimiento placentario; sFlt-1: factor soluble de la tirosín kinasa 1.



**Figura 58.** Diagramas de cajas en el que se muestra la distribución de los marcadores angiogénicos entre el grupo de embarazo único y múltiple en el primer trimestre de gestación.

En segundo lugar, se compararon el grupo de embarazo múltiple bicorial y múltiple monocorial y no se encontraron diferencias significativas para ninguno de los marcadores estudiados (Tabla 65).

| Variable                 | Embarazo múltiple Bicorial (n=53) | Embarazo múltiple Monocorial (n=20) | p     |
|--------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-------|
| <b>SFlt-1</b> (pg/ml)    | 2043[1764-2755]                   | 2168[1677-2813]                     | 0,711 |
| <b>PIGF</b> (pg/ml)      | 67,1[50,4-88,1]                   | 61,3[41,7-73,9]                     | 0,220 |
| <b>Ratio sFlt-1/PIGF</b> | 33[23-42]                         | 34[23-44]                           | 0,565 |

**Tabla 65.** Comparación de los marcadores angiogénicos en embarazo múltiple bicorial y múltiple monocorial en el primer trimestre de gestación.

PIGF: Factor de crecimiento placentario; sFlt-1: factor soluble de la tirosín kinasa 1.

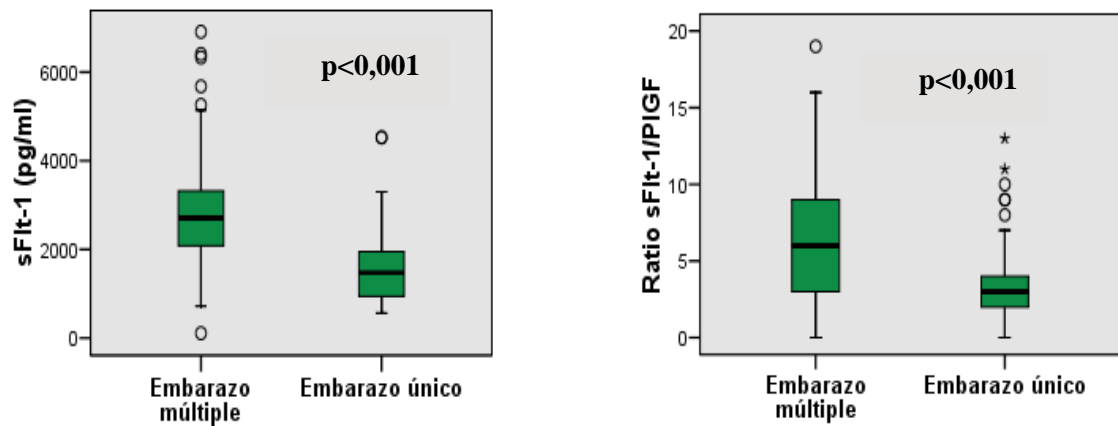
#### **IV.7.1 Segundo trimestre de gestación**

En primer lugar, se compararon el grupo de embarazo único con el de embarazo múltiple (Tabla 66 y Figura 59) y se encontraron diferencias significativas para todos los marcadores: sFlt-1 ( $p < 0,001$ ), PIGF ( $p = 0,036$ ) y el ratio sFlt-1/PIGF ( $p < 0,001$ ).

| Variable                 | Embarazo único (n=80) | Embarazo múltiple (n=73) | p                |
|--------------------------|-----------------------|--------------------------|------------------|
| <b>SFlt-1</b> (pg/ml)    | 1473[933-1956]        | 2710[2072-3325]          | <b>&lt;0,001</b> |
| <b>PIGF</b> (pg/ml)      | 439,5[321,4-553,7]    | 402,6[307,1-506,5]       | 0,513            |
| <b>Ratio sFlt-1/PIGF</b> | 3[2-4]                | 6[3-9]                   | <b>&lt;0,001</b> |

**Tabla 66.** Comparación de los marcadores angiogénicos en embarazo único y múltiple en el segundo trimestre de gestación.

PIGF: Factor de crecimiento placentario; sFlt-1: factor soluble de la tirosín kinasa 1.



**Figura 59.** Diagramas de cajas en el que se muestra la distribución de los marcadores angiogénicos entre el grupo de embarazo único y múltiple en el segundo trimestre de gestación.

En segundo lugar, se compararon el grupo de embarazo múltiple bicorial y múltiple monocorial y no se encontraron diferencias significativas para ningún marcador de los estudiados (Tabla 67).

| Variable                 | Embarazo múltiple<br>Bicorial<br>(n=53) | Embarazo múltiple<br>Monocorial<br>(n=20) | p     |
|--------------------------|---|---|-------|
| <b>SFlt-1</b> (pg/ml)    | 2518[2085-3360]                         | 2829[1799-3222]                           | 0,669 |
| <b>PlGF</b> (pg/ml)      | 402,6[305,1-484,9]                      | 392,8[295,9-702,7]                        | 0,474 |
| <b>Ratio sFlt-1/PlGF</b> | 6[3-9]                                  | 5[3-8]                                    | 0,635 |

**Tabla 67.** Comparación de los marcadores angiogénicos en embarazo múltiple bicorial y múltiple monocorial en el primer trimestre de gestación.

PlGF: Factor de crecimiento placentario; sFlt-1: factor soluble de la tirosín kinasa 1.



## *V. DISCUSIÓN*



El presente trabajo pretende evaluar la utilidad de los biomarcadores seleccionados como posibles predictores de PE en el primer y segundo trimestre de gestación.

En la actualidad, no existe ningún método de cribado que resulte útil para seleccionar a aquellas gestantes con riesgo de desarrollar PE. Las recomendaciones basadas en la presencia de factores de riesgo previos, resultan ineficientes debido a su bajo valor predictivo. La presencia de algún factor de riesgo en el primer control gestacional, como la nuliparidad, la edad materna avanzada o el sobrepeso, se encuentran hasta en dos tercios de todas las embarazadas, lo cual resulta una cantidad de gestantes elevada para un seguimiento más intenso [97]. No obstante, como se describió en el capítulo de introducción, la incidencia de PE se estima entre un 6-8% de todos los embarazos, aumentando en presencia de factores de riesgo [4]. En nuestro caso, utilizándose los criterios de inclusión descritos por Milne F y cols. [98] se obtuvo una incidencia de PE del 11,7%.

El desarrollo de un test de cribado permitirá seleccionar a aquellas gestantes con riesgo “a priori” de desarrollar PE y así realizarles un seguimiento más exhaustivo durante el embarazo. Por tanto, mediante el cribado podría dirigirse los recursos de una forma mucho más precisa, eficiente y racional. Además, dado que la PE es un síndrome heterogéneo al que probablemente se llegue por varias rutas distintas, si los marcadores de cribado de PE son capaces de indicar el camino patogénico predominante en cada caso, el clínico podría ser más selectivo en el momento de aplicar las estrategias terapéuticas más idóneas. Aunque en la actualidad no hay ningún tratamiento para la PE y mucho de los casos acaban en parto prematuro por la gravedad de la situación, son necesarios más estudios en los que se investigue el papel de biomarcadores en la fisiopatología de la PE, pudiendo ser útiles en un futuro como dianas terapéuticas.

## **V.1 Primer trimestre de gestación**

### ***V.1.1 Estudio de los marcadores predictores de PE en el primer trimestre de gestación***

Como se puede observar en el capítulo de resultados, únicamente los factores de riesgo por sí solos no son capaces de predecir el posterior desarrollo de PE en nuestro grupo de gestantes, por lo que, era necesario investigar si el estudio de marcadores bioquímicos y/o ecográficos pudieran predecirla. Nuestros resultados mostraron que los únicos factores de riesgo capaces de discriminar a las gestantes con PE, si cribamos la población, fueron los antecedentes de PE previa, y si no cribásemos la población serían las cifras de PA sistólica y diastólica, y así como los antecedentes de PE previa. El resto de factores de riesgo no fueron capaces de predecir el posterior desarrollo de PE.

El grupo de Nicolaides [99], investigó el desarrollo de un test de cribado mediante la combinación de factores de riesgo maternos, marcadores bioquímicos y ecográficos y establecieron que las gestantes de raza negra, hipertensión crónica y PE previa en embarazos anteriores tienen mayor riesgo de desarrollar PE precoz y las gestantes con mayor IMC, edad y antecedentes familiares de PE, mayor riesgo de desarrollar PE tardía.

Se estudiaron dos grupos de marcadores, por un lado los parámetros bioquímicos clásicos (creatinina, colesterol, GOT, GPT, LDH y plaquetas), los cuales no fueron capaces de discriminar las gestantes que posteriormente desarrollarían PE. Por otro lado, cuando analizamos los marcadores seleccionados como posibles predictores de PE (ácido úrico, triglicéridos, sFlt-1, PlGF, el ratio sFlt-1/PlGF, el MoM PAPP-A, CA125 y la ECA) en la población cribada con los factores de riesgo y sin cribar, algunos de ellos sí son capaces de predecirla.

Las concentraciones de triglicéridos en el primer trimestre de gestación no fueron capaces de predecir el posterior desarrollo de PE, tanto en la población cribada con los factores de riesgo como sin cribar. Esto podría explicarse, debido a que como criterio de inclusión se propuso un  $IMC > 35 \text{ Kg/m}^2$ ; así, al comparar las concentraciones de triglicéridos entre el grupo de riesgo (grupo 1 y 2) y grupo control (grupo 3) sí se observaron diferencias significativas, pero al compararlo entre el grupo 1 y 2 ya no se mantuvieron, ya que ambos grupos presentaban gestantes con IMC elevado.



Diversos autores como Demirci O *y cols.* [72], en el estudio que realizaron entre la 10-20 semanas de gestación, confirmaron que existe una asociación entre valores elevados de triglicéridos y riesgo de desarrollar PE, cuando compararon un grupo de gestantes con PE (n=30) y un grupo control (n=320). En este mismo sentido, se orientan los resultados de Enquobahrie DA *y cols.* [100] estudiaron las concentraciones de triglicéridos en un grupo con PE (n=57) y un grupo control (n=510) y concluyeron que la presencia de valores de triglicéridos mayores de 133 mg/dl aumenta el riesgo de padecer PE en 4,15 (1,50 a 11,43).

Respecto a los valores de MoM PAPP-A, algunos estudios confirman valores disminuidos de PAPP-A en algunas complicaciones del embarazo. Entre ellos destacamos el de Montanari L *y cols.* [101], en el que se observa que los valores bajos de PAPP-A se asocian con un incremento del riesgo de desarrollar CIR durante el embarazo. Ranta JK *y cols.* [102], confirmaron que concentraciones bajas de PAPP-A durante el primer trimestre de gestación predicen el desarrollo de PE (n=195), parto prematuro (n=213) y fetos con pesos menores para su edad gestacional (n=275) al compararlos con un grupo control. Otros autores en cambio, como Saruhan Z *y cols.* [103], no encontraron asociación entre valores bajos de PAPP-A con el posterior desarrollo de PE, parto prematuro, hipertensión gestacional, diabetes gestacional, etc. Al igual que Mikat B *y cols.* [104], que tampoco encontraron diferencias significativas en los valores de PAPP-A entre gestantes con PE y grupo control.

En nuestro caso, el valor del MoM de PAPP-A fue capaz de discriminar la población de riesgo (grupo 1 y 2) y grupo control (grupo 3). Pero al comparar entre sí el grupo de riesgo que desarrolló PE (grupo 1) y el grupo de riesgo que no la desarrolló (grupo 2), se pierde el poder de discriminación. Esto posiblemente sea porque en el grupo 2 hay gestantes con patologías como CIR, hipertensión gestacional, diabetes gestacional, etc. y pueden disminuir la mediana del MoM PAPP-A y así no encontrar diferencias significativas, aunque se pudo observar valores menores del MoM PAPP-A en las gestantes con PE (grupo 1) respecto al resto de la población.

Akolekar R *y cols.* [105], consideraron que el MoM de PAPP-A es buen marcador para su inclusión en un test de cribado de PE en el primer trimestre de gestación, junto a otros marcadores y características maternas.

Al ser un marcador que se determina de rutina en el cribado de cromosomopatías del primer trimestre no supondría una determinación adicional, por lo que tendría que valorarse su inclusión cuando se estableciera un futuro test de cribado de PE del primer trimestre de gestación.

Al analizar los marcadores angiogénicos sFlt-1 y PlGF, observamos cómo sFlt-1 no es capaz de discriminar entre una población de riesgo (grupo 1 y 2) y el grupo control (grupo 3), ni tampoco al comparar el grupo con PE (grupo 1) con cualquiera de los demás grupos. Esto podría ser debido a que las concentraciones de sFlt-1 durante los dos primeros trimestres permanecen estables, aumentando a partir del tercer trimestre de gestación en embarazos normales [43]. Contrariamente ocurre con las concentraciones de PlGF, que aumentan durante los dos primeros trimestres de embarazo, asegurando un incremento del flujo útero-placentario con la mejora correspondiente del aporte vascular para mantener las necesidades fetales, y disminuye a partir del tercer trimestre hasta el parto [43]. Hay una gran cantidad de estudios que evalúan la utilidad de sFlt-1 y PlGF como predictores de PE en el primer trimestre de gestación. Nuestros resultados mostraron cómo PlGF es un buen marcador predictor de PE cuando se comparó el grupo 1 con el 2 (población cribada con los factores de riesgo), o el grupo 1 con el grupo 2 y 3 (población sin cribar), no ocurriendo lo mismo con el sFlt-1. Akolekar y cols. [106] determinaron las concentraciones de sFlt-1 y PlGF en la 11-13 semanas de gestación en un grupo de 90 gestantes con PE y un grupo control de 180 gestantes y no obtuvieron diferencias significativas para sFlt-1 pero sí para PlGF, y concluyeron que sFlt-1 no es un buen marcador predictor de PE en el primer trimestre de gestación. En el mismo sentido, Lynch AM y cols. [107] reclutaron 668 gestantes con embarazos únicos entre las 10-15 semanas de gestación en un periodo de tres años, se diagnosticaron 31 PE y se compararon los valores de sFlt-1 y PlGF en ambos grupos. Se encontraron concentraciones estadísticamente significativas de PlGF más bajas en el grupo con PE respecto al grupo control pero no hubo diferencias en el caso de sFlt-1.

Levine RJ y cols. [108], reclutaron un grupo de 120 gestantes con PE y un grupo control del mismo número. Determinaron ambos marcadores angiogénicos durante los tres trimestres de gestación y obtuvieron diferencias significativas para los dos marcadores estudiados. El PlGF resultó ser predictor de PE en el primer trimestre de gestación, pero la mayor significación estadística se encontró cinco semanas antes que

las gestantes desarrollaran la enfermedad. Sin embargo, el sFlt-1 no fue predictor en el primer trimestre de gestación, pero al igual que el PIGF, sí discriminó las gestantes con PE cinco semanas antes que desarrollaran la enfermedad.

Nicolaides KH y cols. [99], investigaron el desarrollo de un test de cribado de PE mediante la combinación de las características maternas y marcadores bioquímicos en el primer trimestre de gestación. Incluyeron un grupo de gestantes con PE precoz (n=26), tardía (n=90), hipertensión gestacional (n=85) y un grupo control (n=201). Entre los marcadores utilizados incluye el PIGF y establece diferencias significativas en las gestantes que desarrollaron PE que tuvieron concentraciones disminuidas de este marcador, no ocurriendo así en las gestantes con hipertensión gestacional.

La severidad de la PE se ha correlacionado positivamente con los valores del ratio sFlt-1/PIGF circulantes. Dicho ratio también se encuentra aumentado en la PE sobreañadida sobre enfermedades como la hipertensión crónica, lupus eritematoso sistémico y la glomerulonefritis. Por último, también se ha observado que los valores del ratio de las mujeres que han padecido PE se normalizan tras el parto [109]. Nuestros resultados mostraron cómo el ratio sFlt-1/PIGF es capaz de discriminar el grupo 1 (gestantes con PE) del grupo 2 (grupo de riesgo que no desarrolló PE) y del grupo 2 y 3 (grupo de riesgo más grupo control), observándose valores aumentados de este ratio en el grupo con PE respecto los otros dos. Sin embargo, no es práctica su determinación desde el punto de vista económico del laboratorio, ya que la medida del PIGF posee mayor poder de discriminación que la del ratio sFlt-1/PIGF y con ello no tendríamos que realizar una medida adicional.

Otros de los marcadores estudiados fueron el ácido úrico, CA125 y la ECA. Respecto al ácido úrico, nuestros resultados no mostraron diferencias significativas entre el grupo con PE y cualquiera de los otros grupos en el primer trimestre de gestación. Sin embargo, Laughon SK y cols. [110], estudiaron los valores de ácido úrico en un grupo de gestantes con PE (n=60), otro con hipertensión gestacional (n=111) y un grupo control (1.370) en las  $9\pm 2,5$  semanas de gestación, y encontraron diferencias significativas en los valores de ácido úrico en el grupo con PE, siendo las concentraciones más elevadas respecto a los otros dos grupos, pero no se encontró la misma situación en el caso de hipertensión gestacional. Existen escasos datos actuales que confirman al ácido úrico como predictor de PE en el primer trimestre de gestación.

En nuestro estudio, como hemos mencionado, nuestros resultados no lo postula como buen predictor de la misma.

El CA125 es un marcador poco estudiado en la fisiopatología de la PE. Nuestros resultados no mostraron diferencias significativas en las gestantes con PE respecto a los otros grupos de estudio, al igual que Bon GG y cols. [111], que estudiaron las concentraciones de CA125 en gestantes con embarazos complicados (PE, CIR, abortos espontáneos, etc.) (n=120), y las compararon con gestantes con embarazos normales (n=350), no obteniendo tampoco diferencias significativas. Pocos estudios hay más sobre este marcador en el primer trimestre de gestación, siendo más estudiado en PE en el segundo y tercer trimestre.

En el caso de la ECA, tampoco se observaron diferencias significativas entre los grupos de estudio. Hay escasos estudios donde evalúen las concentraciones séricas de ECA como predictor de PE en el primer trimestre de gestación, encontrando un mayor número en el tercer trimestre [112]. Las investigaciones se han centrado más en los últimos años en la asociación de la presencia de polimorfismos genéticos de la ECA I/D con el desarrollo de PE. Nuestros resultados mostraron cómo los valores de ECA en el primer trimestre no son capaces de predecir el posterior desarrollo de PE en ninguno de los casos.

### ***V.1.2 Estudio de correlaciones y análisis de la influencia de los factores de riesgo en el primer trimestre de gestación***

Del estudio de correlaciones entre marcadores en el primer trimestre de gestación, destacamos una correlación negativa encontrada entre el ácido úrico y las concentraciones de PIGF y el MoM PAPP-A. Esto podría explicarse ya que el ácido úrico se ha utilizado como indicador de la severidad de la PE [113] y aunque en nuestro estudio las concentraciones de ácido úrico no son predictoras, es lógico que correlacione con valores bajos de PIGF y MoM PAPP-A presentes en las gestantes con PE.

Otras correlaciones a destacar son las obtenidas entre los marcadores angiogénicos y la ECA. Se observó una correlación positiva tanto del sFlt-1 como del ratio sFlt-1/PIGF con la ECA. Se ha propuesto que la presencia de autoanticuerpos que estimulan a los ATI tiene un papel en la fisiopatología de la PE, ya que se unen a los ATI de distintas células, incluyendo el trofoblasto, e incrementan a los factores que

contribuyen a la patogénesis de la PE. Durante el embarazo normal, la placenta produce sFlt-1 a través de la estimulación por la angiotensina II de las células del trofoblasto, por lo que la sobrestimulación del ATI por los autoanticuerpos puede llevar a la producción excesiva de sFlt-1 [114].

Además se analizó la influencia de los factores de riesgo sobre los marcadores propuestos como predictores de PE, obteniéndose valores de ácido úrico aumentados en las pacientes con un IMC > 35 kg/m<sup>2</sup> y con una PA diastólica ≥ 80 mmHg. Rajasingam D y cols. [115], estudiaron a un grupo de gestantes obesas y obtuvieron también una correlación positiva entre los valores de ácido úrico y el IMC.

Hay que destacar la relación encontrada entre el tabaco y los marcadores angiogénicos. Nuestros resultados mostraron en las gestantes fumadoras valores mayores de PIGF y valores menores del ratio sFlt-1/PIGF. Esto concuerda con lo descrito en la bibliografía, como es el caso de Zhai D y cols. [116], los cuales investigaron el efecto del monóxido de carbono del tabaco y su asociación con el desarrollo de preeclampsia. Para ello, analizaron los partos entre 2004 y 2009 y observaron que la exposición materna de forma moderada se asocia de forma independiente con un descenso del riesgo de PE. Establecen que el monóxido de carbono tiene efecto sobre la placenta reduciendo el riesgo de PE ya que promueve la invasión trofoblástica, reduce la respuesta inflamatoria, aumenta el flujo sanguíneo útero-placentario, disminuye la apoptosis producida por la hipoxia placentaria y regula los sistemas antioxidantes placentarios. Se ha relacionado también la exposición al monóxido de carbono con concentraciones disminuidas de sFlt-1. Además, Kreiser D y cols. [117], determinaron las concentraciones de monóxido de carbono en un grupo con PE (n=31) y un grupo de control de gestantes normotensas (n=44) y encontraron que los valores de monóxido de carbono son menores en las gestantes con PE respecto al grupo control. El monóxido de carbono tiene un efecto similar a la enzima hemo oxigenasa 1, que promueve el crecimiento de los vasos sanguíneos en la placenta. Por tanto, es lógico que nuestros resultados muestren concentraciones mayores de PIGF en las gestantes fumadoras. Serían necesarios más estudios sobre el papel del monóxido de carbono en la PE ya que en un futuro podría utilizarse como agente terapéutico.

### ***V.1.3 Análisis del rendimiento diagnóstico de los marcadores predictores de PE en el primer trimestre de gestación***

El análisis realizado de curvas ROC entre el grupo con PE (grupo 1) y el grupo de riesgo que no desarrolló PE (grupo 2), mostró que el PIGF es el mejor marcador predictor de PE en el primer trimestre de gestación, con una sensibilidad del 62,5% y TFP del 10%, y valores  $\leq 37,6$  pg/ml presentaron un riesgo de 12,36 (1,94 a 78,64) de desarrollar la enfermedad. Se realizó también el análisis de curvas ROC entre el grupo con PE (grupo 1) y el resto de los grupos que no desarrollaron PE (grupo 2 y 3) y se obtuvo la misma sensibilidad que en el caso anterior, utilizando los mismos puntos de corte, pero en este caso aumentaba la TFP.

Por tanto, si utilizáramos el PIGF como predictor de PE, sería más práctico cribar la población con los factores de riesgo utilizados en este estudio y así obtendríamos la misma sensibilidad y menor TFP que si lo determinásemos en la población total. Se harían menor número de determinaciones, pues sólo se realizarían al grupo de riesgo, por lo que el cribado de esta manera tendría un mayor coste-efectividad.

McElrath TF y cols. [118], analizaron el poder diagnóstico del PIGF durante el embarazo en gestantes con PE (n=139) y un grupo control (n=1.951) y obtuvieron un 55% de sensibilidad y un 43% de especificidad y concluyeron que no es un buen marcador para incluirlo en el screening de PE. Sin embargo, Vandenberghe G y cols. [119], estudiaron si el PIGF es un buen marcador predictor en el primer trimestre en gestantes con PE (n=23) e incluyeron cinco controles por cada caso. Al igual que en nuestro caso, el ABC obtenido en PE fue de 0,8, considerándolo un buen marcador en caso de PE.

## V.2 Segundo trimestre de gestación

### V.2.1 Estudio de los marcadores predictores de PE en el segundo trimestre de gestación

En el segundo trimestre de gestación, de todos los parámetros bioquímicos clásicos, sólo se encontraron diferencias significativas para los valores de colesterol en el grupo de riesgo con el grupo control o al comparar los tres de grupos de estudio.

Los valores de triglicéridos y colesterol en la población de riesgo (grupo 1 y 2) fueron mayores que en el grupo control (grupo 3) pero no fueron predictores de PE en el segundo trimestre de gestación. Baker AM y cols. [120], estudiaron si había asociación entre el perfil lipídico y el desarrollo de PE (n=50) y observaron que altas concentraciones de triglicéridos y colesterol en el segundo trimestre de gestación, están asociados con PE leve pero no con severa. Otro estudio [121] también encontró asociación entre la hipertrigliceridemia y el desarrollo de PE (n=53) en el segundo trimestre de gestación. En nuestro caso, los valores de triglicéridos y colesterol no predicen el desarrollo de PE en ninguno de los dos trimestres de gestación estudiados, posiblemente por lo descrito con anterioridad, al utilizar como criterio de inclusión  $IMC > 35 \text{ Kg/m}^2$ .

Respecto a los marcadores angiogénicos en el segundo trimestre de gestación, si cribamos la población con los factores de riesgo (grupo 1 y 2), estos marcadores no son capaces de discriminar a las gestantes que desarrollarán PE, al contrario que en el primer trimestre de gestación. Ghosh SK y cols. [122], evaluaron cuándo era más efectiva la determinación de PIGF, si en el primer o segundo trimestre de gestación, y establecieron que el PIGF es más efectivo en el segundo trimestre de gestación. Al igual que nuestros resultados, si no cribamos la población como en el estudio anterior, PIGF es un buen predictor del posterior desarrollo de PE. Al contrario que nuestros resultados, Rohra DK y cols. [123], analizaron si PIGF y sFlt-1 eran capaces de predecir el posterior desarrollo de PE; para ello reclutaron gestantes normotensas (n=1.307) que no cumplían ninguno de los factores de riesgo, finalizando el estudio un total de 611 y de ellas un 6,4% de las gestantes desarrollaron PE. Establecieron que de los dos marcadores estudiados, sFlt-1 presentaba mejor poder diagnóstico en las 15 semanas de gestación y PIGF en las 22 semanas de gestación y concluyen que el mejor predictor en el segundo trimestre es sFlt-1 sin combinación con PIGF. Estos resultados son

contrarios a los encontrados en nuestro estudio ya que sFlt-1 ni en el primer ni en el segundo trimestre es capaz de discriminar a las gestantes que desarrollarán PE.

Otros estudios como el de Lambert-Messerlian GM y cols. [124], mostraron resultados como el nuestro, donde el PIGF pero no sFlt-1 es capaz de discriminar a aquellas gestantes que desarrollarán PE (n=45) en el segundo trimestre de gestación sin cribar inicialmente con los factores de riesgo. Schmidt M y cols. [125], determinaron las concentraciones de PIGF entre las 15-18 semanas de gestación y encontraron que los valores de PIGF en el grupo con PE (n=7) eran significativamente menores que el de las gestantes que no desarrollaron PE (n=54). Kim SY y cols. [126], determinaron las concentraciones de sFlt-1 y PIGF en el segundo trimestre de gestación y encontraron valores aumentados de sFlt-1 y disminuidos de PIGF en el grupo con PE (n=46) respecto al grupo control (n=100). Establecieron que el ratio sFlt-1/PIGF fue el marcador con mayor poder diagnóstico. Al contrario que nuestros resultados, que mostraron como el ratio sFlt-1/PIGF no fue capaz de discriminar las gestantes con PE (grupo 1) de las que presentaron factores de riesgo pero no la desarrollaron (grupo 2), ni tampoco cuando se comparó el grupo con PE (grupo 1) con el resto de gestantes que no desarrollaron PE (grupo 2 y 3).

Al igual que ocurría en el primer trimestre de gestación, ni el ácido úrico y CA125 discriminaron las gestantes que posteriormente desarrollarían PE. Zhou J y cols. [127], estudiaron las concentraciones de ácido úrico en el segundo trimestre de gestación y observaron que la hiperuricemia aumenta un 1,99 el riesgo de padecer PE. Wolak T y cols. [128], examinaron la asociación de las concentraciones de ácido úrico en las 20 semanas de gestación y el desarrollo de diabetes gestacional y PE. Para ello estudiaron los nacimientos desde 2001 a 2007 y concluyeron que los valores altos de ácido úrico durante las 20 semanas de gestación se asocian con alto riesgo de desarrollar PE leve y diabetes gestacional. Nuestros resultados sobre el ácido úrico no fueron significativos pero sí observamos que se correlacionaron de forma negativa con PIGF y positiva con el ratio sFlt-1/PIGF.



Como se ha comentado, hay pocos estudios que evalúen el comportamiento del CA125 en la fisiopatología de la PE y más aún en el primer o segundo trimestre de gestación como posible predictor de la misma. Los estudios publicados se centran en el tercer trimestre de gestación, como es el caso de Ozat M y cols. [74], que estudiaron las concentraciones del CA125 en el tercer trimestre de gestación en tres grupos de gestantes: grupo control (n=100), grupo con PE leve (n=78) y grupo con PE severa (n=64) y observaron que los valores de CA125 correlacionaron de forma positiva con la tensión arterial, ácido úrico y proteinuria y de forma negativa con el peso al nacimiento. Establecieron un punto de corte de 50 IU/ml, obteniendo una sensibilidad y especificidad de 93,7 y 88% respectivamente y concluyeron que es un marcador que podría explicar el proceso inflamatorio en la PE. Otro estudio realizado también en el tercer trimestre de gestación, es el de Cebesoy FB y cols. [129], determinaron la asociación de CA125 y PCR con la PE y eclampsia, para ello incluyen un grupo de 54 gestantes con PE/eclampsia y un grupo control de 56 gestantes. Los resultados que obtuvieron fueron valores altos de PCR y CA125 en las del grupo con preclampsia/eclampsia respecto al grupo control y también encontraron diferencias entre PE leve y severa respecto a estos marcadores, además de una correlación positiva entre las concentraciones de CA125 y la tensión arterial. En nuestro caso, el CA125 no ha sido un buen marcador predictor de PE en el primer o segundo trimestre de gestación y no se observó ninguna correlación con otros marcadores estudiados o factores de riesgo.

Por último, las concentraciones de la ECA en el segundo trimestre gestación mostraron ser el único marcador de los estudiados capaz de discriminar a las gestantes que desarrollarían PE si cribamos la población con factores de riesgo. Velloso EP y cols. [130], determinaron los niveles de ECA en el tercer trimestre de gestación y encontraron diferencias significativas entre el grupo con PE (n=20) y el grupo control (n=20). Son importantes los datos obtenidos sobre la ECA en el segundo trimestre de gestación, ya que con estos resultados podemos observar que el sistema renina-angiotensina-aldosterona podría jugar un papel clave en la fisiopatología de la PE [46].

Matias DS y cols. [131], evaluaron los parámetros del estudio Doppler en gestantes con factores de riesgo de desarrollar PE y los compararon con los valores de referencia descritos en las gestantes sanas. También estudiaron si existía relación entre

los parámetros del estudio Doppler y la edad gestacional. Obtuvieron diferencias significativas tanto para el IP como el IR pero no observaron relación entre la edad gestacional y los parámetros del estudio Doppler.

En nuestro caso, el estudio Doppler no era capaz de discriminar entre la población de riesgo (grupo 1 y 2) y el grupo control (grupo 3), esto podría ser debido, a que hubo gestantes que se incluyeron por presentar factores de riesgo, pero que no desarrollaron PE ni presentaron ninguna complicación del embarazo, por tanto, el estudio Doppler de estas gestantes fue normal e hicieron disminuir la media del IP e IR, y por eso podrían no presentar diferencias significativas respecto al grupo control. Sin embargo, sí encontramos diferencias significativas al comparar el grupo con PE (grupo 1) con la población cribada con factores de riesgo (grupo 2) y con la población sin cribar (grupo 2 y 3), observándose valores de IP e IR mayores en las gestantes con PE.

Napolitano R y cols. [132], estudiaron los cambios en la arteria uterina mediante el IP del estudio Doppler entre el primer y segundo trimestre de gestación y su relación con el posterior desarrollo de PE. De las 3.549 gestantes incluidas, 126 desarrollaron PE y concluyeron que el IP calculado entre el primer y segundo trimestre de gestación es un buen predictor del posterior desarrollo de PE. Nuestros resultados mostraron como el IP e IR fueron predictores de PE, pero el IR presentó mejor poder de discriminación respecto al IP, y los valores de  $IR \geq 0,7$  presentaron un riesgo de 10,77 (1,78-65,09) de desarrollar PE para nuestra población de estudio.

### ***V.2.2 Estudio de correlaciones y análisis de la influencia de los factores de riesgo en el segundo trimestre de gestación***

Del estudio de correlaciones, se obtuvo una correlación negativa del PIGF con el ácido úrico e IR y una positiva entre el ácido úrico y el ratio sFlt-1/PIGF.

Del análisis de la influencia de los factores de riesgo sobre los marcadores propuestos como predictores de PE en el segundo trimestre de gestación, se observó que las gestantes con valores de PA diastólica  $\geq 80$  mmHg presentaban concentraciones menores de PIGF y mayores de ácido úrico. Son lógicos estos resultados, ya que la PE se asocia con concentraciones disminuidas de PIGF e hiperuricemia. Además se observó que las gestantes nulíparas presentaron concentraciones mayores de sFlt-1. La nuliparidad es considerada un factor de riesgo de PE debido a la falta de tolerancia

inmunológica a los antígenos paternos, la cual se desarrollará en embarazos posteriores con la misma pareja. De ahí también que las técnicas de fecundación in vitro con donación de gametos aumenten el riesgo de desarrollar PE [133].

### ***V.1.3 Análisis del rendimiento diagnóstico de los marcadores predictores de PE en el segundo trimestre de gestación***

En el caso de cribar la población con factores de riesgo, el análisis de curvas ROC mostró que la ECA no resultó ser un buen predictor por su baja sensibilidad (50%) y alta TFP (16,7%), y si cribásemos la población con los factores de riesgo, el PIGF mostró mejor sensibilidad (75%) respecto la ECA (62,5%) y menor TFP (17,8% frente a 21%).

Schmidt M y cols. [125], analizaron si el PIGF era un buen predictor de PE al inicio del segundo trimestre de gestación (en la 15-18 semanas de gestación). Utilizaron el punto de corte de 41,84 pg/ml y obtuvieron una sensibilidad del 87% con una especificidad del 83%, mayor que la encontrada en nuestros resultados, aunque en nuestro caso, la determinación de PIGF en el segundo trimestre de gestación fue en la 19-21 semanas de gestación, por tanto, estos resultados no son comparables a los nuestros.

Nicolaides KH y cols. [51], establecieron que el estudio Doppler de las arterias uterinas para la predicción de PE, presenta un bajo VPP (20%) y recomiendan la búsqueda de biomarcadores para combinarlo con el estudio Doppler y así desarrollar un test de cribado. Nuestros resultados mostraron como el IR fue mejor marcador que el IP en todos los casos. El IR presentó una buena sensibilidad del 71,4% tanto si cribamos como si no la población, pero el VPP en caso de no cribar la población sería prácticamente igual al descrito por Nicolaides KH, de un 26,3% y si la cribamos se incrementaría hasta el 45,4%. De todos los marcadores estudiados como posibles predictores de PE, el IR fue el que presentó la mejor sensibilidad y menor TFP.

### **V.3 Combinación de marcadores para la predicción de la PE**

Como se ha comentado anteriormente, el objetivo principal de nuestro estudio fue la búsqueda de biomarcadores capaces de predecir el posterior desarrollo de PE y analizar si la combinación de ellos aumentaba el poder diagnóstico o no.

Como se puede observar en el capítulo de resultados, para predecir el desarrollo de PE en una población cribada con los factores de riesgo, la mejor combinación fue la medida de PIGF en el primer trimestre y el IR y la ECA en el segundo trimestre, obteniendo así una sensibilidad del 87,5% y un VPP del 70% con una baja TFP del 5,2%. La inclusión de la ECA en esta combinación nos permitió obtener un VPP alto con una TFP baja respecto a la combinación de PIGF del primer trimestre e IR del segundo trimestre.

Otra opción sería si no se cribara la población según los criterios de inclusión, y se le determinara la combinación de marcadores a la población total. La mejor combinación se consiguió utilizando el PIGF del primer trimestre y el IR y la ECA del segundo trimestre, se obtuvo una sensibilidad y TFP prácticamente igual que si cribásemos a la población con los factores de riesgo. Sin embargo, el VPP obtenido fue menor que si cribásemos a la población con los factores de riesgo y habría un aumento del coste económico al tener que realizar las determinaciones a todas las gestantes.

### **V.4 Estudio genético de la ECA y de la Apo E**

Nuestros resultados sobre el análisis genético de la ECA no mostraron diferencias significativas entre las gestantes con PE y el grupo control. Se ha relacionado el genotipo de la ECA D/D con el desarrollo de PE, ya que este genotipo aumentaría la actividad de la ECA. En nuestro caso, solo una de las gestantes con PE presentó este genotipo mientras que el 66,6% resultaron ser heterocigotos. El estudio de Li H *y cols.* [80], mostró resultados similares a los nuestros, incluyeron 133 gestantes con PE y 105 gestantes controles y no encontraron asociación del genotipo D/D con la presencia de PE. Sin embargo, hay diversos estudios que relacionan este genotipo de la ECA D/D con el desarrollo de PE. Entre los que se encuentran el de Rahimi Z *y cols.* [134], obtuvieron que la presencia del alelo D de la ECA era asociado con un riesgo de 1,8 de desarrollar PE. Bereketoğlu C *y cols.* [79], realizaron un estudio en el que incluyeron 120 gestantes con PE y 116 gestantes controles. Encontraron que el genotipo

de la ECA D/D fue más frecuente en PE que en controles de forma estadísticamente significativa.

Respecto al estudio del polimorfismo de la Apo E, nuestros resultados sí mostraron diferencias significativas entre las gestantes con PE y el grupo control. La presencia del alelo  $\epsilon 3/\epsilon 3$  es la más frecuente en la población caucásica y en nuestro caso, el 33,3% de las gestantes con PE y el 83% del grupo control lo presentaron. Ahmadi R y cols. [135], obtuvieron una frecuencia del alelo  $\epsilon 2$  más baja en las gestantes con PE respecto al grupo control. Al contrario que Nagy B y cols. [136], encontraron que la frecuencia del alelo  $\epsilon 2$  era más alta en las gestantes con PE severa (n=54) respecto a los controles (n=52). Otros autores como Belo L y cols. [137], no encontraron asociación entre el genotipo de la Apo E y la PE. Como se puede observar hay estudios contradictorios sobre qué genotipo de la Apo E se asocia con el desarrollo de PE.

Nuestros resultados mostraron que el genotipo  $\epsilon 3/\epsilon 4$  fue el más frecuente en las gestantes con PE (50%) respecto al grupo control (6,6%), y en segundo lugar, el genotipo  $\epsilon 2/\epsilon 3$  fue de un 16,6% respecto al 10% en el grupo control. Esto concuerda con el estudio realizado por Francoual J y cols. [138], en el que obtuvieron el segundo genotipo más frecuente después del  $\epsilon 3/\epsilon 3$ , el  $\epsilon 3/\epsilon 4$  con una frecuencia del 14,3% en las gestantes con PE (n=49), aunque no resultó ser significativo respecto al grupo control (n=55), al contrario que en nuestro caso. También Stiefel P y cols. [139], encontraron una frecuencia del genotipo  $\epsilon 3/\epsilon 4$  y  $\epsilon 4/\epsilon 4$  del 24,4% en las gestantes con PE y del 13,4% en el grupo control.

## **V.5 Comparación de los marcadores angiogénicos (sFlt-1 y PlGF) entre embarazos únicos y múltiples en el primer y segundo trimestre de gestación**

En primer lugar, se analizaron los datos del primer trimestre de gestación y se observaron diferencias significativas de ambos marcadores y el ratio sFlt-1/PlGF entre embarazo único y múltiple. Se observó que en el embarazo múltiple los valores de los marcadores angiogénicos son mayores respecto al otro grupo. En un estudio del 2012, Sánchez O y cols. [140], analizaron los marcadores angiogénicos en el primer trimestre de gestación en embarazos únicos (n=50) y múltiples (n=61) y dentro de este grupo diferenciaron si había sido por FIV o no. Los embarazos múltiples que incluyeron fueron bicoriales y obtuvieron valores de sFlt-1 y PlGF mayores en embarazo múltiple y valores de sFlt-1 mayores en el grupo múltiple mediante FIV respecto al múltiple mediante concepción de forma natural. Estos resultados concuerdan con los nuestros obtenidos en el primer trimestre de gestación y en nuestro caso, el grupo de embarazo múltiple estuvo formado por un grupo monocorial y otro bicorial y no se encontraron diferencias significativas para ningún marcador de los estudiados

En segundo lugar, se analizaron los datos del segundo trimestre de gestación y se observaron diferencias significativas para el sFlt-1 y el ratio sFlt-1/PlGF entre embarazo único y múltiple y no encontramos diferencias cuando se comparó embarazo múltiple bicorial y monocorial para ningún marcador de los estudiados en ninguno de los dos trimestres de gestación.

Boucoiran I y cols. [141], estudiaron el PlGF y el sFlt-1 como predictores de PE en las 12-18 y 24-26 semanas de gestación en embarazo único y múltiple. Obtuvieron una sensibilidad para el PlGF del 31% para el diagnóstico de PE en embarazo único y del 60% para embarazo múltiple entre 12-18 semanas de gestación. Los valores de PlGF y sFlt-1 fueron mayores en ambas visitas en embarazo múltiple respecto al único. La mayoría de los estudios publicados sobre marcadores angiogénicos incluyen únicamente gestantes con embarazos únicos. Sin embargo, el embarazo múltiple constituye un factor de riesgo de PE y cada vez se está incrementando su número debido al uso de técnicas de reproducción asistida, por lo que sería interesante que en los estudios se incluyera gestantes con embarazo múltiple, para así poder establecer los valores de referencia en esta población.

## V.6 Aproximación al establecimiento de un test de cribado para la PE

Hay diversos estudios publicados que investigan el desarrollo de un test de cribado de PE en el primer trimestre de gestación. Entre ellos encontramos el de Sczzocchio E y cols. [142], que propusieron la combinación de PAPP-A, TA, estudio Doppler y características maternas y obtuvieron una sensibilidad 80,8% con una TFP del 10% para la detección de PE precoz. El grupo de Nicolaides KH desarrollaron un test de cribado del primer trimestre que incluía características maternas, IP del estudio Doppler, PAPP-A, PIGF y los datos de TA con el que se predecía el 96% de los casos de PE precoz y el 54% de todas la PE con una TFP del 10% [105]. Otro estudio de Nicolaides KH y cols. [99], determinaron los marcadores angiogénicos como predictores de PE en el primer trimestre de gestación e incluyeron gestantes con PE precoz y tardía, hipertensión gestacional y un grupo control. Obtuvieron una sensibilidad para la PE precoz de 88,5% y de 46,7% para la tardía con una TFP del 5%, combinando el PIGF con otros marcadores, características maternas y el IP del estudio Doppler. Se obtuvo una sensibilidad mayor en caso de PE precoz respecto a la tardía.

En nuestro caso, debido al pequeño tamaño muestral, no hemos podido diferenciar ambos grupos. A pesar de ello, con la combinación elegida de marcadores para predecir la PE, teníamos una sensibilidad (87,5%) similar a la de Nicolaides KH con una TFP del 5,2%. A pesar del gran número de investigaciones que se están realizando para poder desarrollar un test de cribado de la PE, todavía no hay un consenso entre que marcadores son los óptimos para su inclusión, esto es debido a la gran cantidad de estudios contradictorios publicados.

En el caso de un futuro desarrollo de un test de cribado de PE, tendríamos que tener en cuenta los resultados obtenidos del análisis de regresión lineal múltiple de los principales factores de riesgo, y la influencia que éstos ejercen sobre los marcadores propuestos como posibles predictores de PE en la población de riesgo. En el primer trimestre de gestación, se observó que la nuliparidad y el embarazo por FIV van a influir en los valores de sFlt-1, el tabaco en el PIGF, la edad y el tabaco en el MoM PAPP-A, y en el segundo trimestre de gestación la edad influyó en los valores de sFlt-1.

Los análisis futuros se deben centrar en la inclusión de un mayor número de gestantes para así aumentar la potencia estadística de los resultados y en el

establecimiento de los valores de referencia de los marcadores que han resultado ser útiles como predictores de PE para nuestra población de estudio, permitiendo con ello el cálculo de los MoM para cada semana de gestación.

## **V.7 Limitaciones del estudio**

La principal limitación de este estudio fue el pequeño tamaño muestral que pudo ocasionar un sesgo en las observaciones y en la potencia estadística. Sin embargo, esta debilidad se ve superada por el hecho de que se incluyó una población uniforme seleccionada a través de los factores de riesgo descritos y se realizó un seguimiento durante todo el embarazo, que permite obtener una visión a largo plazo antes de que se produzca el desarrollo de la enfermedad.

En el presente estudio se ha empleado una metodología apropiada con la que se ha conseguido aportar importantes conclusiones a tener en cuenta para la puesta en práctica en un futuro, de un test de cribado precoz de la PE en gestantes con factores de riesgo. Sin embargo, los resultados obtenidos deben valorarse por el momento con precaución hasta que puedan ser corroborados por nuevos estudios.

## **V.8 Conflicto de intereses**

Este estudio está financiado en parte por Roche Diagnostics y parte de las gestantes incluidas pertenecen al estudio multicéntrico (formado por once hospitales españoles) que se está realizando actualmente, cuyo título es: “Determinación de la tirosín-kinasa 1 soluble fms-like (sFlt-1) y del factor de crecimiento placentario (PIGF) como posibles marcadores en la predicción de preeclampsia precoz”. El investigador principal del estudio es el Dr. Alfredo Perales (Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Universitario de la Fe de Valencia) y Dr. Francisco Álvarez (Laboratorio, Hospital Central de Asturias) y los investigadores en el Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia son: Dr. Juan Luis Delgado (Unidad de Medicina Fetal, Servicio de Obstetricia y Ginecología) y la Dra. M<sup>a</sup> Desamparados Sarabia (Laboratorio). Este trabajo no presenta conflicto de intereses.



## ***VI. CONCLUSIONES***



### **Conclusión 1**

De los marcadores estudiados como posibles predictores de PE en gestantes con factores de riesgo, han resultado de utilidad el PIGF y el ratio sFlt-1/PIGF en el primer trimestre y la ECA en el segundo trimestre de gestación.

### **Conclusión 2**

La combinación de marcadores más eficiente para la predicción de PE fue utilizando el PIGF del primer trimestre de gestación con un punto de corte  $\leq 37,6$  pg/ml, el índice de resistencia  $\geq 0,7$  y la ECA  $\geq 40,4$  U/L del segundo trimestre de gestación, en la población cribada con los factores de riesgo, pudiendo predecir el 87,5% de las gestantes que desarrollarían PE con una TFP del 5,2%.

### **Conclusión 3**

El estudio genético mostró una asociación del genotipo de la Apo  $\epsilon 3/\epsilon 4$  con el desarrollo de PE pero no con el polimorfismo genético de la ECA D/D.

### **Conclusión 4**

Se observaron diferencias significativas en los marcadores angiogénicos (sFlt-1 y PIGF) entre embarazos únicos y múltiples en el primer y segundo trimestre de gestación.



## ***VII. ANEXOS***



**ANEXO I**

Carta del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca aprobando el estudio.



Dr. D. Juan Salinas Ramos  
Presidente del CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca

**CERTIFICA**

1º. Que el CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca en su reunión del día 21/12/2009, acta 11/09 ha evaluado la propuesta del promotor referida al estudio:

**Título:** "DETERMINACIÓN DE LA TIROSIN-KINASA 1 SOLUBLE fms-like (sFit-1) Y EL FACTOR DE CRECIMIENTO PLACENTARIO (PIGF) COMO POSIBLES MARCADORES PARA EL DIAGNÓSTICO PRECOZ Y PRONÓSTICO DE LA PREECLAMPSIA"

**Código Promotor:** PIGF

**Promotor:** Roche Diagnostics S.L.

**Monitor/CRO:** Experior, S.L.

**Versión Protocolo Evaluada:** V1.1

**Versión Hoja Información al Paciente Evaluada:** V1.2 / 30/11/2009

1º. Considera que

- Se respetan los principios éticos básicos y es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado

2º. Por lo que este CEIC emite un **DICTAMEN FAVORABLE** y acepta que este estudio sea realizado en el Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca por el **Dr. Juan Luis Delgado** como investigador principal.

Lo que firmo en Murcia, a 21 de diciembre de 2009

Fdo:



**ANEXO II**

Modelo de consentimiento informado del estudio bioquímico de preeclampsia.

**CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO**

Título del estudio: " Determinación de la tirosin-kinasa 1 soluble fms-like (sFlt-1) y del factor de crecimiento placentario (PlGF) como posibles marcadores en la predicción de preeclampsia precoz"<sup>5</sup>

Yo, \_\_\_\_\_ (nombre y apellidos),  
He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con: \_\_\_\_\_ (nombre del Investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1º Cuando quiera

2º Sin tener que dar explicaciones.

3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Fecha: \_\_\_\_\_  
*Día, mes y año*

Firma del Participante \_\_\_\_\_



**ANEXO III**

Modelo de consentimiento informado del estudio genético de preeclampsia.

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO GENÉTICO**

Murcia, a .... de ..... de .....

D.....

De ..... años de edad, con domicilio en .....

..... y DNI .....

**DECLARO:**

Haber recibido completa información sobre los propósitos del estudio titulado **“Determinación de la Tirosin-Kinasa 1soluble FMS-LIKE (SFLT-1) y del factor del crecimiento placentario (PLGF) como posibles marcadores para el diagnóstico precoz y pronóstico de la preeclampsia”** y he comprendido que:

Estoy de acuerdo de que se utilice mi ADN obtenido a partir de la muestra de sangre que se extraerá para este estudio genético, así como su posterior almacenamiento con el propósito de desarrollar nuevas investigaciones médicas por parte de este equipo investigador.

Doy mi permiso para que los datos de mi historia clínica sean utilizados por el equipo investigador para cotejarlos con mi muestra de sangre, siempre y cuando el equipo investigador del proyecto se comprometa a guardar confidencialidad acerca de la información facilitada.

Asumo que es posible que de dicho estudio no se derive ningún resultado concluyente acerca de la predisposición genética al desarrollo de preeclampsia.

Entiendo que el hecho de no encontrarse alteraciones en el gen/es estudiados **NO** excluye que yo pueda desarrollar preeclampsia o pueda ser portador de una variación genética que predisponga a su desarrollo.

Paciente  
o representante legal

Facultativo



## ***VIII. REFERENCIAS***



1. Report of the National High Blood Pressure Education Program. Working group report on high blood pressure in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183.
2. Witlin AG, Sibai BM: Hypertension. *Clin Obstet Gynecol* 1998;41:533-544.
3. Sibai B, Dekker G, Kupfermanc M: Pre-eclampsia. *LANCET* 2005;365:785-799.
4. Sibai BM, Caritis S, Hauth J: What we have learned about preeclampsia. *Semin Perinatol* 2003;27:239-246.
5. Khan KS, Wojdyla D, Say L, Gulmezoglu AM, Van Look PF: WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *LANCET* 2006;367:1066-1074.
6. Comino R: Hypertensive states of pregnancy in Spain. *Clin Exper Hypert* 1986;B5:217-230.
7. Comino R, Barahona M, Bartha J: Hipertensión y Embarazo. Cádiz: Servicio de Publicaciones Universidad de Cádiz, 1995-2000;183:S1-S23.
8. Saftlas AF, Olson DR, Franks AL, Atrash HK, Pokras R: Epidemiology of preeclampsia and eclampsia in the United States, 1979-1986. *Am J Obstet Gynecol* 1990;163:460-465.
9. Hnat MD, Sibai BM, Caritis S, Hauth J, Lindheimer MD, MacPherson C, VanDorsten JP, Landon M, Miodovnik M, Paul R, Meis P, Thurnau G, Dombrowski M: Perinatal outcome in women with recurrent preeclampsia compared with women who develop preeclampsia as nulliparas. *Am J Obstet Gynecol* 2002;186:422-426.
10. Caughey AB, Stotland NE, Washington AE, Escobar GJ: Maternal ethnicity, paternal ethnicity, and parental ethnic discordance: predictors of preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2005;106:156-161.
11. Cnattingius S, Mills JL, Yuen J, Eriksson O, Salonen H: The paradoxical effect of smoking in preeclamptic pregnancies: smoking reduces the incidence but increases the rates of perinatal mortality, abruptio placentae, and intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:156-161.
12. Duckitt K, Harrington D: Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ* 2005;330:565.
13. Skupski DW, Nelson S, Kowalik A, Polaneczky M, Smith-Levitin M, Hutson JM, Rosenwaks Z: Multiple gestations from in vitro fertilization: successful implantation alone is not associated with subsequent preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1996;175:1029-1032

14. Sibai BM: Chronic hypertension in pregnancy. *Obstet Gynecol* 2002;100:369-377.
15. Sibai BM: Risk factors, pregnancy complications, and prevention of hypertensive disorders in women with pregravid diabetes mellitus. *J Matern Fetal Med* 2000;9:62-65.
16. Levidiotis V, Chang S, McDonald S: Pregnancy and maternal outcomes among kidney transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:2433-2440.
17. Mirza FG, Cleary KL: Pre-eclampsia and the kidney. *Semin Perinatol* 2009;33:173-178.
18. Dekker GA, de Vries JI, Doelitzsch PM, Huijgens PC, von Blomberg BM, Jakobs C, van Geijn HP: Underlying disorders associated with severe early-onset preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173:1042-1048.
19. Sibai BM, Gordon T, Thom E, Caritis SN, Klebanoff M, McNellis D, Paul RH: Risk factors for preeclampsia in healthy nulliparous women: a prospective multicenter study. The National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:642-648.
20. Catov JM, Ness RB, Kip KE, Olsen J: Risk of early or severe pre-eclampsia related to pre-existing conditions. *Int J Epidemiol* 2007;36:412-419.
21. Ray JG, Diamond P, Singh G, Bell CM: Brief overview of maternal triglycerides as a risk factor for pre-eclampsia. *BJOG* 2006;113:379-386.
22. Thomopoulos C, Tsioufis C, Michalopoulou H, Makris T, Papademetriou V, Stefanadis C: Assisted reproductive technology and pregnancy-related hypertensive complications: a systematic review. *J Hum Hypertens*. 2012; doi: 10.1038/jhh.2012.13.
23. Salha O, Sharma V, Dada T, Nugent D, Rutherford AJ, Tomlinson AJ, Philips S, Allgar V, Walker JJ: The influence of donated gametes on the incidence of hypertensive disorders of pregnancy. *Hum Reprod* 1999;14:2268-2273.
24. Dempsey JC, Sorensen TK, Qiu CF, Luthy DA, Williams MA: History of abortion and subsequent risk of preeclampsia. *J Reprod Med* 2003;48:509-514.
25. Williams PJ, Pipkin FB: The genetics of pre-eclampsia and other hypertensive disorders of pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2011;25:405-417.
26. Sibai BM: Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2003;102:181-192.

27. Al RA, Baykal C, Karacay O, Geyik PO, Altun S, Dolen I: Random urine protein-creatinine ratio to predict proteinuria in new-onset mild hypertension in late pregnancy. *Obstet Gynecol* 2004;104:367-371.
28. Durnwald C, Mercer B: A prospective comparison of total protein/creatinine ratio versus 24-hour urine protein in women with suspected preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:848-852.
29. Waugh JJ, Clark TJ, Divakaran TG, Khan KS, Kilby MD: Accuracy of urinalysis dipstick techniques in predicting significant proteinuria in pregnancy. *Obstet Gynecol* 2004;103:769-777.
30. Pridjian G, Puschett JB: Preeclampsia. Part 1: clinical and pathophysiologic considerations. *Obstet Gynecol Surv* 2002;57:598-618.
31. MacKay AP, Berg CJ, Atrash HK: Pregnancy-related mortality from preeclampsia and eclampsia. *Obstet Gynecol* 2001;97:533-538.
32. Ong S, Lash G, Baker PN: Angiogenesis and placental growth in normal and compromised pregnancies. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000;14:969-980.
33. Levine RJ, Karumanchi SA: Circulating angiogenic factors in preeclampsia. *Clin Obstet Gynecol* 2005;48:372-386.
34. Bell E: A bad combination. *Nature Reviews Immunology* 2004; doi:10.1038/nri1514.
35. Matijevic R, Meekins JW, Walkinshaw SA, Neilson JP, McFadyen IR: Spiral artery blood flow in the central and peripheral areas of the placental bed in the second trimester. *Obstet Gynecol* 1995;86:289-292.
36. Pijnenborg R: The origin and future of placental bed research. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1998;81:185-190.
37. Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao YP, Skepper JN, Burton GJ: Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol* 2000;157:2111-2122.
38. Khong TY, De WF, Robertson WB, Brosens I: Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. *Br J Obstet Gynaecol* 1986;93:1049-1059.
39. Lachmeijer AM, Dekker GA, Pals G, Aarnoudse JG, ten Kate LP, Arngrimsson R: Searching for preeclampsia genes: the current position. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002;105:94-113.

40. Saito S, Umekage H, Sakamoto Y, Sakai M, Tanebe K, Sasaki Y, Morikawa H: Increased T-helper-1-type immunity and decreased T-helper-2-type immunity in patients with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 1999;41:297-306.
41. Pennington KA, Schlitt JM, Jackson DL, Schulz LC, Schust DJ: Preeclampsia: multiple approaches for a multifactorial disease. *Dis Model Mech* 2012;5:9-18.
42. Lam C, Lim KH, Karumanchi SA: Circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia. *Hypertension* 2005;46:1077-1085.
43. Davison JM, Homuth V, Jeyabalan A, Conrad KP, Karumanchi SA, Quaggin S, Dechend R, Luft FC: New Aspects in the Pathophysiology of Preeclampsia. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:2440-2448.
44. Chesley LC, Cooper DW: Genetics of hypertension in pregnancy: possible single gene control of pre-eclampsia and eclampsia in the descendants of eclamptic women. *Br J Obstet Gynaecol* 1986;93:898-908.
45. Walker JJ: Pre-eclampsia. *LANCET* 2000;356:1260-1265.
46. Noris M, Perico N, Remuzzi G: Mechanisms of disease: Pre-eclampsia. *Nat Clin Pract Nephrol* 2005;1:98-114.
47. Levine RJ, Hauth JC, Curet LB, Sibai BM, Catalano PM, Morris CD, DerSimonian R, Esterlitz JR, Raymond EG, Bild DE, Clemens JD, Cutler JA: Trial of calcium to prevent preeclampsia. *N Engl J Med* 1997;337:69-76.
48. Coomarasamy A, Papaioannou S, Gee H, Khan KS: Aspirin for the prevention of preeclampsia in women with abnormal uterine artery Doppler: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 2001;98:861-866.
49. Caritis S, Sibai B, Hauth J, Lindheimer MD, Klebanoff M, Thom E, Vandersten P, Landon M, Paul R, Miodovnik M, Meis P, Thurnau G: Low-dose aspirin to prevent preeclampsia in women at high risk. National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. *N Engl J Med* 1998;338:701-705.
50. Protocolo 2: asistencia prenatal al embarazo normal. SEGO (Sociedad Española de Ginecología y obstetricia) 2002 Disponible en: [www.sego.es](http://www.sego.es) 2002.
51. Papageorgiou AT, Yu CK, Nicolaidis KH: The role of uterine artery Doppler in predicting adverse pregnancy outcome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004;18:383-396.
52. Campbell S: First-trimester screening for pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2005;26:487-489.



53. Aardema MW, Oosterhof H, Timmer A, van R, I, Aarnoudse JG: Uterine artery Doppler flow and uteroplacental vascular pathology in normal pregnancies and pregnancies complicated by pre-eclampsia and small for gestational age fetuses. *Placenta* 2001;22:405-411.
54. Hernández Guillama, González García L, García Guevara C, Romero Leal N: Ecocardiografía Doppler en las patologías obstétricas. *Revista de Ciencias Médicas La Habana* 2009;15.
55. Burton GJ, Woods AW, Jauniaux E, Kingdom JC: Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy. *Placenta* 2009;30:473-482.
56. Conde-Agudelo A, Villar J, Lindheimer M: World Health Organization systematic review of screening tests for preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2004;104:1367-1391.
57. Conde-Agudelo A, Lindheimer M: Use of Doppler ultrasonography to predict pre-eclampsia. *CMAJ* 2008;179:53-54.
58. Martin AM, Bindra R, Curcio P, Cicero S, Nicolaidis KH: Screening for pre-eclampsia and fetal growth restriction by uterine artery Doppler at 11-14 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2001;18:583-586.
59. Luttun A, Carmeliet P: Soluble VEGF receptor Flt1: the elusive preeclampsia factor discovered? *J Clin Invest* 2003;111:600-602.
60. Buhimschi CS, Norwitz ER, Funai E, Richman S, Guller S, Lockwood CJ, Buhimschi IA: Urinary angiogenic factors cluster hypertensive disorders and identify women with severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2005;192:734-741.
61. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA: Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 2003;111:649-658.
62. Thadhani R, Mutter WP, Wolf M, Levine RJ, Taylor RN, Sukhatme VP, Ecker J, Karumanchi SA: First trimester placental growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase 1 and risk for preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:770-775.
63. Overgaard MT, Sorensen ES, Stachowiak D, Boldt HB, Kristensen L, Sottrup-Jensen L, Oxvig C: Complex of pregnancy-associated plasma protein-A and the

- proform of eosinophil major basic protein. Disulfide structure and carbohydrate attachment. *J Biol Chem* 2003;278:2106-2117.
64. Yaron Y, Heifetz S, Ochshorn Y, Lehavi O, Orr-Urtreger A: Decreased first trimester PAPP-A is a predictor of adverse pregnancy outcome. *Prenat Diagn* 2002;22:778-782.
  65. Smith GC, Stenhouse EJ, Crossley JA, Aitken DA, Cameron AD, Connor JM: Early pregnancy levels of pregnancy-associated plasma protein a and the risk of intrauterine growth restriction, premature birth, preeclampsia, and stillbirth. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1762-1767.
  66. Lim KH, Friedman SA, Ecker JL, Kao L, Kilpatrick SJ: The clinical utility of serum uric acid measurements in hypertensive diseases of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178:1067-1071.
  67. Redman CW, Beilin LJ, Bonnar J, Wilkinson RH: Plasma-urate measurements in predicting fetal death in hypertensive pregnancy. *LANCET* 1976;1:1370-1373.
  68. Powers RW, Bodnar LM, Ness RB, Cooper KM, Gallaher MJ, Frank MP, Daftary AR, Roberts JM: Uric acid concentrations in early pregnancy among preeclamptic women with gestational hyperuricemia at delivery. *Am J Obstet Gynecol* 2006;194:160.
  69. Nieuwdorp M, Stoes ES, Meijers JC, Buller H: Hypercoagulability in the metabolic syndrome. *Curr Opin Pharmacol* 2005;5:155-159.
  70. Fornoni A, Raij L: Metabolic syndrome and endothelial dysfunction. *Curr Hypertens Rep* 2005;7:88-95.
  71. Ray JG, Diamond P, Singh G, Bell CM: Brief overview of maternal triglycerides as a risk factor for pre-eclampsia. *BJOG* 2006;113:379-386.
  72. Demirci O, Tuğrul AS, Dolgun N, Sözen H, Eren S: Serum lipids level assessed in early pregnancy and risk of pre-eclampsia. *J Obstet Gynaecol Res* 2012;37:1427.
  73. Gadducci A, Cosio S, Carpi A, Nicolini A, Genazzani AR: Serum tumor markers in the management of ovarian, endometrial and cervical cancer. *Biomed Pharmacother* 2004;58:24-38.
  74. Ozat M, Kanat-Pektas M, Yenicesu O, Gungor T, Danisman N, Mollamahmutoglu L: Serum concentrations of CA-125 in normal and preeclamptic pregnancies. *Arch Gynecol Obstet* 2011;284:607-612.

75. Acikgoz S, Harma M, Harma M, Mungan G, Can M, Demirtas S: Comparison of angiotensin-converting enzyme, malonaldehyde, zinc, and copper levels in preeclampsia. *Biol Trace Elem Res* 2006;113:1-8.
76. Coates D: The angiotensin converting enzyme (ACE). *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:769-773.
77. Ruiz J, Blanche H, Cohen N, Velho G, Cambien F, Cohen D, Passa P, Froguel P: Insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene is strongly associated with coronary heart disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3662-3665.
78. Montgomery HE, Clarkson P, Dollery CM, Prasad K, Losi MA, Hemingway H, Statters D, Jubb M, Girvain M, Varnava A, World M, Deanfield J, Talmud P, McEwan JR, McKenna WJ, Humphries S: Association of angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism with change in left ventricular mass in response to physical training. *Circulation* 1997;96:741-747.
79. Bereketoglu C, Kasap M, Pazarbasi A: Studies on Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and genotype distributions in Turkish preeclampsia patients. *J Pregnancy* 2012;2012:108206.
80. Li H, Ma Y, Fu Q, Wang L: Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion (ACE I/D) and angiotensin II type 1 receptor (AT1R) gene polymorphism and its association with preeclampsia in Chinese women. *Hypertens Pregnancy* 2007;26:293-301.
81. Tiret L, de KP, Menzel HJ, Ehnholm C, Nicaud V, Havekes LM: ApoE polymorphism and predisposition to coronary heart disease in youths of different European populations. The EARS Study. *European Atherosclerosis Research Study. Arterioscler Thromb* 1994;14:1617-1624.
82. Wilson PW, Schaefer EJ, Larson MG, Ordovas JM: Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease. A meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:1250-1255.
83. Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, Bdolah Y, Lim KH, Yuan HT, Libermann TA, Stillman IE, Roberts D, D'Amore PA, Epstein FH, Sellke FW, Romero R, Sukhatme VP, Letarte M, Karumanchi SA: Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med* 2006;12:642-649.
84. Carty DM, Delles C, Dominiczak AF: Novel biomarkers for predicting preeclampsia. *Trends Cardiovasc Med* 2008;18:186-194.

85. Roes EM, Gaytant MA, Thomas CM, Rajmakers MT, Zusterzeel PL, Peters WH, Steegers EA: First trimester inhibin-A concentrations and later development of preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004;83:117.
86. Nicolaides KH, Bindra R, Turan OM, Chefetz I, Sammar M, Meiri H, Tal J, Cuckle HS: A novel approach to first-trimester screening for early pre-eclampsia combining serum PP-13 and Doppler ultrasound. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2006;27:13-17.
87. Burger O, Pick E, Zwickel J, Klayman M, Meiri H, Slotky R, Mandel S, Rabinovitch L, Paltieli Y, Admon A, Gonen R: Placental protein 13 (PP-13): effects on cultured trophoblasts, and its detection in human body fluids in normal and pathological pregnancies. *Placenta* 2004;25:608-622.
88. Chafetz I, Kuhnreich I, Sammar M, Tal Y, Gibor Y, Meiri H, Cuckle H, Wolf M: First-trimester placental protein 13 screening for preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 2007;197:35-37.
89. Brown MA, Hague WM, Higgins J, Lowe S, McCowan L, Oats J, Peek MJ, Rowan JA, Walters BN: The detection, investigation and management of hypertension in pregnancy: executive summary. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2000;40:133-138.
90. ACOG Committee on Practice Bulletins: Diagnosis and Management of Preeclampsia and Eclampsia. *Obstet Gynecol* 2002;99:159-167.
91. Brown MA, Lindheimer MD, de SM, Van AA, Moutquin JM: The classification and diagnosis of the hypertensive disorders of pregnancy: statement from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP). *Hypertens Pregnancy* 2001;20:IX-XIV.
92. von DP, Magee LA, Roberts JM: Subclassification of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2003;22:143-148.
93. Sibai BM: Diagnosis, controversies, and management of HELLP syndrome. *Obstet Gynecol* 2004;103:981-991.
94. The investigation and management of the Small-for-gestational-age fetus Clinical guidelines ner 31. RCOG 2002.
95. Simhan HN, Caritis SN: Prevention of preterm delivery. *N Engl J Med* 2007;357:477-487.
96. Held P: An Introduction to Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Technology and its Application in Bioscience. Laboratory Manager, Applications Department, BioTek Instruments, Inc , Winooski, VT 2005.

97. Poon LC, Kametas NA, Chelemen T, Leal A, Nicolaides KH: Maternal risk factors for hypertensive disorders in pregnancy: a multivariate approach. *J Hum Hypertens* 2010;24:104-110.
98. Milne F, Redman C, Walker J, Baker P, Bradley J, Cooper C, de SM, Fletcher G, Jokinen M, Murphy D, Nelson-Piercy C, Osgood V, Robson S, Shennan A, Tuffnell A, Twaddle S, Waugh J: The pre-eclampsia community guideline (PRECOG): how to screen for and detect onset of pre-eclampsia in the community. *BMJ* 2005;330:576-580.
99. Poon LC, Akolekar R, Lachmann R, Beta J, Nicolaides KH: Hypertensive disorders in pregnancy: screening by biophysical and biochemical markers at 11-13 weeks. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2010;35:662-670.
100. Enquobahrie DA, Williams MA, Butler CL, Frederick IO, Miller RS, Luthy DA: Maternal plasma lipid concentrations in early pregnancy and risk of preeclampsia. *Am J Hypertens* 2004;17:574-581.
101. Montanari L, Alfei A, Albonico G, Moratti R, Arossa A, Beneventi F, Spinillo A: The impact of first-trimester serum free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein A on the diagnosis of fetal growth restriction and small for gestational age infant. *Fetal Diagn Ther* 2009;25:130-135.
102. Ranta JK, Raatikainen K, Romppanen J, Pulkki K, Heinonen S: Decreased PAPP-A is associated with preeclampsia, premature delivery and small for gestational age infants but not with placental abruption. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011;157:48-52.
103. Saruhan Z, Ozekinci M, Simsek M, Mendilcioglu I: Association of first trimester low PAPP-A levels with adverse pregnancy outcomes. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2012;39:225-228.
104. Mikat B, Zeller A, Scherag A, Drommelschmidt K, Kimmig R, Schmidt M: betahCG and PAPP-A in First Trimester: Predictive Factors for Preeclampsia? *Hypertens Pregnancy* 2012;31:261-267.
105. Akolekar R, Syngelaki A, Poon L, Wright D, Nicolaides KH: Competing Risks Model in Early Screening for Preeclampsia by Biophysical and Biochemical Markers. *Fetal Diagn Ther* 2012.
106. Akolekar R, de CJ, Foidart JM, Munaut C, Nicolaides KH: Maternal plasma soluble fms-like tyrosine kinase-1 and free vascular endothelial growth factor at 11 to 13 weeks of gestation in preeclampsia. *Prenat Diagn* 2010;30:191-197.

107. Lynch AM, Murphy JR, Gibbs RS, Levine RJ, Giclas PC, Salmon JE, Holers VM: The interrelationship of complement-activation fragments and angiogenesis-related factors in early pregnancy and their association with preeclampsia. *BJOG* 2010;117:456-462.
108. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA: Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 2004;350:672-683.
109. Steinberg G, Khankin EV, Karumanchi SA: Angiogenic factors and preeclampsia. *Thromb Res* 2009;123 Suppl 2:S93-S99.
110. Laughon SK, Catov J, Powers RW, Roberts JM, Gandle RE: First trimester uric acid and adverse pregnancy outcomes. *Am J Hypertens* 2011;24:489-495.
111. Bon GG, Kenemans P, Verstraeten AA, Go S, Philipi PA, van Kamp GJ, van Geijn HP, van Vugt JM: Maternal serum Ca125 and Ca15-3 antigen levels in normal and pathological pregnancy. *Fetal Diagn Ther* 2001;16:166-172.
112. Yu L, Ma YP, Ding YL: [Expression and activity change of angiotensin converting enzyme in the placenta of preeclampsia]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2007;32:498-502.
113. Dekker G, Sibai B: Primary, secondary, and tertiary prevention of preeclampsia. *Lancet* 2001;357:209-215.
114. Zhou CC, Ahmad S, Mi T, Abbasi S, Xia L, Day MC, Ramin SM, Ahmed A, Kellems RE, Xia Y: Autoantibody from women with preeclampsia induces soluble Fms-like tyrosine kinase-1 production via angiotensin type 1 receptor and calcineurin/nuclear factor of activated T-cells signaling. *Hypertension* 2008;51:1010-1019.
115. Rajasingam D, Seed PT, Briley AL, Shennan AH, Poston L: A prospective study of pregnancy outcome and biomarkers of oxidative stress in nulliparous obese women. *Am J Obstet Gynecol* 2009;200:395-399.
116. Zhai D, Guo Y, Smith G, Krewski D, Walker M, Wen SW: Maternal exposure to moderate ambient carbon monoxide is associated with decreased risk of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2012;207:57-59.
117. Kreiser D, Baum M, Seidman DS, Fanaroff A, Shah D, Hendler I, Stevenson DK, Schiff E, Druzin ML: End tidal carbon monoxide levels are lower in women with gestational hypertension and pre-eclampsia. *J Perinatol* 2004;24:213-217.

118. McElrath TF, Lim KH, Pare E, Rich-Edwards J, Pucci D, Troisi R, Parry S: Longitudinal evaluation of predictive value for preeclampsia of circulating angiogenic factors through pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2012;207:407.
119. Vandenberghe G, Mensink I, Twisk JW, Blankenstein MA, Heijboer AC, van Vugt JM: First trimester screening for intra-uterine growth restriction and early-onset pre-eclampsia. *Prenat Diagn* 2011;31:955-961.
120. Baker AM, Klein RL, Moss KL, Haeri S, Boggess K: Maternal serum dyslipidemia occurs early in pregnancy in women with mild but not severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2009;201:293-294.
121. Clausen T, Djurovic S, Henriksen T: Dyslipidemia in early second trimester is mainly a feature of women with early onset pre-eclampsia. *BJOG* 2001;108:1081-1087.
122. Ghosh SK, Raheja S, Tuli A, Raghunandan C, Agarwal S: Is serum placental growth factor more effective as a biomarker in predicting early onset preeclampsia in early second trimester than in first trimester of pregnancy? *Arch Gynecol Obstet* 2012.
123. Rohra DK, Zeb A, Qureishi RN, Azam SI, Khan NB, Zuberi HS, Sikandar R: Prediction of pre-eclampsia during early pregnancy in primiparas with soluble fms-like tyrosine kinase-1 and placental growth factor. *Natl Med J India* 2012;25:68-73.
124. Lambert-Messerlian GM, Palomaki GE, Neveux LM, Chien E, Friedman A, Rosene-Montella K, Hayes M, Canick JA: Early onset preeclampsia and second trimester serum markers. *Prenat Diagn* 2009;29:1109-1117.
125. Schmidt M, Dogan C, Birdir C, Kuhn U, Gellhaus A, Kimmig R, Kasimir-Bauer S: Placental growth factor: a predictive marker for preeclampsia? *Gynakol Geburtshilfliche Rundsch* 2009;49:94-99.
126. Kim SY, Ryu HM, Yang JH, Kim MY, Han JY, Kim JO, Chung JH, Park SY, Lee MH, Kim DJ: Increased sFlt-1 to PlGF ratio in women who subsequently develop preeclampsia. *J Korean Med Sci* 2007;22:873-877.
127. Zhou J, Zhao X, Wang Z, Hu Y: Combination of lipids and uric acid in mid-second trimester can be used to predict adverse pregnancy outcomes. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012;25:2633-2638.
128. Wolak T, Sergienko R, Wiznitzer A, Paran E, Sheiner E: High uric acid level during the first 20 weeks of pregnancy is associated with higher risk for gestational diabetes mellitus and mild preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2012;31:307-315.

129. Cebesoy FB, Balat O, Dikensoy E, Kalayci H, Ibar Y: CA-125 and CRP are elevated in preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2009;28:201-211.
130. Velloso EP, Vieira R, Cabral AC, Kalapothakis E, Santos RA: Reduced plasma levels of angiotensin-(1-7) and renin activity in preeclamptic patients are associated with the angiotensin I- converting enzyme deletion/deletion genotype. *Braz J Med Biol Res* 2007;40:583-590.
131. Matias DS, Costa RF, Matias B, Gordiano L, Correia LC: Ophthalmic artery Doppler velocimetric values in pregnant women at risk for preeclampsia. *J Ultrasound Med* 2012;31:1659-1664.
132. Napolitano R, Melchiorre K, Arcangeli T, Dias T, Bhide A, Thilaganathan B: Screening for pre-eclampsia by using changes in uterine artery Doppler indices with advancing gestation. *Prenat Diagn* 2012;32:180-184.
133. Calhoun KC, Barnhart KT, Elovitz MA, Srinivas SK: Evaluating the Association between Assisted Conception and the Severity of Preeclampsia. *ISRN Obstet Gynecol* 2011;2011:928592.
134. Rahimi Z, Rahimi Z, Mozafari H, Parsian A: Preeclampsia and angiotensin converting enzyme (ACE) I/D and angiotensin II type-1 receptor (AT1R) A1166C polymorphisms: association with ACE I/D polymorphism. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2012.
135. Ahmadi R, Rahimi Z, Vaisi-Raygani A, Kiani A, Jalilian N, Rahimi Z: Apolipoprotein E genotypes, lipid peroxidation, and antioxidant status among mild and severe preeclamptic women from western Iran: protective role of apolipoprotein epsilon2 allele in severe preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2012;31:405-418.
136. Nagy B, Rigó J Jr, Fintor L, Karádi I, Tóth T: Apolipoprotein E alleles in women with severe pre-eclampsia. *J Clin Pathol* 1998;51:324-325.
137. Belo L, Gaffney D, Caslake M, Santos-Silva A, Pereira-Leite L, Quintanilha A, Rebelo I: Apolipoprotein E and cholesteryl ester transfer protein polymorphisms in normal and preeclamptic pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;112:9-15.
138. Francoual J, Audibert F, Trioche P, Chalas J, Capel L, Lindenbaum A, Labrune P, Frydman R: Is a polymorphism of the apolipoprotein E gene associated with preeclampsia? *Hypertens Pregnancy* 2002;21:127-133.
139. Stiefel P, Miranda ML, Bellido LM, Luna J, Jimenez L, Pamies E, de Frutos PG, Villar J: Genotype of the CYBA promoter -930A/G, polymorphism C677T of



- the MTHFR and APOE genotype in patients with hypertensive disorders of pregnancy: an observational study. *Med Clin (Barc)* 2009;133:657-661.
140. Sanchez O, Llurba E, Marsal G, Dominguez C, Aulesa C, Sanchez-Duran MA, Goya MM, Ijotas-Reig J, Carreras E, Cabero L: First trimester serum angiogenic/anti-angiogenic status in twin pregnancies: relationship with assisted reproduction technology. *Hum Reprod* 2012;27:358-365.
141. Boucoiran I, Thissier-Levy S, Wu Y, Wei SQ, Luo ZC, Delvin E, Fraser WD, Audibert F: Risks for Preeclampsia and Small for Gestational Age: Predictive Values of Placental Growth Factor, Soluble fms-like Tyrosine Kinase-1, and Inhibin A in Singleton and Multiple-Gestation Pregnancies. *Am J Perinatol* 2012.
142. Scazzocchio E, Figueras F, Crispi F, Meler E, Masoller N, Mula R, Gratacos E: Performance of a first-trimester screening of preeclampsia in a routine care low-risk setting. *Am J Obstet Gynecol* 2012.

