

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 084**

51 Int. Cl.:
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01)
B01L 3/00 (2006.01)
G01N 33/74 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05857213 .2**
96 Fecha de presentación: **21.12.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1839056**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.10.2007**

54 Título: **DIAGNÓSTICO DE LA PREECLAMPSIA.**

30 Prioridad:
21.12.2004 US 637948 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.12.2011

73 Titular/es:
**YALE UNIVERSITY
OFFICE OF COOPERATIVE RESEARCH, 433
TEMPLE STREET
NEW HAVEN, CT 06511, US**

72 Inventor/es:
**BUHIMSCHI, Irina;
BUHIMSCHI, Catalin, S. y
NORWITZ, Errol**

74 Agente: **Lehmann Novo, Isabel**

ES 2 371 084 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Diagnóstico de la preeclampsia

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 La preeclampsia es un trastorno hipertensivo que complica hasta el 6-8% de embarazos, y sigue siendo la causa principal de morbimortalidad materna y perinatal (1, 2). No obstante, a pesar de los amplios esfuerzos de investigación, la etiología de este trastorno multisistémico todavía sigue estando incomprendida completamente. Parece que la activación endotelial vascular, seguida de vasoespasmos, es el rasgo central en la patogénesis de la preeclampsia. Las teorías de esta causa incluyen implantación y desarrollo anormal de la placenta, estrés oxidativo, homeostasia de prostanoïdes y óxido nítrico endotelial alterada, polimorfismos genéticos, autoanticuerpos circulantes anormales, y una respuesta inflamatoria sistemática materna anormal (3, 4, 5, 6, 7). Más recientemente, ha habido un foco creciente sobre los efectos de las variaciones en los niveles de expresión de moduladores de angiogénesis, que provocan síntomas de preeclampsia, incluyendo hipertensión, proteinuria, activación de células endoteliales y aumento de la agregación plaquetaria (8, 9, 10, 11, 12).

15 Específicamente, estudios recientes han dado a conocer que las concentraciones séricas maternas del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), del factor de crecimiento placentario (PIGF) y tirosina cinasa-1 similar a fms soluble (sFlt-1) están alteradas en pacientes con preeclampsia clínica (13, 14, 15). VEGF y PIGF son factores de crecimiento implicados en el desarrollo placentario, y ambos contribuyen a la actividad mitogénica y a la angiogénesis que es crucial para un feto en desarrollo. sFlt-1 es una variante de corte y empalme del receptor de Flt-1. Carece de los dominios citoplásmicos y transmembránicos de Flt-1, un receptor que se une tanto a VEGF como a PIGF, activando sus rutas de señalización. El aumento de sFlt-1 sérico precede al comienzo de preeclampsia clínicamente identificable en aproximadamente 5 semanas, y la reducción de PIGF libre es evidente tan pronto como el primer trimestre (13, 15, 16). Por el contrario, las concentraciones séricas de VEGF son bajas durante el embarazo en mujeres con preeclampsia clínica (15).

25 También parece que tales factores angiogénicos son significativos en la regulación de la fisiología vascular glomerular renal humana. sFlt-1 exógeno, administrado a roedores preñados, conduce a hipertensión, proteinuria y endoteliosis glomerular (17). De forma similar, la neutralización de VEGF, un factor de supervivencia mitogénico, clave para el endotelio vascular glomerular, conduce a apoptosis incrementada, reparación capilar glomerular alterada, y proteinuria importante (18). En preeclampsia grave, la endoteliosis glomerular, una característica habitual del trastorno, da soporte a la relación entre los factores angiogénicos alterados en pacientes con trastornos hipertensivos y la función renal general (19, 20, 21, 22, 23).

Actualmente, no hay un único ensayo para predecir o diagnosticar la preeclampsia, o para pronosticar la gravedad de la afección que se desarrollará en un paciente particular. Los síntomas tempranos incluyen cefaleas persistentes, visión borrosa, o sensibilidad a la luz y dolor abdominal. Sin embargo, un diagnóstico de la preeclampsia no se realiza típicamente hasta que se revela una tensión arterial elevada y proteína en la orina (proteinuria), típicamente en ensayos médicos rutinarios tras la 20ª semana de embarazo (1). Los efectos graves de la preeclampsia, incluyendo ataques, hemorragia cerebral, coagulación intravascular diseminada e insuficiencia renal, pueden aparecer muy poco después tras tal diagnóstico. Estos métodos son imprecisos y proporcionan poca comprensión sobre la probabilidad del desarrollo de síntomas más graves. Además, los diagnósticos actuales requieren la inadvertencia médica y metodologías invasivas, retrasando y complicando adicionalmente la evaluación temprana e inmediata. Se necesita un método temprano y exacto para la detección y diagnóstico de preeclampsia y trastornos hipertensivos proteinúricos asociados.

El documento WO 2004/008946 (Karumanchi et al.) enseña métodos para tratar preeclampsia y eclampsia usando compuestos que incrementan los niveles de VEGF o PIGF, o compuestos que disminuyen los niveles de sFlt-1.

45 El documento WO 98/28006 (Charnock-Jones et al) enseña un método para tratar un trastorno hipertensivo administrando una sustancia que regula la cantidad y/o actividad de VEGF.

El documento WO 2007/053161 (Karumanchi et al) enseña métodos para diagnosticar o tratar trastornos hipertensivos relacionados con el embarazo, que incluyen el uso de un polipéptido o un ácido nucleico que codifica un polipéptido seleccionado de una variedad de productos génicos segregados aumentados supuestamente en mujeres con preeclampsia.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para diagnosticar a una mujer embarazada que tiene, o que es susceptible de desarrollar, un trastorno hipertensivo, que comprende medir los niveles de tirosina cinasa 1 similar a fms soluble (sFlt-1) en una muestra de orina obtenida de la mujer embarazada, en el que un nivel de sFlt-1 mayor que 9,5 picogramos por miligramo de creatinina urinaria es un indicador diagnóstico de preeclampsia, y en el que un nivel de sFlt-1 mayor que 40 picogramos por miligramo de creatinina urinaria es un indicador diagnóstico de

preeclampsia grave.

Se teorizó que los desajustes funcionales y morfológicos del riñón materno asociados con preeclampsia indican que las alteraciones en los niveles de sFlt-1, VEGF y PIGF urinarios pueden agrupar trastornos hipertensivos, y pueden diferenciar a mujeres embarazadas con preeclampsia grave de controles embarazadas normotensas. Mientras varios artículos suficientemente publicados han dado a conocer que niveles aumentados de sFlt-1 circulante y PIGF y VEGF reducidos en suero pueden predecir el comienzo de preeclampsia, la excreción urinaria de estos factores antiangiogénicos no se ha estudiado previamente en profundidad, ni se ha analizado el efecto específico de tales niveles de secreción en el contexto de la gravedad de las enfermedades. La presente invención proporciona la monitorización y uso de niveles de sFlt-1, VEGF y PIGF en muestras de orina como un indicador diagnóstico de trastornos hipertensivos, incluyendo preeclampsia. Además, la invención proporciona un método no invasivo para diferenciar preeclampsia grave de otros trastornos hipertensivos. Los métodos y ensayos desarrollados son simples y baratos, y se pueden utilizar tan pronto como el primer trimestre de embarazo, incrementando así la probabilidad de una detección y tratamiento tempranos. Además, esta invención se describe con referencia a mujeres embarazadas, los métodos descritos aquí también se pueden utilizar para evaluar el riesgo de mujeres no embarazadas a desarrollar trastornos hipertensivos durante el embarazo.

En una realización, la invención proporciona un método para diagnosticar o ayudar a diagnosticar si una mujer embarazada tiene, o tiene propensión a desarrollar, un trastorno hipertensivo midiendo la concentración de sFlt-1 en una muestra de orina obtenida del sujeto de ensayo, y comparando la concentración con un patrón apropiado. El patrón puede ser, por ejemplo, la concentración de sFlt-1 en orina obtenida de mujeres embarazadas cuyos embarazos son normales, o de mujeres embarazadas que tienen un trastorno hipertensivo confirmado, incluyendo preeclampsia. Tales sujetos se denominan como sujetos de referencia. Las muestras de referencia se obtienen de sujetos de referencia quienes, cuando se obtiene la muestra, están en la semana de embarazo correspondiente a aquella semana de embarazo en la que está el sujeto de ensayo cuando se obtiene la muestra de ensayo. Las muestras de referencia se pueden obtener y analizar en el mismo momento en que las muestras de orina se obtienen de los sujetos de ensayo. Como alternativa, se puede utilizar un patrón establecido (un patrón previamente establecido, o uno desarrollado tras la evaluación de la muestra de orina obtenida de un sujeto de ensayo). Una concentración incrementada de sFlt-1 en la orina de una mujer embarazada que se evalúa (un sujeto de ensayo), en comparación con la concentración de sFlt-1 en orina procedente de una mujer embarazada normal, indica que la mujer tiene mayor riesgo de desarrollar preeclampsia u otro trastorno o trastornos hipertensivos. Un incremento en la concentración de sFlt-1 por encima de 9,5 picogramos por miligramo de creatinina urinaria indica que la mujer embarazada tiene un mayor riesgo de desarrollar preeclampsia leve, mientras que un incremento en la concentración de sFlt-1 por encima de 40 picogramos por miligramo de creatinina urinaria indica que la mujer embarazada tiene un mayor riesgo de desarrollar preeclampsia grave.

Un método para evaluar o ayudar a evaluar la probabilidad de que una mujer embarazada desarrolle un trastorno hipertensivo puede comprender medir la concentración de PIGF y sFlt-1 en una muestra de orina obtenida de la mujer embarazada, y someter los valores obtenidos a análisis posterior. Se usa una fórmula para analizar los valores y calcular lo que se denomina como el uFP de la mujer, que es igual al $\log [sFlt-1/PIGF \times 100]$. El resultado de este análisis indica si la mujer embarazada que se evalúa tiene riesgo de desarrollar trastorno hipertensivo. Por ejemplo, un uFP en exceso de 1,4 es un indicador pronóstico de un mayor riesgo de que una mujer embarazada requerirá tratamiento para prevenir el desarrollo de o el empeoramiento de síntomas asociados con trastornos hipertensivos. Como ejemplo adicional, un uFP en exceso de 2,1 tiene una sensibilidad de 88,2% y una especificidad de 100% diferenciando mujeres embarazadas con preeclampsia grave de controles normotensos. Este método proporciona un diagnóstico significativamente más exacto de preeclampsia grave en mujeres embarazadas que los métodos actualmente disponibles, que evalúan la proteinuria a través de una prueba de orina con tira reactiva y medida de la concentración de proteína total. El valor de uFP se utiliza como un indicador diagnóstico del riesgo de desarrollar complicaciones específicas de preeclampsia, incluyendo parto por cesárea, ácido úrico sérico incrementado, tensiones arteriales sistólica y diastólica incrementadas, proteinuria de tira reactiva, embarazo, peso fetal en el parto, desprendimiento placentario, restricción del crecimiento intrauterino (IUGR), hemólisis, trombocitopenia, enzimas hepáticas elevadas y síndrome de HELLP (hemólisis, enzimas hepáticas elevadas, recuento plaquetario bajo).

En los métodos anteriores, las muestras de orina se pueden obtener en condiciones de ayuno o sin ayuno. Los factores angiogénicos se pueden medir usando un ensayo inmunológico, tal como un ELISA. En aspectos de los métodos descritos aquí, en la mujer embarazada se puede diagnosticar por tener o que tiene un mayor riesgo de desarrollar cualquiera de los siguientes trastornos hipertensivos: preeclampsia, eclampsia, preeclampsia leve, hipertensión crónica, gestosis por EPH, hipertensión gestacional, preeclampsia sobreimpuesta (incluyendo preeclampsia sobreimpuesta en hipertensión crónica, nefropatía crónica o lupus), síndrome de HELLP (hemólisis, enzimas hepáticas elevadas, recuento plaquetario bajo) o nefropatía. Aunque esta invención se describe con referencia a mujeres embarazadas (seres humanos), también se puede usar para diagnosticar y/o evaluar el riesgo de desarrollar trastornos hipertensivos en hembras no humanas.

Un kit de diagnóstico para uso para determinar si una mujer embarazada tiene riesgo de desarrollar un trastorno hipertensivo, tal como preeclampsia, puede incluir un receptáculo para recibir una muestra de orina, un medio (por

ejemplo, reactivos) mediante el cual se pueden detectar factores angiogénicos en la muestra, e instrucciones para evaluar el riesgo de desarrollar trastornos hipertensivos basándose en los valores obtenidos. El kit incluye reactivos, tales como anticuerpos, útiles para detectar factores angiogénicos, tales como PIGF y sFlt-1, útiles para determinar si una mujer embarazada tiene riesgo de desarrollar preeclampsia, e instrucciones, que pueden incluir una referencia o patrón, para evaluar el riesgo de que una mujer desarrollará preeclampsia. El kit incluye al menos un anticuerpo que detecta PIGF, y al menos un anticuerpo que detecta sFlt-1.

Excepto que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado que el entendido habitualmente por una persona de pericia normal en la técnica, a la que pertenece esta invención. Aunque en la práctica o en el ensayo de la presente invención se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos aquí, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes y otras referencias mencionadas aquí se incorporan como referencia. Los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos, y no pretenden ser limitantes.

Otras características de la invención serán manifiestas a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

El archivo de la patente contiene al menos un dibujo realizado a color. Las copias de esta patente con el dibujo o dibujos a color se proporcionarán por la Oficina de Patentes y Marcas mediante solicitud y pago de la tasa necesaria.

La Figura 1 muestra las características maternas, características fetales y manifestaciones clínicas de las mujeres embarazadas con trastornos hipertensivos y los controles en la fecha de la entrada a participar en los estudios. El dato se analizó mediante ANOVA de una vía (\dagger), ANOVA de Kruskal-Wallis (\ddagger), y Chi al cuadrado (\P).

La Figura 2 proporciona las características de laboratorio clínicas de mujeres embarazadas con diversos trastornos hipertensivos. El dato se analizó mediante la prueba de Mann-Whitney (\S) y la prueba de la t de Student ($\&$).

La Figura 3 muestra las concentraciones de factores angiogénicos medidos en micción aleatoria. El dato se analizó mediante ANOVA de Kruskal-Wallis (\ddagger), y los valores se dan por mg de creatinina (mgc).

Las Figuras 4A-4D muestran la degradación polipeptídica de sFlt-1 y VEGF a lo largo del tiempo sin el tratamiento estabilizante descrito aquí.

Las Figuras 5A-5B muestran resultados de experimentos de ELISA representativos de (A) sFlt-1 y (B) PIGF.

Las Figuras 5C-5D muestran (C) una hoja de análisis representativa usada para el cálculo de uFP a partir del dato de ELISA, y (D) uFP medio (+SD) de pacientes con preeclampsia grave (sPE) frente a controles (CRL).

La Figura 6 muestra un dispersograma de la relación de tirosina cinasa 1 similar a fms soluble (sFlt-1) y el factor de crecimiento placentario libre (PIGF) en cada grupo de ensayo y de control. NP-CTR: control no embarazada; P-CTR: control embarazada; p-HTN: mujeres hipertensas/proteinúricas que no satisfacen los criterios para preeclampsia grave; sPE: preeclampsia grave.

La Figura 7 muestra el análisis de la curva de características operativas del receptor (ROC), que demuestra la capacidad de uFP ($\log[aFlt-1/PIGF \times 100]$) para diferenciar mujeres con preeclampsia grave de los controles normotensos.

La Figura 8 muestra un dispersograma del dato de ácido úrico frente a uFP; r: recta de regresión; PI: intervalo de predicción (intervalo de confianza para la población). El 73% de los datos de ácido úrico estuvieron disponibles para el análisis. sFlt-1: tirosina cinasa 1 similar a fms soluble; PIGF: factor de crecimiento placentario.

La Figura 9 muestra las concentraciones séricas y de orina de los factores angiogénicos urinarios, albúmina, creatinina, y relación de proteína total a creatinina, medidas en la micción aleatoria. Los datos se dan como media \pm SEM para datos distribuidos de forma normal (\dagger), o como una mediana e intervalo para datos sesgados (\ddagger).

Las Figuras 10A-10B muestran (A) la concentración de VEGF en suero en los grupos de estudio con su nivel de significancia, y (B) concentración de VEGF en orina en los grupos de estudio con su nivel de significancia. NP-CTR: control no embarazada; P-CTR: control embarazada; mPE: preeclampsia leve; sPE: preeclampsia grave. El dato se presenta como media y SEM.

Las Figuras 11A-11B muestran (A) la concentración de sFlt-1 en suero en los grupos de estudio con su nivel de significancia, y (B) concentración de sFlt-1 en orina en los grupos de estudio con su nivel de significancia. NP-CTR: control no embarazada; P-CTR: control embarazada; mPE: preeclampsia leve; sPE: preeclampsia grave. El dato se presenta como media y SEM.

5 Las Figuras 12A-12B muestran (A) la concentración de PIGF en suero en los grupos de estudio con su nivel de significancia, y (B) concentración de PIGF en orina en los grupos de estudio con su nivel de significancia. NP-CTR: control no embarazada; P-CTR: control embarazada; mPE: preeclampsia leve; sPE: preeclampsia grave. El dato se presenta como media y SEM.

10 La Figura 13 muestra la excreción fraccionada de los marcadores angiogénicos derivados de mujeres embarazadas que tienen trastornos hipertensivos y sujetos de control en formato logarítmico.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

15 La preeclampsia se desarrolla en la segunda mitad del embarazo, y está asociada con morbilidad materna y fetal significativa. Actualmente, no hay ningún ensayo de cribado efectivo para diagnosticar o evaluar el riesgo de desarrollar esta enfermedad y trastornos hipertensivos asociados. El resultado es que las mujeres embarazadas no pueden recibir una monitorización o tratamiento efectivo hasta que se han desarrollado complicaciones asociadas con los trastornos, incluyendo tensión arterial elevada y proteinuria, mucho tiempo después. Adicionalmente, las mujeres embarazadas con poco o ningún riesgo de desarrollar tales trastornos deben sufrir un ensayo innecesario en busca de síntomas durante su embarazo, debido a que no hay un medio efectivo mediante el cual los cuidadores de la salud puedan excluirlas del riesgo en las etapas tempranas del embarazo. Como se describe aquí, se teorizó que, debido a que la preeclampsia está acompañada invariablemente tanto por desajustes funcionales como morfológicos del riñón materno, los niveles urinarios de factores angiogénicos están alterados en mujeres embarazadas con preeclampsia, y proporcionarían un método de identificación más efectivo y menos invasivo para identificar o ayudar en la identificación de mujeres embarazadas con trastornos hipertensivos, incluyendo preeclampsia.

25 Como se usa aquí, "preeclampsia" se define según criterios bien establecidos, tales como tensión arterial de al menos 140/90 mm Hg y excreción urinaria de al menos 0,3 gramos de proteína en una excreción de proteína urinaria de 24 horas (o al menos +1 o mayor en la prueba con tira reactiva), cada uno en dos ocasiones separadas 4-6 horas. Como se usa aquí, "preeclampsia grave" también se define según criterios establecidos, como una tensión arterial de al menos 160/110 mm Hg en al menos 2 ocasiones separadas 6 horas, y más de 5 gramos de proteína en una excreción de proteína urinaria durante 24 horas o proteinuria +3 persistente en la prueba con tira reactiva. La preeclampsia grave puede incluir síndrome de HELLP (hemólisis, enzimas hepáticas elevadas, recuento plaquetario bajo). Otros elementos de preeclampsia grave pueden incluir restricción de crecimiento en útero (IUGR) en menos del 10% percentil según la demografía de los Estados Unidos de América, síntomas neurológicos persistentes (cefalea, trastornos visuales), dolor epigástrico, oliguria (menos de 500 ml/24 h), creatinina sérica mayor de 1,0 mg/dl, enzimas hepáticas elevadas (mayor que dos veces lo normal), trombocitopenia (< 100.000 células/ μ l).

40 Se describen aquí métodos y composiciones relacionadas para la detección y/o monitorización de los niveles de factores angiogénicos, específicamente VEGF, PIGF y sFlt-1, en muestras de orina obtenidas de mujeres embarazadas y la relación entre tales niveles y la probabilidad de que una mujer embarazada desarrollará un trastorno hipertensivo, tal como preeclampsia, en un punto particular en la progresión de su embarazo. La "progresión de embarazo" se refiere a las diversas etapas o fases del embarazo, incluyendo embarazo a lo largo de cada trimestre y durante la transición desde un trimestre al siguiente. La "progresión del embarazo" incluye el transcurso del embarazo tanto en embarazos normales como en embarazos en los que se desarrolla un trastorno hipertensivo. Un "embarazo normal" se refiere a un embarazo que no está complicado por y en el que la mujer no desarrolla un trastorno hipertensivo.

45 En los métodos descritos aquí, a las mujeres embarazadas se les puede diagnosticar que tienen un mayor riesgo de desarrollar cualquiera de los siguientes trastornos hipertensivos: preeclampsia, eclampsia, preeclampsia leve, hipertensión crónica, gestosis por EPH, hipertensión gestacional, preeclampsia sobrepuesta (incluyendo preeclampsia sobrepuesta en hipertensión crónica, nefropatía crónica o lupus), síndrome de HELLP (hemólisis, enzimas hepáticas elevadas, recuento plaquetario bajo) o nefropatía. Aunque esta invención se describe con respecto a mujeres embarazadas, los métodos descritos aquí también se pueden utilizar para evaluar el riesgo de mujeres no embarazadas de desarrollar trastornos hipertensivos durante el embarazo.

55 Los métodos y composiciones descritos aquí permiten a cualquiera evaluar y/o monitorizar el riesgo en una mujer embarazada de desarrollar un trastorno hipertensivo detectando y/o monitorizando los niveles de marcadores angiogénicos en una muestra o muestras de orina obtenidas de la mujer embarazada. Esto se puede llevar a cabo obteniendo una muestra de orina y analizándola para determinar los niveles de factores angiogénicos, como se describe aquí, en diversas etapas durante el embarazo. Los valores resultantes también se pueden comparar con un patrón conocido. Como se usan aquí, un "patrón apropiado" se refiere a los niveles del marcador angiogénico en

5 orina obtenido de un sujeto de referencia. La concentración del patrón apropiado se puede determinar a partir de muestras de orina obtenidas de mujeres embarazadas con embarazos normales, o a partir de mujeres embarazadas que tienen un trastorno hipertensivo confirmado, tal como preeclampsia (sujetos de referencia). Las muestras que forman la base de un patrón apropiado se obtienen del sujeto de referencia quien, cuando se obtiene la muestra, está en la semana de embarazo que corresponde a esa semana de embarazo en la que está el sujeto de ensayo cuando se obtiene la muestra de ensayo. Las muestras se pueden obtener y analizar al mismo tiempo a medida que las muestras de orina se obtienen de los sujetos de ensayo. Como alternativa, los niveles de expresión del patrón se pueden determinar prospectiva o retrospectivamente a la evaluación de la muestra de orina obtenida de un sujeto de ensayo usando estudios estadísticos con experimentación habitual. Los niveles de expresión del patrón se pueden determinar por una persona que tenga pericia normal en la técnica, usando métodos bien conocidos.

10 Una muestra de orina que se puede evaluar mediante los métodos de la presente invención es aquella que contiene niveles suficientes del marcador o marcadores angiogénicos de interés para la detección mediante las técnicas de evaluación descritas aquí. En particular, la muestra de orina debe tener niveles medibles de uno cualquiera de VEGF, PIGF y sFlt-1, según sea aplicable a la técnica de evaluación utilizada. Las muestras de orina se pueden analizar inmediatamente después de recogerlas, o en un tiempo posterior, con la condición de que, cuando se analizan, la muestra contenga niveles detectables del marcador o marcadores angiogénicos de interés. Por ejemplo, las muestras de orina se pueden congelar a -70°C y/o mezclar, combinar o almacenar en un recipiente previamente tratado con agentes que estabilizan o conservan el marcador o marcadores angiogénicos de interés. En una realización preferida, la muestra de orina se recoge de la primera micción matutina.

15 Como se usa aquí, la expresión “marcador angiogénico” se refiere a una o más moléculas, tales como VEGF, PIGF y sFlt-1, que se pueden usar, ya sea solas o en combinación, para detectar o ayudar en la detección de riesgo de desarrollar un trastorno hipertensivo, monitorizar la progresión de una complicación del embarazo asociada con un trastorno hipertensivo, y/o monitorizar la efectividad de un tratamiento para una complicación de embarazo asociada con un trastorno hipertensivo.

20 Como se usa aquí, el término “polipéptido” se refiere a un polímero de aminoácidos, y no a una longitud específica. De este modo, los péptidos, oligopéptidos y proteínas están incluidos en la definición de polipéptido.

25 Los niveles de un marcador angiogénico que es útil en un método de la presente invención se pueden evaluar mediante cualquiera de una amplia variedad de métodos bien conocidos para detectar la expresión de una molécula transcrita, o su proteína correspondiente. Los ejemplos no limitantes de tales métodos incluyen métodos inmunológicos para la detección de proteínas segregadas, métodos de purificación de proteínas, ensayos de la función o actividad de proteínas, métodos de hibridación de ácidos nucleicos, métodos de transcripción inversa de ácidos nucleicos, y métodos de amplificación de ácidos nucleicos. En una realización, los niveles de un marcador angiogénico se evalúan usando un ensayo ELISA.

30 En ciertas realizaciones, la invención comprende tratar la muestra o muestras de orina procedentes de la mujer embarazada con uno o más agentes estabilizantes, y/o pretratar el recipiente usado para la recogida de tal muestra o muestras de orina con uno o más agentes estabilizantes antes de medir los niveles de marcadores angiogénicos. La expresión “agente estabilizante” se refiere a una o más moléculas, tales como polipéptidos o ácidos nucleicos, que se pueden usar para evitar la degradación de los marcadores angiogénicos. En una realización, el agente estabilizante es un inhibidor de proteasas, incluyendo cualquiera de antipapaína, aprotinina, benzamidina e hidrocloreuro de benzamidina, bestatina, quimostatina, E-64 (L-trans-epoxisuccinil-leucinamida-(4-guanido)-butano o N-[N-(L-trans-carboxioxiran-2-carbonil)-L-leucil]agmatina), ácido etilendiaminotetraacético y su sal sódica (EDTA-Na₂), leupeptina, etilmaleimida, pepstatina y pepstatina A, fosforamidón, azida sódica, inhibidor de tripsina o ácido ε-aminocaproico.

35 Se ha demostrado que sFlt-1 urinaria está significativamente incrementada y PIGF urinario está significativamente disminuido en mujeres embarazadas con trastornos hipertensivos. La invención presenta métodos para medir la concentración de PIGF y sFlt-1 en una muestra de orina, y utilizar la relación de tales factores de crecimiento opuestos para diferenciar a mujeres embarazadas con preeclampsia grave de mujeres embarazadas con otras formas de trastornos hipertensivos, incluyendo preeclampsia leve con o sin hipertensión crónica, o de controles normotensos. Los métodos de la invención también se pueden usar para evaluar el riesgo de una mujer embarazada a desarrollar una concentración específica de trastornos hipertensivos, incluyendo preeclampsia. Tales complicaciones pueden incluir parto por cesárea, aumento de ácido úrico sérico, aumento de tensiones arteriales sistólica y diastólica, proteinuria de tira reactiva, embarazo, peso fetal en el parto, desprendimiento placentario, (IUGR), hemólisis, trombocitopenia, enzimas hepáticas elevadas y síndrome de HELLP (hemólisis, enzimas hepáticas elevadas, recuento plaquetario bajo).

40 En ciertas realizaciones, se usa una fórmula para analizar los resultados de la determinación de concentraciones o niveles de marcadores angiogénicos. El valor resultante proporciona información con respecto a la probabilidad de que la mujer embarazada desarrollará un trastorno hipertensivo, tal como preeclampsia. Como se usa aquí, el término “fórmula” se refiere a cualquier expresión matemática, algoritmo u otra métrica que sea útil para evaluar si

los niveles de un marcador o marcadores angiogénicos de interés indican que una mujer embarazada tiene o está en riesgo de desarrollar un trastorno hipertensivo y/o complicaciones específicas de trastornos hipertensivos.

En una realización, la fórmula se usa para calcular uFP de la mujer embarazada. Para los fines de esta invención, el término "uFP" se refiere al $\log [sFlt-1/PIFG \times 100]$. En un aspecto de la invención, un uFP en exceso de 1,4 es un indicador pronóstico de un mayor riesgo de que una mujer embarazada requerirá tratamiento para evitar el desarrollo de o empeoramiento de síntomas asociados con trastornos hipertensivos. En otro aspecto de la invención, un uFP en exceso de 2,1 indica que una mujer embarazada tiene o está en riesgo de desarrollar preeclampsia grave. En un aspecto adicional de la invención, un uFP en exceso de 2,1 indica que una mujer embarazada tiene riesgo de alumbrar por cesárea.

Se describen aquí kits relacionados con los métodos y/o composiciones de la invención. Los reactivos pueden ser compuestos marcados o agentes capaces de detectar un polipéptido correspondiente a un marcador angiogénico de la invención en una muestra de orina, y medios para determinar la cantidad del polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo que se une al polipéptido). Los reactivos adecuados para la unión con un polipéptido correspondiente a un marcador angiogénico útil en un método de la presente invención incluyen anticuerpos, derivados de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, y similares. Para kits a base de anticuerpos, el kit puede comprender, por ejemplo: (1) un primer anticuerpo (por ejemplo, fijado a un soporte sólido) que se une a un polipéptido que corresponde a un marcador angiogénico de la invención; y, opcionalmente, (2) un segundo anticuerpo diferente que se une al polipéptido o al primer anticuerpo, y está conjugado a un marcador detectable.

La muestra apropiada se usa para comparar los resultados obtenidos de la muestra que se ensaya.

El kit también puede comprender otros componentes tales como un agente tamponante, un conservante, o un agente estabilizante de proteínas. El kit puede comprender además componentes necesarios para detectar el marcador detectable (por ejemplo, una enzima o un sustrato).

Cada componente del kit se puede encerrar en un recipiente individual, y todos los diversos recipientes pueden estar en un solo envase, junto con instrucciones para interpretar los resultados de los ensayos llevados a cabo usando el kit. El recipiente se puede pretratar con un agente estabilizante, y/o un agente estabilizante puede ser un componente del kit.

Los métodos descritos también se refieren a evaluar si el daño glomerular que se produce en mujeres con preeclampsia grave da cuenta de la liberación incrementada de marcadores angiogénicos en una muestra de orina. Estudios recientes dados a conocer apoyan el criterio de que la placentación defectuosa conduce a isquemia placentaria seguida de liberación sistemática de productos citotóxicos que dañan el endotelio vascular materno. Se ha teorizado que tales trastornos en angiogénesis también ejercen efectos indirectos sobre la vasculatura materna general, incluyendo aquella del riñón (19, 20, 21, 22, 23). Debido a que la endoteliosis glomerular es una lesión morfológica habitual de la preeclampsia, nos hemos centrado en si los niveles incrementados de los marcadores angiogénicos en una muestra de orina resultaron de la secreción incrementada de estos marcadores en orina debido al daño glomerular, o si la excreción urinaria incrementada reflejó síntesis vascular placentaria o sistémica incrementada. Se encontró que los niveles séricos de los factores angiogénicos no se correlacionan consistentemente con el nivel urinario de los factores. También se encontró que las excreciones fraccionadas de VEGF y sFlt-1 están incrementadas en mujeres con preeclampsia grave en el momento de la enfermedad manifiesta clínica, independientemente de la pérdida de integridad glomerular como se refleja por el grado de proteinuria.

Los artículos "un", "una" y "el/la" se usan aquí para referirse a al menos un objeto gramatical del artículo.

El término "incluyendo" se usa aquí para querer decir, y se usa de forma intercambiable con, la frase "incluyendo pero sin limitarse a".

La expresión "tal como" se usa aquí para querer decir, y se usa de forma intercambiable con, la frase "tal como pero sin limitarse a".

Mientras que la descripción detallada presentada se refiere a VEGF, PlGF y sFlt-1, estará claro para una persona de pericia normal en la técnica que la descripción también se puede aplicar a miembros de familia, homólogos, variantes alélicas de origen natural, isoformas, precursores y/o variantes de cada factor de crecimiento.

La práctica de la presente invención empleará, excepto que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, microbiología, ADN recombinante, e inmunología, las cuales están dentro de la pericia de la técnica. Tales técnicas se describen en la bibliografía.

EJEMPLIFICACIÓN

Habiéndose descrito ahora generalmente la invención, se entenderá más fácilmente mediante referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen simplemente con fines ilustrativos de ciertos aspectos y realizaciones de la

presente invención, y no pretenden limitar la invención.

EJEMPLO 1

Niveles incrementados de sFlt-1 y niveles reducidos de PIGF en mujeres embarazadas con trastornos hipertensivos.

Participantes

5 Se utilizaron muestras de orina procedentes de 68 mujeres admitidas en el Yale New Haven Hospital entre febrero y agosto del año 2004. Las muestras se recogieron bajo protocolos aprobados por el Human Investigation Committee de la Universidad de Yale. Se obtuvo una autorización escrita de todos los pacientes. La edad gestacional se estableció basándose en la fecha menstrual y/o examen ultrasonográfico antes de 20 semanas de gestación. Todas las mujeres invitadas a participar en el estudio estuvieron de acuerdo. Se solicitó la participación de mujeres embarazadas admitidas en la sala de partos, y en las Unidades de Alto y Bajo Riesgo de Anteparto, y admitieron a las pacientes de forma prospectiva. Ninguna de las pacientes que se unieron fue excluida del análisis final.

10 Se ensayaron los siguientes grupos de mujeres: preeclampsia grave (sPE, n = 17), trastornos hipertensivos/proteinúricos asociados con embarazo que no satisficieron los criterios para preeclampsia grave (pHTN, n = 21), control embarazada sana (P-CTR, n = 16), y mujeres en edad reproductiva no embarazadas sanas (NP-CTR, n = 14). Como se usa aquí, "preeclampsia" se definió según los criterios establecidos, como una tensión arterial diastólica de al menos 140/90 mm Hg y excreción urinaria de al menos 0,3 gramos de proteína en una excreción de proteína urinaria durante 24 horas (o proteinuria de al menos +1 en la prueba con tira reactiva), cada uno en dos ocasiones separadas 4-6 horas. Como se usa aquí, "preeclampsia grave (sPE)" se define como síndrome de HELLP (hemólisis, enzimas hepáticas elevadas, recuento plaquetario bajo), tensión arterial > 160/110 mm Hg en al menos 2 ocasiones separadas 6 horas, > 5 gramos en una excreción de proteína urinaria durante 24 horas, o proteinuria +3 persistente en la prueba con tira reactiva. Otros elementos de la definición incluyeron restricción de crecimiento en útero (IUGR) < 10% percentil según la demografía de los Estados Unidos de América, síntomas neurológicos persistentes (cefalea, alteraciones visuales), dolor epigástrico, oliguria (menos de 500 ml/24 h) creatinina sérica > 1,0 mg/dl, enzimas hepáticas elevadas (mayor que dos veces lo normal), trombocitopenia (< 100.000 células/ μ l). "Hipertensión crónica (crHTN)" se refiere a una elevación sostenida de la tensión arterial > 140/90 mm Hg antes del embarazo o antes de las 20 semanas de gestación. "Proteinuria" se define como > 300 mg de proteína una recogida de orina de 24 horas. Para evaluar cambios histológicos inducidos por trastornos hipertensivos en placenta, se consultó los informes de patología generados por un patólogo clínico que desconocía los resultados del presente estudio. Los informes de patología estuvieron disponibles en 29 de 38 pacientes hipertensas, y se apartaron en busca de la presencia de corionitis, infartos con volúmenes > 3 cc., signos de cambios patológicos consistentes con preeclampsia (vasos deciduales sin signos de invasión trofoblástica o conversión fisiológica), y/o signos de desprendimiento (deposición de hemosiderina y/o trombo interveloso).

15 De 68 pacientes que entraron en este estudio, 17 satisficieron los criterios para sPE. En el momento de su adhesión, sólo se sabía si una mujer era o no hipertensa, o si la mujer satisfizo o no los criterios clínicos para sPE. Puesto que no se podría hacer ninguna predicción con respecto a la naturaleza de la condición hipertensiva, el grupo de pHTN (n = 21) fue heterogéneo, consistiendo en mujeres con anamnesis previa de crHTN (n = 10), preeclampsia leve (n = 9) o neuropatías proteinúricas hipertensivas (n = 2, lupus y síndrome nefrítico).

20 Comparado con las mujeres con sPE, el grupo de pHTN tenía significativamente más edad (Student-Newman-Keuls, p = 0,021) (Figura 1). No hubo diferencia en la edad gestacional (GA) entre grupos en el momento de la toma de muestras. De forma similar, no hubo diferencia en gravidez, número de partos, o peso materno en nuestra cohorte. Las mujeres hipertensas en los grupos tanto de sPE como pHTN tuvieron valores de tensión arterial significativamente mayores en comparación con P-CTR (tensión arterial media: sPE: 122, pHTN: 115, P-CTR: 77 mm Hg, p < 0,001). Una mayor proporción de mujeres con sPE manifestaron síntomas neurológicos (Figura 1).

25 El diagnóstico clínico estuvo apoyado por cambios histológicos placentarios y de laboratorio clínico que se produjeron en los grupos hipertensos (Figura 2).

30 Las mujeres con sPE tuvieron mayores grados de proteinuria cuando se cribaron con la prueba de tira reactiva urinaria rápida. Sin embargo, cuando se analizó la excreción de proteína urinaria de 24 horas en laboratorio, no se pudieron confirmar diferentes entre los grupos sPE y pHTN. Los pacientes con sPE tuvieron mayores niveles de lactato deshidrogenasa-LDH (indicador de hemólisis intravascular), ácido úrico, y un menor recuento plaquetario, en comparación con las mujeres con pHTN. Los signos histológicos de desprendimiento (deposición de hemosiderina o trombos intervelosos) fueron más habituales en embarazos complicados por sPE (p = 0,003, test exacto de Fisher).

Recogida de muestras

35 Se recogió una muestra de orina aleatoria (5-10 ml/muestra) mediante uso estándar de recipientes estériles. En el momento de su entrada en el estudio, todas las mujeres con sPE tenían colocado una sonda de Foley para permitir la monitorización exacta de la diuresis. En ausencia de una sonda de Foley, las muestras de orina se recogieron

usando otra técnica estéril (“sonda recta” o “captura de chorro medio”). La técnica de “sonda recta” es un procedimiento de “entrada y salida” que usa una sonda recta para recoger orina de manera estéril. La técnica de “captura de chorro medio” es un método para recoger una muestra de orina mientras se minimiza la contaminación bacteriana procedente de la flora genital. El 60% de las mujeres con sPE entró en el estudio tras iniciar la profilaxis de ataques con sulfato de magnesio. La profilaxis de ataques con sulfato de magnesio son las normas asistenciales para pacientes con preeclampsia clínica, debido a que se ha demostrado que el tratamiento con sulfato de magnesio evita el comienzo de ataques en tales pacientes. Se recogieron muestras de orina de nueve mujeres antes y también 2-12 horas después del inicio de la terapia de profilaxis de ataques. En paralelo, se realizaron análisis bioquímicos de las muestras urinarias. Tras recogerlas, las muestras se hicieron girar a 3000 x g a 4°C durante 20 min., se repartieron en alícuotas y se almacenaron inmediatamente a -80°C hasta que se midieron los niveles de sFlt-1, VEGF y PIGF mediante inmunoensayos específicos.

Procedimientos de inmunoensayo

Los ensayos de ELISA para VEGF, sFlt-1 y PIGF libres humanos se llevaron a cabo según las instrucciones del fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN). Las muestras se ensayaron por duplicado en una placa de 96 pocillos prerrevestida con un anticuerpo de captura dirigido contra VEGF, sFlt-1 o PIGF libre. Se llevaron a cabo protocolos de incubación, seguidos de lavados y lectura a 450 nm según el sumario del procedimiento. Las dosis detectables mínimas en los ensayos para VEGF, sFlt-1 y PIGF fueron 5, 5 y 7 pg/ml, respectivamente. Los coeficientes de variación de interensayos e intraensayos variaron de 3 a 10%. Puesto que la proteinuria puede sufrir variaciones diurnas, el dato se calculó y se normalizó basándose en las concentraciones de creatinina y de proteína determinadas a partir de la misma alícuota usando curvas estándar derivadas de concentraciones conocidas. Los niveles o factores angiogénicos se normalizaron para las concentraciones de creatinina y/o proteína total.

Análisis estadístico

Todos los conjuntos de datos se sometieron a ensayo de normalidad usando el método de Kolmogorov-Smirnov, y se dan como media e intervalo de confianza de 95% (95% CI) (para datos distribuidos de forma normal) o como media con intervalo (para datos sesgados). La concentración de VEGF, sFlt-1 y PIGF se presentó como media aritmética, y el análisis estadístico se completó antes (ANOVA de Kruskal-Wallis) o después (ANOVA de una vía) de la transformación logarítmica de los datos. Las comparaciones entre dos grupos se realizó usando las pruebas de la t de Student o la prueba de la suma de rangos de Mann-Whitney. Las proporciones se compararon con las pruebas exacta de Fisher o Chi cuadrado. Se aplicó análisis uni- y multivariante con un modelo de regresión lineal para identificar asociaciones significativas entre características maternas o de laboratorio como variables independientes, y la relación sFlt/PIGF como variable dependiente. Para medir la colinealidad entre las variables independientes seleccionadas así como otras correlaciones relevantes entre variables dependientes e independientes se usó una correlación del producto-momento de Pearson o Spearman. El análisis de la curva de características operativas del receptor (ROC) se llevó a cabo usando el software estadístico de MedCalc (Broekstraat, Bélgica). La significancia estadística se juzgó a $p < 0,05$.

Niveles urinarios de VEGF, sFlt-1 y PIGF

No hubo ninguna correlación entre los niveles urinarios de VEGF, sFlt-1, PIGF y GA en el momento de la toma de muestras (VEGF: $r = 0,09$, sFlt-1: $r = 0,02$, PIGF: $r = 0,03$, $p > 0,05$). La Figura 3 más abajo presenta niveles urinarios de factores angiogénicos (en formato no logarítmico).

Las mujeres con sPE tuvieron mayores niveles de orina de VEGF en comparación con las NP-CTR (Student-Newman-Keuls, $p = 0,023$). VEGF urinario no varió significativamente entre los grupos embarazados (ANOVA de una vía, $p = 0,536$). La concentración de PIGF urinario se incrementó significativamente en mujeres embarazadas sanas en comparación con el grupo de NP-CTR (Student-Newman-Keuls, $p < 0,001$). El embarazo normal estuvo asociado con niveles significativamente mayores de PIGF urinario en comparación con NP-CTR ($p < 0,001$). El resultado de PIGF urinario disminuyó significativamente entre las mujeres con pHTN y sPE, en comparación con controles embarazadas sanas ($p < 0,001$). Finalmente, se determinó que las mujeres con sPE tuvieron niveles urinarios significativamente mayores de sFlt-1 en comparación con pHTN ($p = 0,016$) y P-CTR ($p < 0,001$). Las mujeres con pHTN tuvieron un mayor resultado urinario de sFlt-1 en comparación con el grupo de P-CTR ($p = 0,001$). No hubo diferencia significativa en los niveles urinarios de sFlt-1 entre los controles sanos de P-CTR y NP-CTR ($p = 0,594$).

EJEMPLO 2

Degradación de sFlt-1 y VEGF en muestras de orina

Se llevaron a cabo experimentos para estudiar la estabilidad de los factores angiogénicos en orina. Se ensayaron ocho muestras de orina procedentes de pacientes con preeclampsia (i) como se describe aquí como muestras de orina o (ii) después de un período de 24 horas a temperatura ambiente. La Figura 4 más abajo muestra el análisis de la concordancia entre los datos de ELISA de las dos muestras usando el método de concordancia de Bland-Altman.

Este análisis representa el valor diferencial entre las dos medidas (sesgo) frente a su promedio para evaluar si las diferencia entre las dos técnicas son importantes, ya sea que los dos métodos se puedan usar de forma intercambiable y si la variabilidad de las diferencias aumenta a medida que aumenta la magnitud de la medida. Los resultados demuestran que la pérdida más grande en inmunorreactividad es para sFlt-1 (Figura 4A: promedio: 57,5 pg/ml), seguido de VEGF (Figura 4B: promedio: 41,1 pg/ml). Para PIGF (Figura 4C), el sesgo negativo (-8,8 pg/ml) sugiere que después de 24 horas a RT se midió un valor ligeramente mayor, sugiriendo que otros factores, tales como la posible evaporación de la muestra, también pueden impactar en los resultados. La Figura 4D ilustra el cambio relativo en inmunorreactividad desde antes como niveles de 100%. Los resultados sugieren que la inmunorreactividad para sFlt-1 disminuyó estadísticamente (pruebas de rangos con signos $p = 0,023$ para sFlt-1), permaneció sin cambio para VEGF ($p > 0,05$), y aumentó significativamente para PIGF (pruebas de rangos con signos $p = 0,023$).

EJEMPLO 3

Relación sFlt-1/PIGF urinaria

Como se descubre aquí, el embarazo normal se caracteriza por una mayor excreción de PIGF urinario, mientras que los estados hipertensivos se caracterizan por mayor sFlt-1, pero menor PIGF urinario. Las Figuras 5A-5B más abajo muestran experimentos de ELISA representativos que demuestran el efecto de tales estados hipertensivos en (A) niveles de sFlt-1 en mujeres embarazadas y (B) niveles de PIGF en mujeres embarazadas. A la vista de esto, se razonó que la relación de sFlt a PIGF (uFP) urinaria sería un mejor indicador de la homeostasis urinaria individual de marcadores angiogénicos. El indicador de la relación se computó usando la siguiente fórmula: $uFP = \log [sFlt/PIGF \times 100]$. Las Figuras 5C-5D más abajo muestran (C) una hoja de análisis representativa usada para el cálculo de uFP a partir de los datos de ELISA presentados aquí, y (D) uFP medio (+SD) de pacientes con sPE frente a P-CTR. Los resultados de tales cálculos demostraron que uFP fue significativamente elevada en mujeres con sPE en comparación con pHTN (Student-Newman-Keuls, $p = 0,008$), P-CTR ($p < 0,001$) o NP-CTR ($p < 0,001$) (Figura 6). El grupo de pHTN también tuvo valores de uFP significativamente elevados en comparación con P-CTR ($p < 0,001$) y NP-CTR ($p < 0,001$).

Se llevó a cabo un análisis de ROC para el uFP. A partir de tal análisis, se determinó que un corte de $>2,1$ tuvo una sensibilidad de 88,2% y especificidad de 100% diferenciando mujeres con sPE de controles normotensos (área bajo la curva, [95% CI]: 0,974 [0,849-0,994]) (Figura 7). El uFP fue significativamente mejor que la proteinuria sola agrupando mujeres con sPE de los controles normotensos (área bajo la curva [95% CI]: 0,809 [0,635-0,924], $p = 0,03$).

También se examinó un posible efecto de la infusión de sulfato de magnesio comparando la relación de uFP en un grupo de nueve mujeres en las que las muestras de orina estuvieron disponibles antes y después del inicio del tratamiento. Se determinó que uFP (prueba de la t pareada, $p = 0,854$) no cambió significativamente 2-12 horas en respuesta a la profilaxis de ataques con sulfato de magnesio.

Para investigar las posibles relaciones entre la relación uFP y varios factores maternos y de laboratorio químico, se hizo un modelo de la relación uFP como variable dependiente frente a la edad materna, gravidez, número de partos, GA, IUGR, tensión arterial sistólica y diastólica, proteinuria, síntomas neurológicos (0 = ninguno; 1 = presente), ensayos de función hepática (AST, ALT), recuento plaquetario, modo de dar a luz (parto por cesárea [CD] frente a parto vaginal espontáneo [SVD]), ácido úrico, LDH sérico, y signos histopatológicos de desprendimiento placentario (0 = ninguno; 1 = presente), como variables independientes. Estas variables se introdujeron en un modelo de regresión lineal múltiple. Se descubrió que ácido úrico y el parto mediante CD completaron mejor el modelo ($r = 0,628$) y se correlacionaron con uFP ($p = 0,002$ para CS, $p = 0,005$ para ácido úrico). No hubo ninguna colinealidad significativa entre los dos parámetros (CD y ácido úrico) que finalmente permanecieron en nuestro modelo ($r = 0,143$, $p = 0,391$).

En el análisis univariante, se identificó ($r = 0,458$ de Pearson, $p = 0,003$) (Figura 8) una relación significativa entre uFP y ácido úrico sérico materno, y entre uFP y el parto por CD ($r = 0,514$ de Spearman, $p < 0,001$). Las mujeres que dieron a luz mediante CD tuvieron relaciones uFP significativamente elevadas en comparación con mujeres que dieron a luz de forma natural (promedio [95% CI] CS: 2,6 [2,4-2,8] frente a SVD: 1,8 [1,8-2,3], $p = 0,007$). Se determinó además que las mujeres con una relación uFP de alrededor de 2,1 tuvo un mayor riesgo de dar a luz por CD (OR [95% CI]: 6,57 [1,51-28,53]). Otras variables consistentes con la gravedad de la enfermedad se correlacionaron significativamente con uFP: tensiones arteriales sistólica y diastólica, proteinuria en tira reactiva ($p < 0,001$), gravidez, peso fetal en el parto, signos de desprendimiento placentario, número de partos e IUGR ($p < 0,05$).

EJEMPLO 4

Concentraciones séricas y en orina maternas de factores angiogénicos.

55 *Participantes y recogida de muestras*

Para este estudio, se estudiaron muestras emparejadas en el tiempo pareadas de suero-orina procedentes de 64 mujeres admitidas en el Yale New Haven Hospital entre febrero de 2004 y enero de 2005. Las muestras se recogieron bajo los protocolos aceptados por el Human Investigation Committee de la Universidad de Yale. Todas las participantes proporcionaron una autorización escrita antes de su inclusión. Todas las mujeres a las que se les solicitó que participaran estuvieron de acuerdo en participar. Los resultados de inmunoensayos de orina, pero o de suero, de 14 mujeres fueron como se dio a conocer previamente. La edad gestacional (GA) se estableció basándose en la fecha menstrual y/o el examen ultrasonográfico antes de las 20 semanas de gestación. Los sujetos se reclutaron de mujeres evaluadas o admitidas en la unidad de partos y en las unidades de riesgo elevado y bajo de anteparto. A los sujetos se les solicitó su participación prospectivamente basándose en la disponibilidad de uno de los investigadores (CSB). Ninguna de las mujeres incluidas se excluyó del análisis final.

A las pacientes se las incluyó en los siguientes grupos: preeclampsia grave (sPE, n = 27), mujeres proteinúricas e hipertensas levemente preeclámpsicas que no satisficieron los criterios de preeclampsia grave (mPE, n = 15), mujeres de control embarazadas sanas (P-CTR, n = 13), y mujeres no embarazadas sanas de edad reproductiva (NP-CTR, n = 9). La preeclampsia leve se definió según el criterio establecido como una tensión arterial diastólica de al menos 140/90 mm Hg y una excreción urinaria de al menos 0,3 gramos de proteína en una excreción de proteína urinaria de 24 horas (o al menos 1+ o mayor en la prueba en tira reactiva), cada uno en dos ocasiones separadas 4-6 horas (24). sPE se definió como síndrome de HELLP (hemólisis, enzimas hepáticas elevadas, recuento plaquetario bajo), tensión arterial > 160/110 mm Hg en al menos 2 ocasiones separadas 6 horas, > 5 gramos en una excreción de proteína urinaria de 24 horas, y o proteinuria +3 persistente en una prueba de tira reactiva. Otros elementos de la definición de sPE incluyeron restricción de crecimiento en útero (IUGR) < 10^o percentil, síntomas neurológicos persistentes (cefalea, alteraciones visuales), dolor epigástrico, oliguria (menos de 500 ml/24 h), creatinina sérica > 1,0 mg/dl, enzimas hepáticas elevadas (mayor que dos veces lo normal), trombocitopenia (< 100.000 células/ μ l). La hipertensión crónica (crHTN) se definió como una elevación sostenida en la BP >140/90 mm Hg antes del embarazo o antes de 20 semanas completas de gestación. La proteinuria se definió como >300 mg de proteína en un período de 24 horas de recogida de orina.

Se recogió una muestra de orina aleatoria (5-10 ml) mediante uso estándar de recipientes estériles. En el momento de su inclusión, a todas las mujeres con sPE se les colocó una sonda de Foley para permitir la monitorización exacta de diuresis. En ausencia de una sonda de Foley, las muestras de orina se recogieron usando otras técnicas (cateterización de la vejiga o método de "recogida de chorro medio"). Las muestras obtenidas a partir de mujeres mPE, P-CTR, y NP-CTR también se recogieron en condiciones estériles (Foley, cateterización de vejiga o técnica de "recogida de chorro medio"). Setenta por ciento de las mujeres con sPE se incluyeron antes del inicio de la profilaxis de ataques con sulfato de magnesio. Se recogió una muestra de sangre mediante venipunción en el momento de la recogida de orina, y se dejó coagular. Las muestras se recogieron en el momento de la admisión, antes de la inducción del parto o del parto por cesárea. Las muestras de suero y de orina se hicieron girar a 3000 X g a 4°C durante 20 min., el sobrenadante se repartió en alícuotas y se almacenó inmediatamente a -80°C hasta que los niveles de sFlt-1, VEGF y PIGF se midieron usando inmunoensayos específicos.

Procedimientos de inmunoensayo para VEGF, sFlt-1 y PIGF

Los ensayos ELISA para VEGF, sFlt-1 y PIGF no unidos humanos se llevaron a cabo según las instrucciones del fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN). Las muestras de suero y de orina se evaluaron por duplicado en una placa de 96 pocillos revestida previamente con un anticuerpo de captura dirigido frente a VEGF, sFlt-1 o PIGF libre. Se llevaron a cabo protocolos de incubación, seguidos de lavados y lectura a 450 nm según el sumario del procedimiento. Las concentraciones detectables mínimas en los ensayos para VEGF, sFlt-1 y PIGF fueron 2, 5 y 7 pg/ml, respectivamente. Nuestros datos se dieron a conocer y se representan gráficamente usando el software de Softmax Pro 3.1.1 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Este software da a conocer un valor positivo si la densidad óptica de los pocillos con muestras está por encima de la del patrón cero (pocillos en blanco). Si la densidad óptica de un pocillo de muestras está por debajo de la del patrón cero, se le asigna un valor negativo y automáticamente se convierte en cero por el ordenador. El VEGF sérico fue el único analito en el que hubo casos de niveles indetectables (valores menores que el estándar de cero) en cualquiera de los ensayos. Los coeficientes de variación interensayos e intraensayos variaron de 3 a 10%. Las placas se leyeron a 450 nm con una corrección de longitud de onda de 570 nm usando un lector de microplacas VERSAmax™ con el software Softmax Pro 3.1.1.

Procedimiento de inmunoensayo para albúmina

Las placas de microtitulación (Immuno MaxiSorp, Nalge Nunc, Rochester, NY) se revistieron con anticuerpo de captura (10 μ g/ml de anticuerpo anti-albúmina humana de cabra (Bethyl Laboratories). Las placas se lavaron, se bloquearon y se incubaron con muestras de orina (dilución 1:1000 ó 1:100 para pacientes NP) o de suero (diluida 1:150.000) o calibradores de albúmina humana (Bethyl Laboratories) en un intervalo de 6,25 a 400 ng/ml. La detección se logró usando un anticuerpo anti-albúmina humana de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (dilución 1:150.000, Bethyl Laboratories) y 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Vector Laboratories, Burlingame, CA) como sustrato. El color de la reacción se detuvo con ácido sulfúrico 2M, y las placas se leyeron a 450 nm con corrección de longitud de onda de 650 nm. El coeficiente de variación intraensayo fue menor que 5%. La sensibilidad

del ensayo fue 1 ng/ml.

Otras estimaciones bioquímicas

Los niveles de creatinina en suero y en orina se midieron en la misma alícuota usada para inmunoensayos, usando un ensayo colorimétrico (Stanbio Laboratory, Boerne, TX) frente a curvas patrón derivadas de concentraciones conocidas. También se midieron los niveles de proteína total usando un reactivo de ácido bicinónico/sulfato de cobre (kit BCA, Pierce, Rockford, IL). Los niveles urinarios de factores angiogénicos, proteína o albúmina se normalizaron a concentraciones de creatinina urinaria.

Análisis estadístico

Todos los conjuntos de datos se sometieron a ensayo de normalidad usando el método de Kolmogorov-Smirnov, y los datos se dieron como media y 95% de intervalo de confianza (95%CI) o error estándar de la media (SEM) (para datos distribuidos normalmente), o como una mediana con intervalo (para datos sesgados). El análisis estadístico de la excreción fraccionada de factores angiogénicos se completó tras la transformación logarítmica de los datos. Se llevaron a cabo procedimientos de comparación múltiple por pares usando análisis de varianza de una vía o ANOVA de Kruskal-Wallis, según fuese apropiado. Las comparaciones entre dos grupos se llevaron a cabo usando las pruebas de la t de Student o las pruebas de suma de rangos de Mann-Whitney. Las proporciones se compararon con la prueba exacta de Fisher. Para medir la colinealidad entre las variables independientes seleccionadas, así como otras correlaciones relevantes entre variables dependientes e independientes, se usó la correlación de producto-momento de Pearson. Para cada factor angiogénico, se calculó un indicador de excreción fraccionada usando la siguiente fórmula $[Ua] \times [Sc]/[Sa] \times [Uc]$, representando [Ua] y [Sa] la concentración urinaria y sérica del factor angiogénico, respectivamente, y representando [Uc] y [Sc] la concentración de creatinina urinaria y sérica. Se realizaron cálculos similares para albúmina y proteínas totales. La significancia estadística se juzgó a $p < 0,05$.

Niveles de suero-orina de factores angiogénicos, proteína, relación de proteína total/creatinina aleatoria de orina, albúmina y creatinina.

Los resultados de los inmunoensayos se muestran en la Figura 9. Hubo diferencias significativas en las concentraciones séricas y de orina entre los grupos para VEGF, sFlt-1 y PlGF. Las mujeres con sPE tuvieron concentraciones proteicas séricas (ANOVA de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) significativamente menores pero no las urinarias ($p = 0,495$), en comparación con mujeres mPE. La relación de proteína total/creatinina aleatoria de orina se ha propugnado desde hace tiempo como un factor pronóstico de una excreción de proteína total de orina de 24 horas (25). Las mujeres con sPE pero no mPE tuvieron una relación de proteína total a creatinina aleatoria de orina significativamente mayor en comparación con los otros grupos del estudio (ANOVA de Kruskal-Wallis, $p = 0,007$).

Los resultados del análisis de seroalbúmina demostraron que no hubo diferencias significativas entre los grupos (Figura 9). Sin embargo, hubo una diferencia significativa en la albuminuria entre grupos según se evalúa en una muestra de orina aleatoria ($p < 0,001$). No hubo ninguna correlación significativa entre proteinuria y albuminuria para los grupos de mPE ($r = 0,477$, $p = 0,080$) o sPE ($r = 0,143$, $p = 0,472$). Las concentraciones de creatinina séricas de mujeres con sPE fueron significativamente mayores en comparación con mPE (ANOVA de una vía, $p = 0,04$) y P-CTR ($p = 0,005$).

Niveles de VEGF de suero-orina

El embarazo se caracterizó por un nivel sérico reducido de VEGF (NP-CTR frente a P-CTR, $p < 0,001$) (Figura 9). Las mujeres con sPE tuvieron una concentración sérica significativamente menor de VEGF libre en comparación con mujeres P-CTR (ANOVA de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$), pero no mPE ($p > 0,05$) (Figura 10A). No hubo diferencia en las concentraciones urinarias de VEGF entre las mujeres NP-CTR, P-CTR mPE (ANOVA de una vía, $p = 0,371$). Por el contrario, las mujeres con sPE duplicaron más del doble sus concentraciones de VEGF urinarias en comparación con el grupo de mPE ($p = 0,01$) (Figura 10B). No hubo una correlación significativa entre albuminuria y los niveles urinarios de VEGF para el grupo de sPE ($r = 0,083$, $p = 0,860$). Hubo una correlación significativa entre proteinuria y la concentración urinaria de VEGF en el grupo de mPE ($r = 0,713$, $p = 0,003$), pero no en el grupo de sPE ($r = -0,021$, $p = 0,918$) indicando que sPE altera profundamente la concentración sérica y de orina de este factor angiogénico, pero independientemente de proteinuria.

Niveles de sFlt-1 en suero-orina

El embarazo está asociado con mayores niveles séricos de sFlt-1 (ANOVA de Kruskal-Wallis, NP-CTR frente a PCTR, $p < 0,001$) (Figura 11A). En el momento del diagnóstico clínico, tanto el grupo de mPE como de sPE tuvieron niveles séricos medios de sFlt-1 significativamente elevados en comparación con controles embarazadas sanas ($p < 0,05$). Las mujeres con sPE se distinguieron de mPE puesto que sus concentraciones séricas de sFlt-1 fueron un 47% mayor (sPE frente a mPE, $p < 0,05$). Las concentraciones urinarias de sFlt-1 no se vieron influidas por el embarazo per se (NP-CTR frente a P-CTR, $p > 0,05$) (Figura 11B). Sin embargo, los sujetos con mPE tuvieron niveles urinarios de sFlt-1 significativamente mayores en comparación con el grupo de P-CTR (ANOVA de Kruskal-

Wallis, $p = 0,007$). Las concentraciones urinarias de sFlt-1 variaron con el grado de gravedad de la enfermedad (sPE frente a mPE, $p < 0,05$). No hubo ninguna correlación significativa entre albuminuria y niveles urinarios de sFlt-1 en el grupo de sPE ($r = 0,324$, $p = 0,873$). No hubo ninguna correlación significativa entre proteinuria y concentración urinaria de sFlt-1 para los grupos de mPE ($r = 0,137$, $p = 0,628$) o sPE ($r = 0,336$, $p = 0,087$). En resumen, las mujeres preeclámpsicas tuvieron concentraciones séricas y urinarias de sFlt-1 significativamente elevadas. Este trastorno varía con la gravedad de los trastornos hipertensivos.

Niveles de PIGF de suero-orina

La concentración sérica y de orina de PIGF fue significativamente elevada durante el embarazo normal (ANOVA de Kruskal-Wallis, P-CTR frente a NP-CTR, $p < 0,05$) (Figura 12A y 12B). Además, las mujeres con sPE y mPE tuvieron niveles séricos de PIGF cinco veces menores en comparación con P-CTR (sPE frente a P-CTR, $p < 0,05$) (mPE frente a P-CTR, $p < 0,05$). Las mujeres con sPE tuvieron niveles séricos de PIGF significativamente menores en comparación con mPE (sPE frente a mPE, $p < 0,05$) (Figura 12A). Igualmente, esta relación se mantuvo con respecto a las concentraciones urinarias de PIGF (sPE frente a P-CTR, $p = 0,004$). No hubo diferencias significativas en la concentración urinaria de PIGF entre mujeres preeclámpsicas (sPE frente a mPE, $p = 0,733$). No hubo ninguna correlación significativa entre albuminuria y niveles urinarios de PIGF para el grupo de sPE ($r = -0,091$, $p = 0,653$). Hubo una correlación inversa y significativa entre proteinuria y concentración urinaria de PIGF en sPE ($r = -0,6$ de Pearson, $p = 0,002$). En resumen, las mujeres con sPE tuvieron niveles séricos de PIGF significativamente menores en comparación con las mujeres con mPE y P-CTR. Los niveles urinarios de PIGF también fueron menores en mujeres preeclámpsicas, y no variaron con la gravedad de la enfermedad hipertensiva.

Excreciones fraccionadas de factores angiogénicos, albúmina y proteínas

Para evaluar si el daño glomerular que se produce en mujeres con preeclampsia grave da cuenta de la liberación incrementada de marcadores angiogénicos en una muestra de orina, se analizó la excreción fraccionada de cada uno de los marcadores angiogénicos identificados en relación con albuminuria, proteinuria no específica que refleja con probabilidad elevada alteración de la capacidad de filtración glomerular del riñón. Para cada uno de los grupos de estudio, también se llevaron a cabo análisis de correlación entre la excreción fraccionada de marcadores angiogénicos y la relación de proteína total a creatinina aleatoria en orina. La excreción fraccionada de una sustancia representa la proporción de la sustancia excretada en la orina en comparación con aquella filtrada por los glomérulos. Generalmente se da con relación al aclaramiento de creatinina, puesto que la creatinina ni se reabsorbe ni se segrega significativamente, y de este modo se neutralizan cualesquiera efectos de la concentración/dilución de la orina. Las mujeres embarazadas sanas excretan significativamente más VEGF en comparación con NP-CTR (ANOVA $p < 0,001$) (Figura 9). pHTN no impactó sobre la excreción fraccionada de VEGF en comparación con P-CTR ($p = 0,346$). Sin embargo, sPE incrementó la excreción fraccionada de VEGF significativamente en comparación con mujeres pHTN ($p = 0,007$) o P-CTR ($p < 0,001$).

El embarazo se caracteriza por una disminución notable en la excreción fraccionada de sFlt-1 (P-CTR frente a NP-CTR, $p < 0,001$). pHTN no impactó sobre la excreción fraccionada de sFlt-1 (P-CTR frente a pHTN, $p = 0,43$), mientras que sPE revertió los cambios inducidos por el embarazo para provocar una excreción fraccionada incrementada de sFlt-1 en comparación con PCTR ($p < 0,001$) y pHTN ($p < 0,001$) (Fig. 4).

La excreción fraccionada de PIGF siguió un modelo similar a aquel de sFlt-1. Las mujeres P-CTR tuvieron una fracción de excreción disminuida de PIGF en comparación con NP-CTR (PCTR frente a NP-CTR, $p < 0,001$). De forma similar, pHTN no impacta adicionalmente sobre la fracción de excreción de PIGF (P-CTR frente a pHTN, $p = 0,125$), mientras que este efecto se revirtió parcialmente en mujeres con sPE (sPE frente a pHTN, $p < 0,001$).

El embarazo no se caracterizó por un incremento en la excreción fraccionada de albúmina en controles sanas (NP-CTR frente a P-CTR, $p = 0,385$). Sin embargo, hubo un incremento significativo en la excreción fraccionada de albúmina en sPE en comparación con los grupos de pHTN y P-CTR (ANOVA de una vía, $p < 0,001$).

No hubo ningún cambio significativo de la excreción fraccionada de proteínas totales en asociación con embarazo sano (NP-CTR frente a P-CTR, $p > 0,05$) o pHTN (PCTR frente a pHTN $p > 0,05$). En su lugar, el presente análisis demuestra un incremento muy significativo en la excreción fraccionada de proteínas totales en sPE en comparación con mujeres pHTN en el momento de la manifestación clínica de la enfermedad (sPE frente a pHTN $p < 0,001$).

No hubo ninguna correlación significativa entre la excreción fraccionada de albúmina y aquella de cualquiera de los factores angiogénicos, con la excepción de mujeres que sufren la enfermedad pHTN, y sólo para el sFlt-1 ($r = 0,639$, $p = 0,01$) y PIGF ($r = 0,687$, $p = 0,004$).

No hubo ninguna correlación entre proteinuria y la excreción fraccionada de cualquiera de los factores angiogénicos examinados en mujeres NP-CTR (Pearson, VEGF [$r = 0,33$, $p = 0,382$], sFlt-1 [$r = 0,40$, $p = 0,296$], PIGF [$r = 0,59$, $p = 0,09$]). Se identificó una correlación significativa entre proteinuria y excreción fraccionada de sFlt-1 en mujeres P-CTR (sFlt-1 [$r = 0,59$, $p = 0,03$]). La excreción fraccionada de PIGF y sFlt-1 no se correlacionó con proteinuria en mujeres P-CTR sanas ($p > 0,05$). Sin embargo, no hubo ninguna correlación entre proteinuria y excreción

fraccionada de cualquiera de los factores angiogénicos en mujeres pHTN: VEGF ($r = 0,42$, $p = 0,118$), sFlt-1 ($r = 0,23$, $p = 0,414$), o PIGF ($r = 0,34$, $p = 0,214$). En sPE, no hubo ninguna correlación entre proteinuria y excreción fraccionada de VEGF ($r = 0,30$, $p = 0,127$) o sFlt-1 ($r = 0,35$, $p = 0,07$). Por el contrario, hubo una correlación significativa entre proteinuria y excreción fraccionada de PIGF ($r = 0,50$, $p = 0,01$). Adicionalmente, en mujeres con sPE, hubo una correlación significativa entre la relación de proteína total/creatinina aleatoria urinaria y la excreción fraccionada de PIGF ($r = 0,60$, $p = 0,002$) o sFlt-1 (sFlt-1: $r = 0,50$, $p = 0,007$).

Se observó que los niveles séricos de VEGF y PIGF son significativamente inferiores en sPE en comparación con controles embarazados sanos, mientras que sFlt-1 es significativamente mayor. A diferencia de sFlt-1 y PIGF, las concentraciones urinarias de VEGF siguen siendo significativamente mayores que su nivel sérico en todos los grupos de estudio. Sin embargo, incluso cuando se da cuenta del grado de proteinuria como un reflejo de la integridad glomerular alterada, se encontró que sPE está asociada con excreción fraccionada incrementada de VEGF y sFlt-1. Por el contrario, PIGF (una proteína de peso molecular mucho menor), previamente propuesto como un marcador para preeclampsia, se correlacionó con proteinuria y la relación de proteína total/creatinina aleatoria en orina. sPE se distingue como una entidad clínica hipertensiva divergente basándose en el presente hallazgo de que los niveles séricos y urinarios para todos los factores angiogénicos varían con la gravedad de la enfermedad hipertensiva. No obstante, el cambio en las concentraciones sérica y de orina no se produce paralelamente.

Se determinó además que las mujeres con sPE tienen niveles séricos disminuidos de VEGF libre, pero un incremento excepcional en su diuresis. Los niveles séricos disminuidos se pueden explicar vía su unión sustancial a proteínas plasmáticas, tales como sFlt-1. Como consecuencia, VEGF puede no ser detectado por el ELISA altamente específico, que sólo detecta la forma libre. Se concluye que el incremento dramático en los niveles urinarios y excreción fraccionada es probablemente más el resultado de la producción renal intrínseca y menos probablemente debido a pérdida glomerular (26). El hallazgo expuesto aquí de que el incremento drástico en los niveles urinarios de VEGF es independiente de proteinuria y niveles séricos de VEGF apoya adicionalmente esta teoría. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales los riñones potencian la producción de VEGF son actualmente desconocidos, y esto requiere una investigación posterior.

En resumen, sPE se caracteriza por un incremento drástico en la excreción fraccionada de VEGF y sFlt-1. La magnitud de tales incrementos no se correlaciona con el grado de proteinuria como se refleja por la excreción fraccionada de proteínas totales, albuminuria o la relación de proteína total a creatinina aleatoria de orina. Esto demuestra que los niveles séricos alterados y el daño glomerular no son el único mecanismo responsable de la producción incrementada de factores angiogénicos urinarios en preeclampsia.

Referencias

1. Roberts JM, Cooper DW. Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *Lancet*. 2001; 357(9249): 53-56.
2. MacKay AP, Berg CJ, Attrash HK. Pregnancy-related mortality from preeclampsia and eclampsia. *Obstet Gynecol*. 2001 ;97:533-38.
3. Buhimschi IA, Saade GR, Chwalisz K, Garfield RE. The nitric oxide pathway in pre-eclampsia: pathophysiological implications. *Hum Reprod Update* 1998;4:25-42.
4. Ward K, Hata A, Jeunemaitre X, Helin C, Nelson L, Namikawa C, Farrington PF, et al.. A molecular variant of angiotensinogen associated with preeclampsia. *Nat Genet* 1993;4:59.
5. Wallukat G, Homuth V, Fischer T, Horstkamp B, Jupner A, Baur E, Nissen E, Vetter K, Dudenhausen JW, Haller H, Luft FC. Patients with preeclampsia develop agonistic antibodies against the angiotensin AT 1 receptor. *J Clin Invest* 1999; 103:945-952.
6. Fass MM, Schinling GA, Baller JFW, Visscher CA, Bakker WW. A new animal model for human preeclampsia: ultra-low dose of endotoxin infusion in pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171: 158-64.
7. Roberts JM, Redman CW. Preeclampsia: more than pregnancy induced hypertension. *Lancet* 1993; 341: 1447-51.
8. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 2003; 111:649-58.
9. Volhard F: Die doppelseitigen haematogenen Nierenerkrankungen Beril, Springer. 1918.
10. Buhimschi IA, Saade GR, Chwalisz K, Garfield RE. The nitric oxide pathway in pre-eclampsia: pathophysiological implications. *Hum Reprod Update*. 1998;4:25-42.
11. Takacs P, Kauma SW, Sholley MM, Walsh SW, Dinsmoor MJ, Green K. Increased circulating lipid peroxides in

- severe preeclampsia activate NF-kap- paB and upregulate ICAM-1 in vascular endothelial cells. *FASEB J.* 2001;15:279-81.
12. Lockwood CJ, Peters JH. Increased plasma levels of ED1+ cellular fibronectin precede the clinical signs of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1990; 162:358-62.
- 5 13. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 2004;12; 350:672-83.
14. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 2003; 111:649-58.
- 10 15. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 2004; 12; 350: 672-83.
16. 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: 770-5.
- 15 17. Sugimoto H, Hamano Y, Charytan D, Cosgrove D, Kieran M, Sudhakar A, et al. Neutralization of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) by anti-VEGF antibodies and soluble VEGF receptor 1 (sFlt-1) induces proteinuria. *J Biol Chem* 2003; 278:12605-8.
18. American Collage of Obstetricians and Gynecologists. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Practice Bulletin. Washington, DC: ACOG Practice Bulletin No. 33, 2002.
- 20 19. Caron C, Goudemand J, Marey A, Beague D, Ducroux G, Drouvin F. Are haemostatic and fibrinolytic parameters predictors of preeclampsia in pregnancy-associated hypertension? *Thromb Haemost* 1991;66:410-14.
20. Spargo B, McCartney CP, Winemiller R. Glomerular capillary endotheliosis in toxemia of pregnancy. *Arch Pathol* 1959: 68:593-9.
- 25 21. Zhou Y, McMaster M, Woo K, Janatpour M, Perry J, Karpanen T, Alitalo K, Damsky C, Fisher SJ. Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *Am J Pathol* 2002; 160:1405-23.
22. Rodgers GM, Taylor RN, Roberts JM. Preeclampsia is associated with a serum factor cytotoxic to human endothelial cells. *Am J Obstet Gynecol* 1988;159:908-14.
- 30 23. Ahmed A, Dunk C, Ahmad S, Khaliq A. Regulation of placental vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PlGF) and soluble Flt-1 by oxygen- a review. *Placenta* 2000;21: S16-24.
24. American Collage of Obstetricians and Gynecologists. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Practice Bulletin. Washington, DC: ACOG Practice Bulletin No. 33, 2002.
- 35 25. Rodriguez-Thompson D, Lieberman. Use of a random urinary protein to creatinine ratio for the diagnosis of significant proteinuria during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2001 ;185:808-11.
26. Roes EM, Steegers EA, Thomas CM, Geurts- Moespot A, Raijmakers MT, Peters WH, Sweep CG. High levels of urinary vascular endothelial growth factor in women with severe preeclampsia, *Int J Biol Markers* 2004;19:72-5.

REIVINDICACIONES

1. Un método para diagnosticar que una mujer embarazada tiene, o es susceptible de desarrollar, un trastorno hipertensivo, que comprende medir los niveles de tirosina cinasa 1 similar a fms soluble (sFlt-1) en una muestra de orina obtenida de la mujer embarazada, en el que un nivel de sFlt-1 mayor que 9,5 picogramos por miligramo de creatinina urinaria es un indicador diagnóstico de preeclampsia, y en el que un nivel de sFlt-1 mayor que 40 picogramos por miligramo de creatinina urinaria es un indicador diagnóstico de preeclampsia grave.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra de orina se trata con un agente estabilizante antes de medir los niveles de sFlt-1.
3. El método de la reivindicación 2, en el que el agente estabilizante es un inhibidor de proteasas.
4. El método de la reivindicación 3, en el que el inhibidor de proteasas es uno cualquiera de los siguientes, o una combinación de los mismos: AEBSF, Pefabloc SC, fluoruro de 4-(2-aminoetil)bencenosulfonilo, antipaína, hidrocloreuro de antipaína, aprotinina, benzamidina, hidrocloreuro de benzamidina, bestatina, quimostatina, E-64, L-trans-epoxisuccinil-leucinamida-(4-guanido)-butano, N-[N-(L-trans-carboxioxiran-2-carbonil)-L-leucil]-agmatina, ácido etilendiaminotetraacético y su sal sódica, leupeptina, N-etilmaleimida, pepstatina, pepstatina A, fosforamidón, azida sódica, inhibidor de tripsina y ácido ϵ -aminocaproico.
5. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que la medición se lleva a cabo usando un ensayo inmunológico.
6. El método de la reivindicación 5, en el que el ensayo inmunológico es un ELISA.

	P-CTR (n=16)	pHTN (n=21)	sPE (n=17)	Valor de p
Características maternas				
Edad: años, <i>media [95%CI]</i>	26,4 [23,7-29,1]	29,8 [27,2-32,3]	24,4 [21,6-27,2]	p=0,021 †
Gravidez: <i>mediana [intervalo]</i>	2 [1-6]	2 [1-8]	1 [1-7]	p=0,063
Número de partos: <i>mediana [intervalo]</i>	1 [0-3]	0 [0-5]	0 [0-4]	p=0,250 ‡
Peso materno: kg, <i>media [95%CI]</i>	81,8 [74,0-89,6]	100 [84,7-115,3]	88,8 [74,8-101,6]	p=0,166 †
Edad gestacional: <i>semanas, mediana [intervalo] reclutamiento</i>	28,6 [7,0-39,0]	34,4 [16,6-40,4]	31,3 [24,1-40,2]	p=0,304 ‡
Edad gestacional: <i>semanas, mediana [intervalo] parto</i>	38,5 [37,4-39,6]	34,4 [32,4-36,6]	32 [29,5-1-34,4]	p=0,003 ‡
Características fetales				
Peso del nacido: g, <i>media [95%CI]</i>	3355 [3093-3617]	2105 [1593-2617]	1622 [1095-2150]	p=0,001 †
Manifestaciones clínicas				
TA sistólica: mmHg, <i>media [95%CI]</i>	105,5 [99,1-111,9]	160,0 [149,7-170,4]	162,4 [155,7-169,2]	p<0,001 †
TA diastólica: mmHg, <i>media [95%CI]</i>	64,4 [58,9-70,0]	94,6 [89,0-100,3]	101,5 [94,4-108,6]	p<0,001 †
Síntomas neurológicos n [%]	0,0 [0,0]	3,0 [14,3]	7,0 [41,2]	p=0,0081 ¶

El dato se analizó mediante ANOVA de una vía (†), ANOVA de Kruskal-Wallis (‡), Chi cuadrado (¶)

Figura 1

	pHTN (n=21)	sPE (n=17)	Valor de p
Ensayos clínicos de laboratorio			
Proteinuria en tira reactiva: mediana [intervalo]	1,5 [0-4]	3 [1-4]	p<0,001 \$
Proteinuria 24-h: g/dl, mediana [intervalo]	0,9 [0,1-13,1]	3,0 [0,7-5,4]	p=0,109 \$
AST:U/l mediana [intervalo]	20,0 [8,0-59,0]	26,0 [5,0-1380,0]	p=0,166 \$
ALT:U/l mediana [intervalo]	14,0 [4,0-32,0]	25,0 [9,0-550,0]	p=0,010 \$
plaquetas: células/uix10 ³ media [95%CI]	263,3 [221,5-305,1]	194,3 [149,2-239,4]	p=0,035 ¥
LDH: U/l mediana [intervalo]	204,0 [153,0-366,0]	245,0 [184,0-2940,0]	p=0,015 \$
Ácido úrico: mg/dl, mediana [intervalo]	5,8 [5,1-6,4]	6,7 [6,2-7,3]	p=0,025 \$

El dato se analizó mediante la prueba de Mann-Whitney (\$), prueba de la t de Student (¥)

Figura 2

	NP-CTR (n=14)	P-CTR (n=16)	pHTN (n=21)	sPE (n=17)	Valor de p
VEGF: pg/mgc <i>mediana [intervalo]</i>	93,5 [21,2-258,6]	152,0 [26,8-488,3]	140,6 [42,3-483,5]	214,8 [17,1-817,6]	p=0,019 ‡
PLGF: pg/mgc <i>mediana [intervalo]</i>	14,7 [7,3-21,2]	65,7 [8,5-304,1]	22,1 [6,2-255,2]	19,2 [8,0-99,2]	p<0,001 ‡
sFLT: pg/mgc <i>mediana [intervalo]</i>	10,5 [0,4-48,1]	15,6 [0,1-65,8]	56,1 [7,6-453,5]	145,5 [6,4-990,7]	p<0,001 ‡
Proteína: mg/mgc <i>mediana [intervalo]</i>	6,4 [4,3-9,2]	7,3 [2,4-23,4]	7,4 [5,4-32,3]	11,8 [4,3-28,7]	p<0,001 ‡
Creatinina: mg/ml <i>mediana [intervalo]</i>	1,3 [0,3-2,5]	1,0 [0,2-2,8]	0,5 [0,1-2,0]	0,7 [0,1-1,6]	p=0,032 ‡

El dato se analizó mediante ANOVA de Kruskal-Wallis (‡); los valores se dan por mg de creatinina (mgc)

Figura 3

Figura 4B

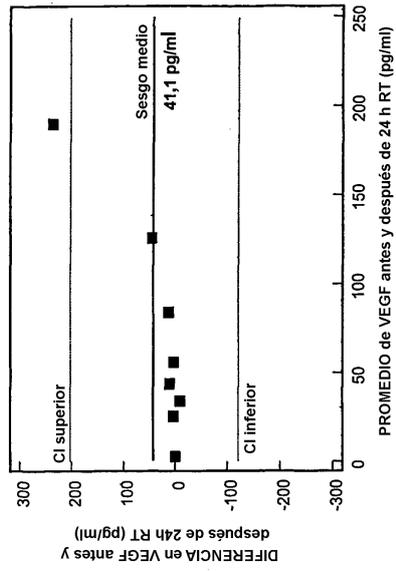


Figura 4D

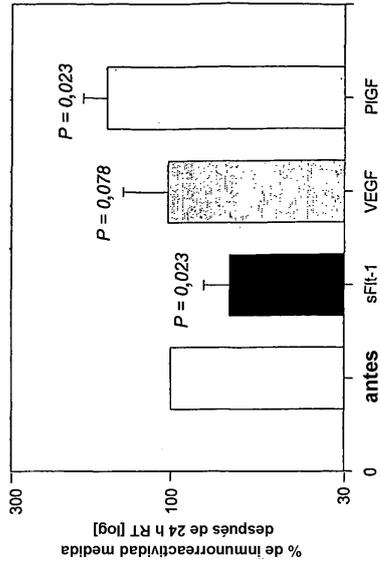


Figura 4A

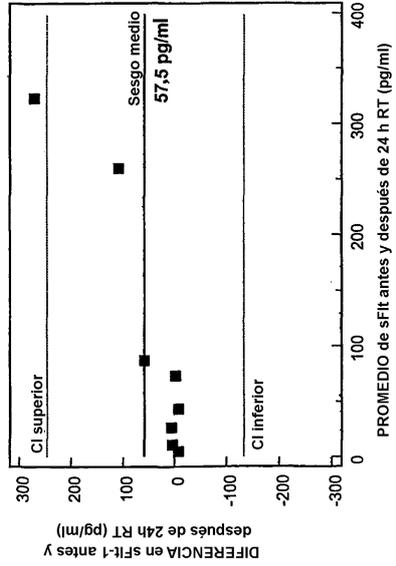


Figura 4C

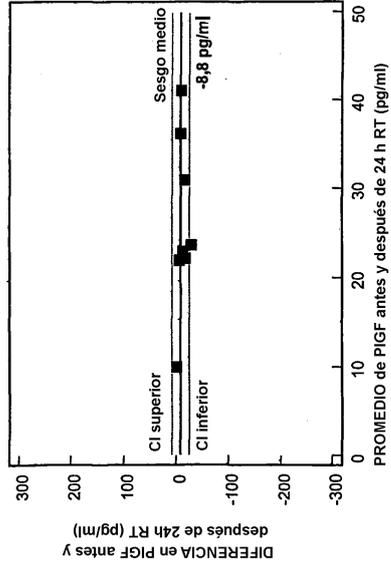


Figura 5B

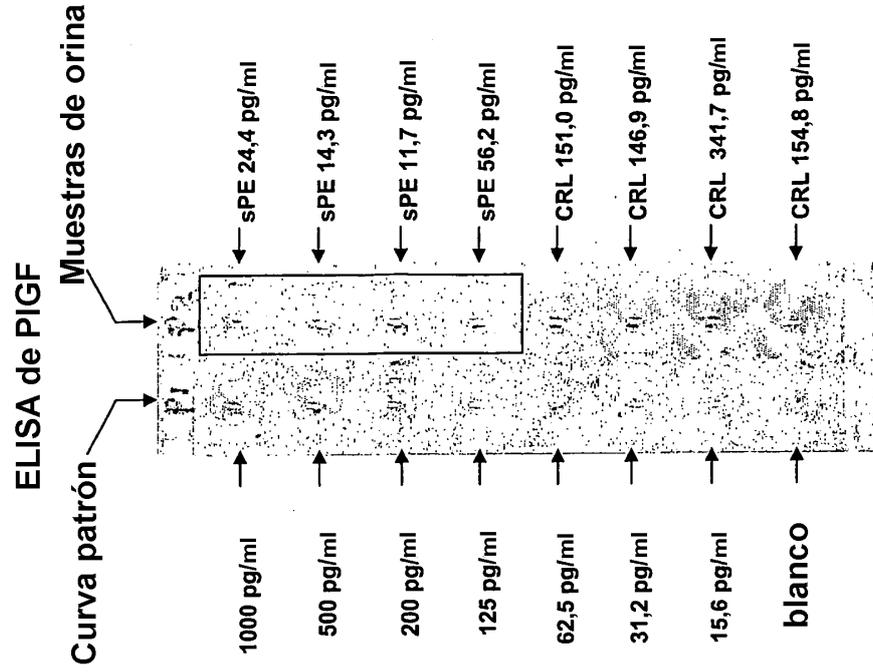
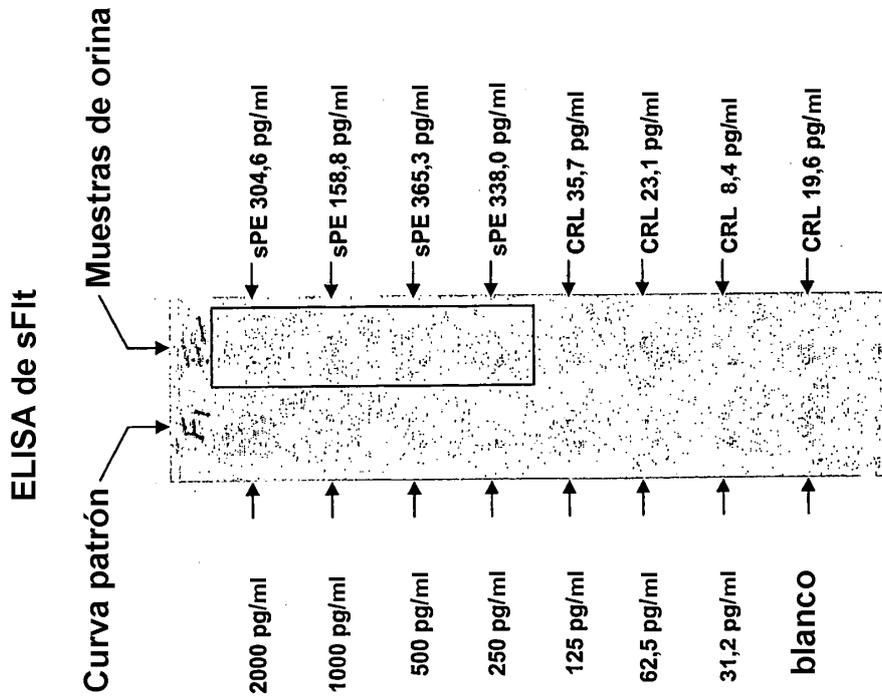


Figura 5A



Experimentos de ELISA representativos para sFit-1 (A) y PIGF (B). Los pocillos de la izquierda muestran las curvas patrón respectivas. Los pocillos a la derecha de cada experimento muestran la inmunorreactividad de 8 muestras de orina. Los cuatro superiores (mostrados en el recuadro) proceden de 4 pacientes diferentes con preeclampsia grave (sPE), mientras que los cuatro inferiores proceden de 4 pacientes embarazadas normales (CRL).

Figura 5C

ID de la muestra	Categoría	valores brutos		log valores		relación sFit-1 a PIGF		uFP	Categoría
		sFit-1	PIGF	log sFit-1	log PIGF	sFit-1/PIGF x 100	log[sFit-1/PIGFx100]		
muestra 01	sPE	304,6	24,4	2,5	1,4	1248,4	3,1	sPE	
muestra 02	sPE	158,8	14,3	2,2	1,2	1110,5	3,0	sPE	
muestra 03	sPE	365,3	11,7	2,6	1,1	3122,2	3,5	sPE	
muestra 04	sPE	338,0	56,2	2,5	1,7	601,4	2,8	sPE	
muestra 05	P-CRL	35,7	151,0	1,6	2,2	23,6	1,4	P-CRL	
muestra 06	P-CRL	23,1	146,9	1,4	2,2	15,7	1,2	P-CRL	
muestra 07	P-CRL	8,4	341,7	0,9	2,5	2,5	0,4	P-CRL	
muestra 08	P-CRL	19,6	154,8	1,3	2,2	12,7	1,1	P-CRL	

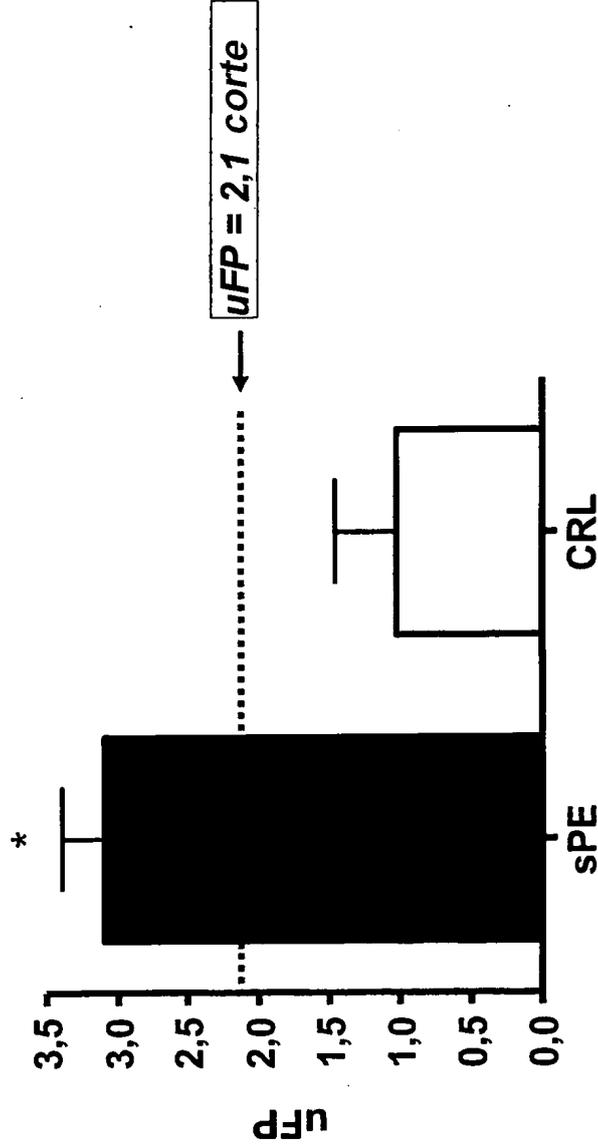


Figura 5D

C: Hoja de análisis representativa usada para el cálculo de uFP a partir del experimento en la diapositiva previa. D: uFP media (+SD) de pacientes con preeclampsia grave (sPE) frente a controles (CRL). El asterisco indica significancia estadística ($p < 0,001$). La línea punteada indica el corte en uFP con valor de diagnóstico para sPE a partir de nuestra publicación [Am J Obstet Gynecol. 2005 Mar; 192(3):734-41].

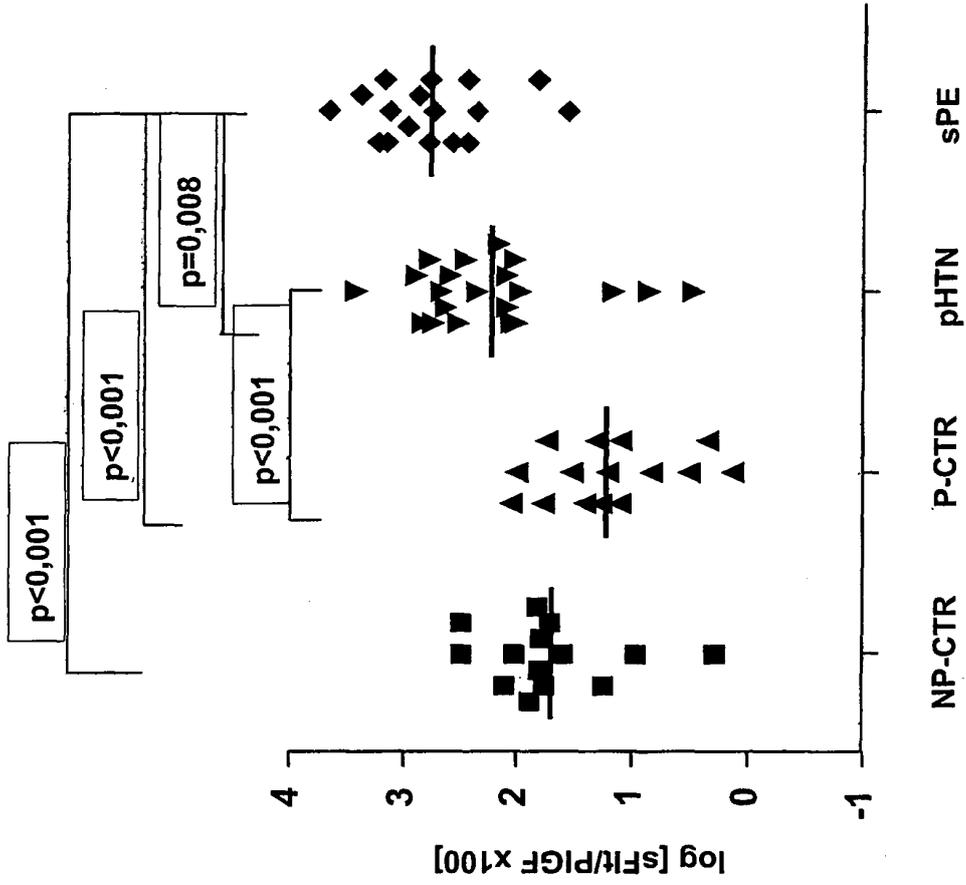


Figura 6

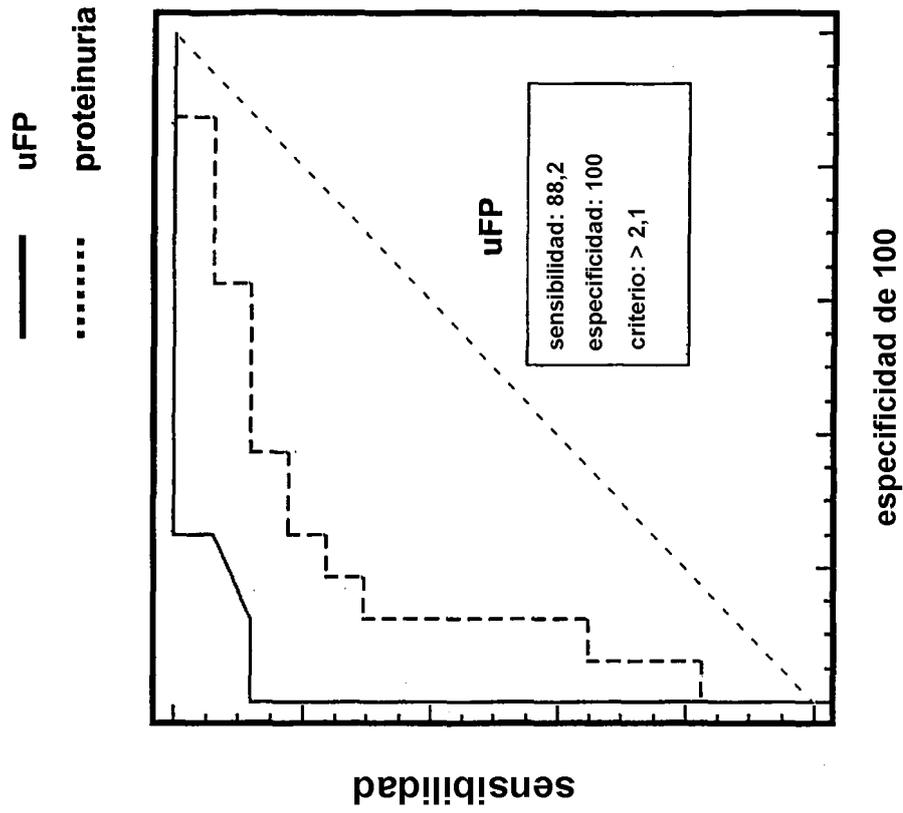


Figura 7

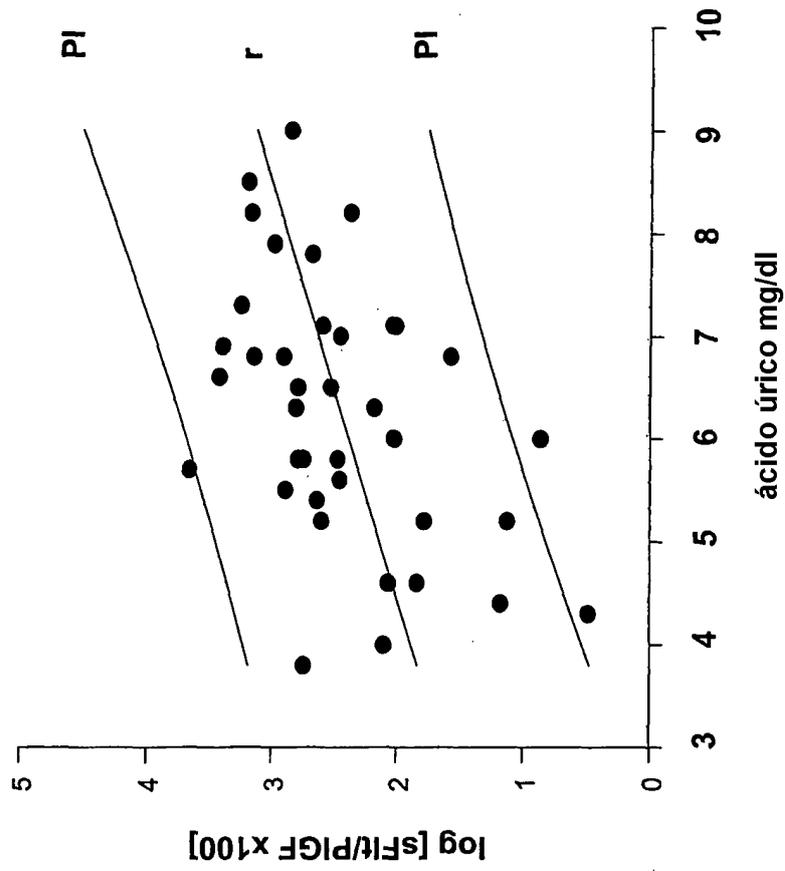


Figura 8

	NP-CTR	P-CTR	mPE	sPE	Valor de p
VEGF					
<u>Sangre (pg/ml)</u>	176,6 [78,7-819,0]	1,6 [0,0-59,8]	0,2 [0,0-123,9]	0,1 [0,0-48,1]	P<0,001 ‡
<u>Orina (pg/mgc)</u>	74,0 [5,4-116,7]	97,6 [21,4-219,3]	45,2 [7,6-231,3]	114,1 [8,2-817,6]	p=0,021 ‡
sFlt-1					
<u>Sangre (pg/ml)</u>	31,8 [20,1-64,9]	433,7 [189,0-1992,2]	1618,0 [539,4-3329,9]	2252,6 [1626,8-3328,2]	p<0,001 ‡
<u>Orina (pg/mgc)</u>	2,4 [0,7-35,4]	1,5 [0,3-17,9]	10,9 [1,6-217,7]	81,7 [12,7-990,7]	p<0,001 ‡
PIGF					
<u>Sangre (pg/ml)</u>	8,3 [5,4-10,0]	330,0 [26,2-933,7]	169,2 [46,4-805,6]	58,5 [4,6-269,8]	P<0,001 ‡
<u>Orina (pg/mgc)</u>	9,9 [4,3-16,8]	55,8 [10,0-476,9]	13,6 [3,9-163,0]	17,3 [7,3-99,2]	p=0,001 ‡
Proteínas					
<u>Sangre (mg/ml)</u>	62,8 [45,0-93,6]	60,8 [52,5-81,3]	55,7 [21,5-91,4]	48,6 [29,7-57,2]	p<0,001 ‡
<u>Relación de proteína/creatinina en orina (mg/mgc)</u>	5,5 [3,9-8,6]	6,8 [4,5-16,3]	5,7 [2,2-24,8]	10,5 [4,0-38,5]	p=0,007 ‡
Albumina					
<u>Sangre (mg/ml)</u>	23,0 ± 1,5	23,1 ± 1,5	30,8 ± 5,71	19,5 ± 1,4	p=0,235 ‡
<u>Orina (µg/mgc)</u>	2,8 [1,3-7,2]	5,6 [1,7-21,5]	37,4 [7,8-503,6]	173,5 [52,1-3069,0]	p<0,001 ‡
Creatinina					
<u>Sangre (mg/dl)</u>	0,81 ± 0,1	0,59 ± 0,1	0,66 ± 0,1	0,80 ± 0,1	p=0,013 ‡
<u>Orina (mg/dl)</u>	121,5 ± 26,1	120,3 ± 11,3	136,5 ± 24,8	103,9 ± 15,7	p=0,634 ‡

El dato se analizó mediante ANOVA de una vía (†), ANOVA de Kruskal-Wallis (‡)

Figura 9

Figura 10B

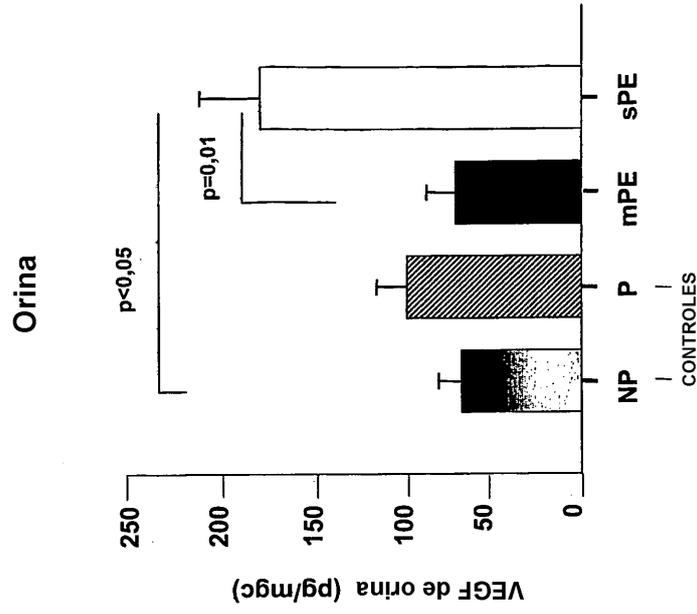


Figura 10A

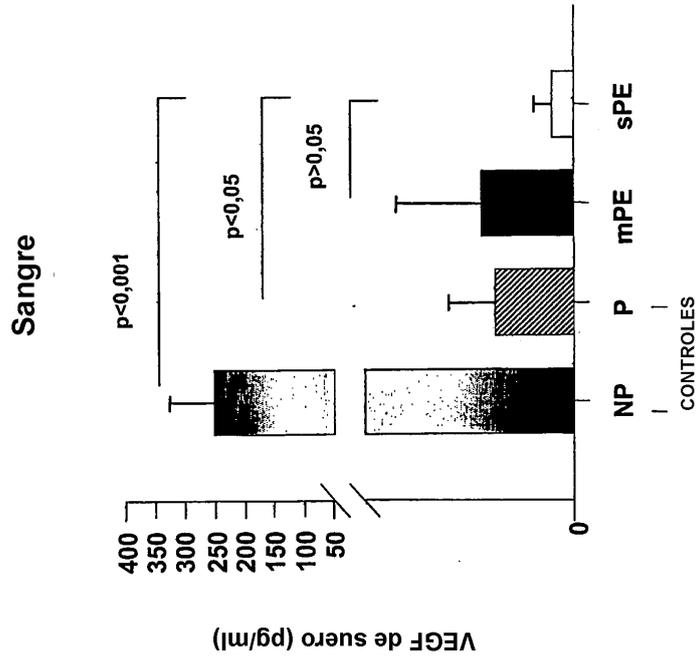


Figura 11B

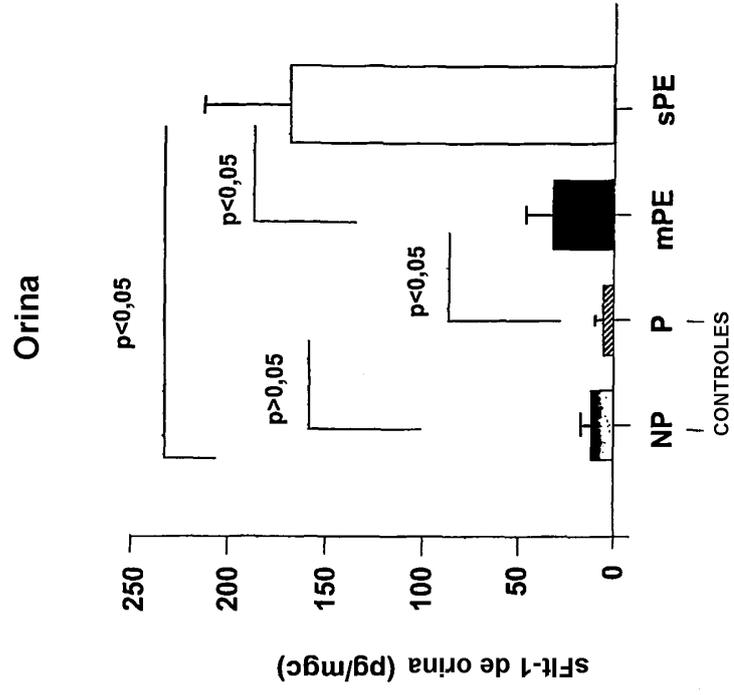


Figura 11A

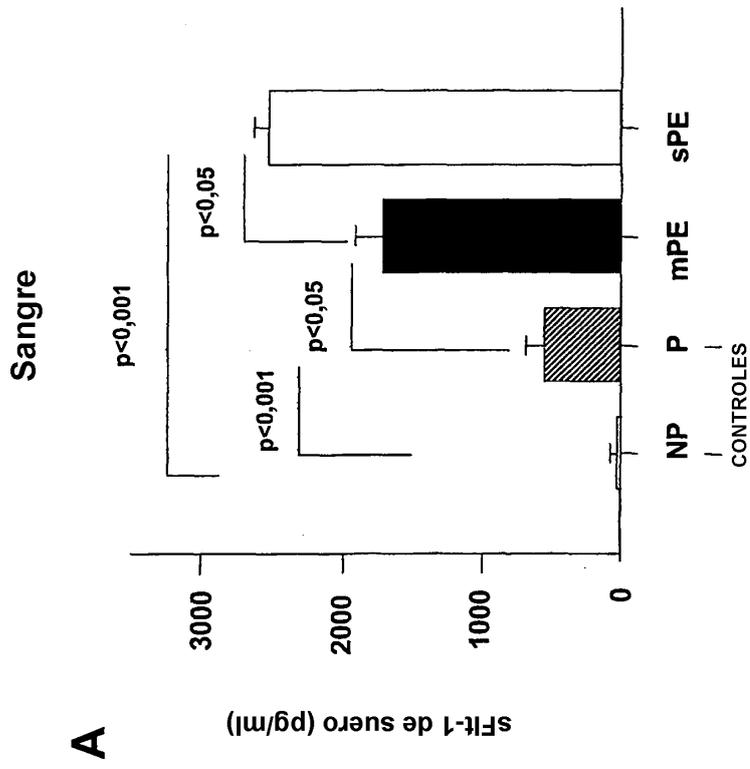


Figura 12A

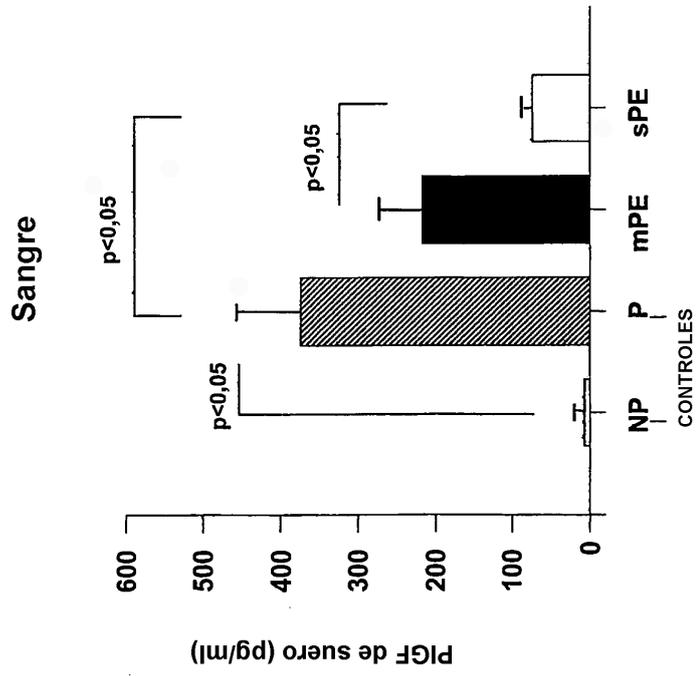
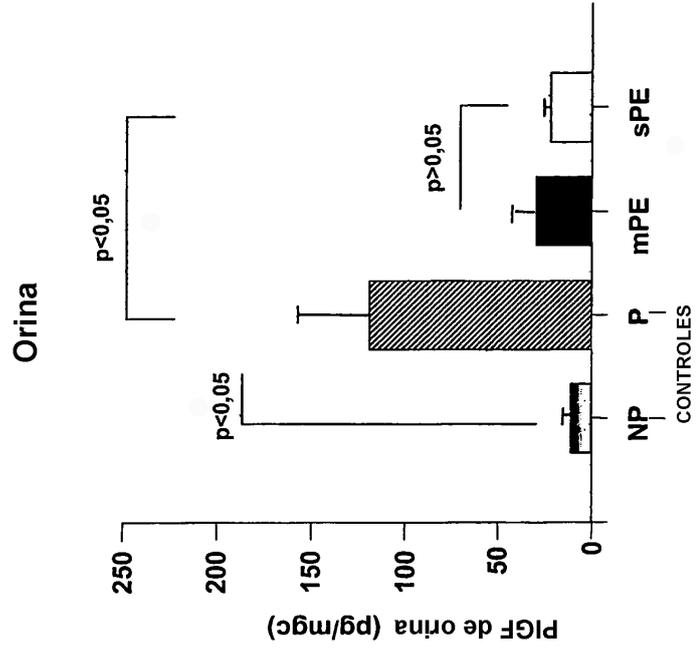


Figura 12B



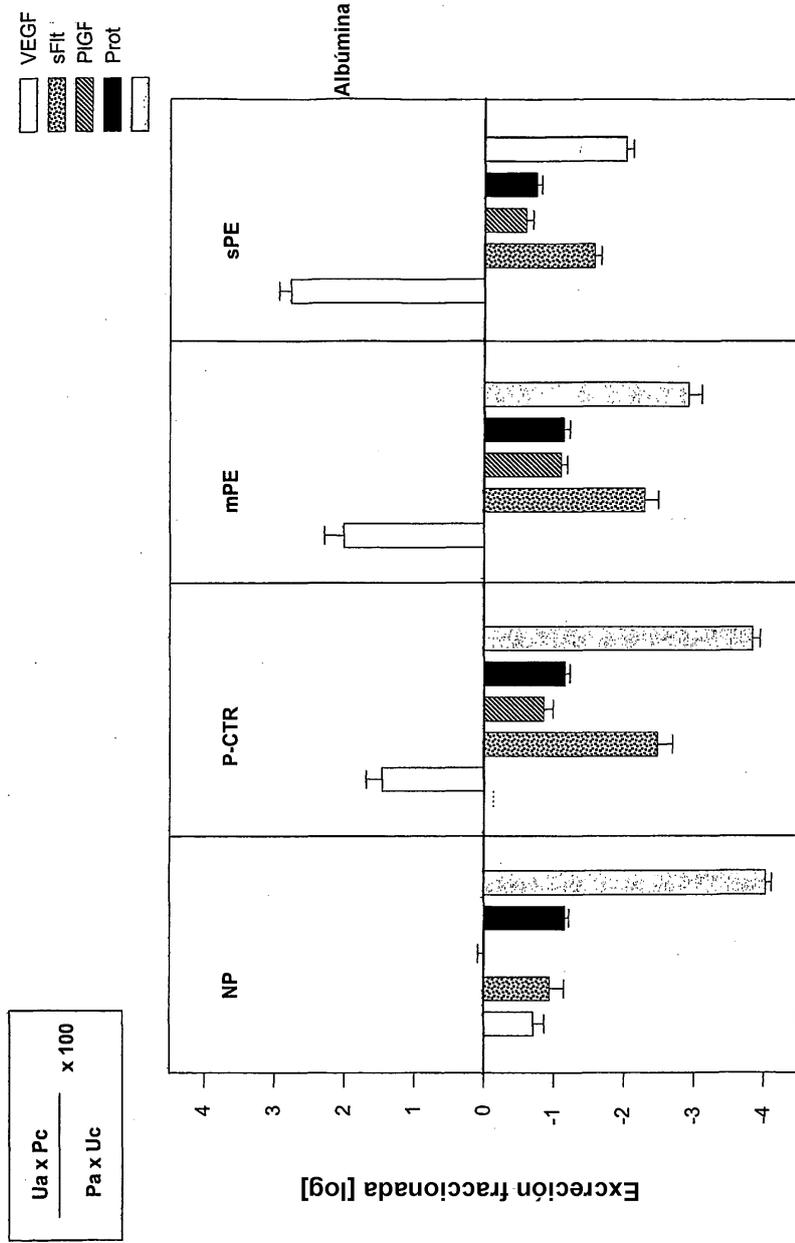


Figura 13