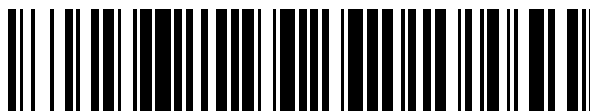


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 309**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2004** **E 04736663 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **15.03.2006** **EP 1634082**

54 Título: **Diagnóstico de preeclampsia**

30 Prioridad:

16.06.2003 GB 0313828

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

30.01.2013

73 Titular/es:

CYBERMED (U.K.) LIMITED (100.0%)
18 Hartford Close, Harborne
Birmingham B17 8AU, GB

72 Inventor/es:

OWEN-SMITH, BRIAN DAVID OWEN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 394 309 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 preeclampsia

5 Esta invención se refiere a la detección de preeclampsia. En particular, se refiere al diagnóstico de preeclampsia mediante la detección de niveles elevados de urato, la sal sódica del ácido úrico, 2,6,8, trioxipurina, en un líquido biológico, la saliva.

10 La invención es un método de uso de la mayor sensibilidad inherente a la concentración de urato en la saliva, en comparación con la sanguínea, y depende del urato como un compuesto metabólico con un comportamiento único y predecible.

15 La preeclampsia se produce en aproximadamente 2 a 4% de las mujeres embarazadas y es una causa frecuente de morbilidad materna y fetal. En casos graves, es necesario el parto prematuro y por lo tanto existe el riesgo de que el niño nazca minúsculo.

20 La preeclampsia (toxemia del embarazo, toxemia preeclámpsica) conocida de otro modo como "hipertensión proteinúrica gestacional" (HPG) es una enfermedad multisistémica del embarazo de causa desconocida. El síndrome materno se caracteriza por varias anomalías: aumento de la presión arterial, edema, proteinuria y anomalías en la coagulación y en la función hepática y renal. Esto puede derivar en insuficiencia multisistémica, hemorragia intracraneal y convulsiones. Se cree que la causa de la preeclampsia se encuentra en la placenta y existe evidencia de un factor "tóxico" circulando en las células endoteliales.

25 El estrés oxidativo se considera esencial para el desarrollo de la preeclampsia y se asocia a mala perfusión placentaria. Una concentración sanguínea de urato elevada, un marcador del estrés oxidativo, se asocia con la gravedad de la preeclampsia y el desenlace clínico del feto (Many et al, 1996). El urato sanguíneo también es un predictor de la preeclampsia (Chappell et al 2002).

30 Los síntomas de la preeclampsia se pueden detectar generalmente desde alrededor de las 28 semanas hasta el término, y habitualmente no son evidentes antes de las 24 semanas. Las pruebas convencionales, como las divulgadas en el estado anterior de la técnica EP 0927355B1 son para detectar insuficiencia renal por medición de urea en sangre o proteína en orina, y aumento de la presión arterial materna.

35 El estado anterior de la técnica, sin embargo, falla en varios aspectos importantes, las pruebas sanguíneas son lentas, necesitan un operador experimentado, pueden causar molestias físicas y psicológicas y podrían provocar lesiones peligrosas por el pinchazo de la aguja como hepatitis infecciosa o SIDA. Las muestras de sangre también requieren técnicas de almacenamiento especializadas para detener la descomposición.

40 Por lo tanto, lo que se necesita es un método para la identificación de las mujeres embarazadas que tienen riesgo de sufrir, o que sufren de, preeclampsia con una prueba bioquímica para detectar el estrés oxidativo, que sea muy sensible, económica, no invasiva, y simple y rápida de realizar de forma rutinaria o en emergencia, y que sea más segura, más fácil, más rápida y más barata que la extracción de sangre.

45 Una prueba de urato es ideal, puesto que es un antioxidante poderoso y un marcador del estrés oxidativo. Además, es probable que el cambio bioquímico ocurra antes que el daño tisular irreversible. La concentración sanguínea de urato es sin embargo un mal discriminador de la preeclampsia, porque también aumenta en el embarazo normal.

50 No obstante, el urato sanguíneo es resultado de la producción endógena de urato, la dieta, la excreción renal y la excreción gastrointestinal. En el intestino, el urato sufre degradación bacteriana (uricolisis entérica) (Sorensen, 1960) y está sujeto a variabilidad diurna (Owen-Smith et al, 1981, Figura 1). Por la noche, la excreción de ácido úrico en la orina se reduce, en tanto aumenta la eliminación intestinal. Se ha demostrado que las concentraciones sanguíneas de urato también presentan variación diurna (Kanabrocki et al, 2000, Figura 2) en menor grado. La variación diurna parece deberse principalmente al acto de dormir (Owen-Smith, 1983, Figura 3). El resultado neto de esos cambios es la estabilidad relativa del urato sanguíneo de forma que con una sobreproducción de urato celular, el aumento de la concentración sanguínea se retrase.

60 El urato es una molécula pequeña y ampliamente difundida en el líquido extracelular, incluida la saliva. El urato salival no se reabsorbe (como en el riñón) sino que se traga y es degradado por las bacterias en el intestino. Por lo tanto, en la saliva se detectan cambios rápidos o incrementos súbitos en la producción de urato, sin cambios significativos en la concentración sanguínea de urato.

Se demostró que la concentración de urato en la saliva es un indicador más sensible del metabolismo celular de urato que el que se encuentra en la sangre. Esto se estableció en pacientes que sufren de gota, antes y después del tratamiento con alopurinol (que previene la formación de urato) y en sujetos normales practicando ejercicio o que

proporcionan muestras de día y de noche (para evaluar la variabilidad diurna en la excreción) (Owen-Smith et al, 1998).

Además, una paciente con preeclampsia proporcionó muestras de urato sanguíneo y salival en los días anteriores y posteriores al parto (Figura 4). Ambos conjuntos de muestras tuvieron valores considerablemente elevados en comparación con mujeres no embarazadas normales y un embarazo de 28 semanas. Los niveles salivales en preeclampsia mostraron una buena correlación con los niveles sanguíneos. El aumento en la concentración salival entre las 28 semanas de embarazo y el parto fue de 180 $\mu\text{mol/l}$.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para el diagnóstico de preeclampsia, que comprende medir el urato en una muestra biológica. Los valores obtenidos midiendo los niveles de urato en mujeres embarazadas se pueden comparar con los valores normales que resultan de la medición de los niveles de urato en muestras biológicas obtenidas de mujeres embarazadas de edad gestacional similar que no presentaron preeclampsia.

La muestra puede ser de sangre entera o plasma que también puede contener un anticoagulante. Sin embargo, en un aspecto preferido de la invención, la muestra se toma de la saliva materna. El urato de la saliva materna no ha sido utilizado previamente para el diagnóstico de preeclampsia en el embarazo. Debido a la variación diurna en los niveles de urato salival, con el fin de controlar los cambios en los niveles de urato durante el embarazo, la muestra se debe recoger preferentemente a la misma hora del día.

La muestra de saliva se puede recoger de cualquier manera adecuada. Por ejemplo, se puede recoger una muestra de saliva directamente en un tubo. Alternativamente se puede recoger la muestra en un tubo que tenga un recipiente insertado que contenga un hisopo de algodón y una perforación en su base. El hisopo de algodón se humedece debajo de la lengua y luego se mastica durante unos 45 segundos para que absorba la saliva. Luego la muestra recogida se refrigera por debajo de 10 °C, preferentemente a 4 °C hasta que pueda ser transportada a un laboratorio para su procesamiento. Después el tubo se puede centrifugar, por ejemplo a 3000 revoluciones durante 5 minutos, para que esté listo para el ensayo.

Los niveles de urato en la muestra biológica se pueden medir utilizando cualquier prueba o ensayo biológico adecuados, incluidos una prueba con tira reactiva, el método de punto final cronometrado o por medio del método de prueba en seco.

La prueba de la tira reactiva comprende utilizar una tira reactiva farmacéutica estándar para análisis biológicos, que tiene áreas recubiertas con reactivos que cambian de color cuando se detecta urato. Los reactivos utilizados son los específicos para detectar urato en la saliva y los valores obtenidos se pueden comparar contra una carta de colores normalizados.

Se puede usar un reactivo de ácido úrico para medir la concentración de ácido úrico por el método del punto final cronometrado. El ácido úrico es oxidado por la uricasa para producir alantoína y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno reacciona con 4-aminoantipirina (4-AAP) y 3,5-dicloro-2-hidroxibenceno sulfonato (DCHBS) en una reacción catalizada por la peroxidasa para dar un producto coloreado.

Para analizar la muestra se puede utilizar un medidor múltiple comercial, el calibrador SYNCHRON CX Systems MULTI Calibrator en el que la muestra es su propio reactivo. Después se puede monitorear el cambio en la absorbancia a 920 nanómetros. Este cambio en la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de ácido úrico en la muestra y es utilizado por el SYNCHRON CX System para calcular y expresar la concentración de ácido úrico. Este método de ensayo proporciona un nivel de precisión de $\pm 5\%$ y permite la interpretación dentro de un conjunto de valores entre 30 $\mu\text{mol/l}$ y 1000 $\mu\text{mol/l}$.

También se puede usar un método de prueba en seco para analizar los niveles de urato en la muestra de saliva. En este método se puede usar un ensayo con una película química multicapa seca. Los reactivos secos reaccionan con la muestra para generar un producto coloreado que aparece en unos pocos minutos. La muestra de saliva se distribuye uniformemente esparciéndose y difundiéndose en la capa de reactivo en la que el urato es hidrolizado por la uricasa para generar peróxido de hidrógeno. Se puede usar colorante leuco, que cambia a color azul por oxidación de peróxido de hidrógeno en presencia de peroxidasa, y la intensidad del color de la mancha se puede medir por fotometría de reflectancia. No obstante, también se puede usar otro colorante adecuado.

De conformidad con un segundo aspecto de la invención, se estipula el uso del nivel de urato salival como indicador de preeclampsia.

Se puede utilizar un kit de diagnóstico donde el kit comprende los reactivos para la determinación del nivel de urato en una muestra biológica.

Los reactivos del kit pueden consistir en una o más enzimas y uno o más compuestos que reaccionan para formar un cromógeno que se puede medir espectrofotométricamente (o por otro método adecuado) para determinar el nivel de urato. La enzima del kit puede ser uricasa que convierte el ácido úrico en alantoína y peróxido de hidrógeno. Después se puede usar la peroxidasa en otra reacción que resulte en el acoplamiento de los compuestos de reacción para formar el cromógeno. Los compuestos de reacción se pueden seleccionar entre ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibencenosulfónico o 2-hidroxi-3,5-diclorobencenosulfonato y 4-aminoantipireno o 4-aminofenazona. Alternativamente, se puede usar cualquier otro reactivo adecuado utilizado habitualmente en los ensayos de ácido úrico o urato.

Se estipula un equipo de prueba para medir urato en una muestra biológica, preferentemente en la saliva, donde el equipo de prueba consta de reactivos para la determinación del nivel de urato en una muestra biológica.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, se proporciona un método para el diagnóstico de preeclampsia, que comprende los pasos de:

- (1) obtener una muestra biológica de un sujeto; opcionalmente almacenar la muestra por debajo de 10 °C
- (2) procesar la muestra biológica antes de analizarla
- (3) analizar la muestra para determinar la concentración de urato presente
- (4) comparar los resultados obtenidos en (3) con un valor de control normal para lograr un diagnóstico de preeclampsia.

Como se mencionó antes, en relación con el paso (1), la muestra puede ser saliva y se puede obtener según se describió. También puede ser procesada según el paso (2) como se describió antes. Si la muestra es sangre, entonces la obtención, el procesamiento y el almacenamiento de la muestra, se pueden adaptar convenientemente para analizar el componente plasmático de la misma.

El ensayo para determinar la concentración de urato en la muestra según el paso (3), puede ser como se mencionó antes por cualquier método generalmente conveniente, como el método de prueba en seco, la prueba con tira reactiva o el método de punto final cronometrado.

La comparación de los resultados de las pruebas (3) según el paso (4) se hace con referencia a los valores normales que resultan de la medición de los niveles de urato en muestras biológicas de mujeres embarazadas de edad gestacional similar que no presentaron preeclampsia. Un nivel de urato elevado en la muestra que se está analizando en comparación con el control normal, es indicativo de preeclampsia en la paciente.

La invención también puede diagnosticar afecciones de estrés oxidativo en el embarazo por otras causas y puede evaluar la actividad o la gravedad de la preeclampsia.

La invención también se puede utilizar como una prueba no invasiva, no física y no química del bienestar fetal. El feto sólo es capaz de excretar urato en el líquido amniótico, que se torna muy concentrado, es decir, tóxico.

La facilidad para obtener saliva y para el análisis de urato cumple los criterios de costo, seguridad y comodidad para el paciente y el laboratorista.

La invención es un complemento útil para la vigilancia del embarazo y la preeclampsia.

Las referencias al urato en este documento incluyen al ácido úrico a menos que el contexto especifique lo contrario. El urato en los líquidos biológicos del organismo se encuentra generalmente en forma de la sal de sodio del ácido úrico.

Las características preferidas del primer aspecto son para el segundo y siguientes aspectos *mutatis mutandis*.

La invención se describe de aquí en adelante mediante ejemplos y con referencia a las figuras siguientes.

Figura 1: variación diaria de uricolisis entérica aumentada por la noche. Gráfica de desintegraciones/s/mmol $^{14}\text{CO}_2$ derivado del ácido úrico-2- ^{14}C 200 mg, 36 μCi , en 2 ml de agua, inyectado por vía intravenosa durante (A) 5 días en ayunas e hiperuricémico y (B) 5 días normouricémico siguiendo una dieta con bajo contenido de purina.

Figura 2: muestra la mayor sensibilidad y la variación circadiana de la concentración de urato salival en comparación con el urato sanguíneo utilizando datos séricos de Kanabrocki et al. El urato salival se correlaciona con el del suero. El urato sérico (barras y eje Y izquierdo) varía de 380 a 405 $\mu\text{mol/l}$, mientras que en la saliva (línea y eje Y derecho) se amplifica de 125 a 350 $\mu\text{mol/l}$, es decir, una variación de 225 $\mu\text{mol/l}$.

Figura 3: muestra el descenso del urato sanguíneo durante 42 horas de privación de sueño (mientras se está en una dieta con bajo contenido de purina) con un aumento durante el sueño y el descenso asociado en la excreción de ácido úrico en la orina.

Figura 4: datos de sangre y saliva de mujeres no embarazadas, un embarazo normal de 28 semanas y datos de

urato sanguíneo y salival de 3 días de una paciente con preeclampsia, que dio a luz el día 2, que muestra aumentos en el urato salival.

Figura 5: muestra un tubo plástico tapado Salivette® con un hisopo de algodón insertado. Obsérvese el recipiente insertado, que tiene una perforación en su base. Entre 0.5 y 1 ml de saliva se acumula en el ápice del tubo después de la centrifugación.

Figura 6: muestra la variación media diurna normal de urato salival en 4 mujeres no embarazadas. La variación es de 70 a 190 µmol/l.

Recolección de las muestras

Antes de lavarse los dientes o de ingerir alimentos, la mujer retira el hisopo de algodón (Figura 5) (1), del tubo Salivette® estéril (2). El tubo Salivette® es un tubo de centrifuga desechable, de plástico, con un recipiente insertado del que se toma un hisopo de algodón y que tiene una perforación en su base. Este no es material para la invención, sino que contemplamos otros métodos de muestreo y análisis de saliva que se van a explicar detalladamente, como la prueba en seco o de la tira reactiva recubierta con reactivos adecuados. La mujer coloca el hisopo de algodón debajo de la lengua para humedecerlo y luego lo mastica suavemente durante unos 45 segundos. Esto activa la salivación dentro de la boca y el hisopo absorbe la saliva mezclada. Después el hisopo se retorna al recipiente insertado en el Salivette®, que se rotula adecuadamente para garantizar el almacenamiento seguro de la muestra. Éste se mantiene en frío en un refrigerador doméstico normal a aproximadamente 4 °C, hasta que es transportado y procesado por el laboratorio.

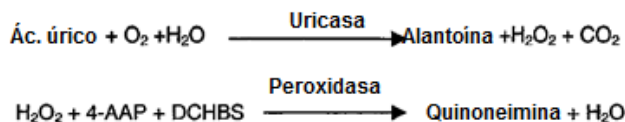
Análisis de las muestras

Una vez recibido en el laboratorio y después de recopilar la documentación del laboratorio y la paciente del rótulo del tubo, el tubo Salivette® con el hisopo insertado se centrifuga a 3000 revoluciones durante 5 minutos. La muestra transparente de saliva mezclada (3) está entonces lista para su análisis. Alternativamente, la muestra se puede preparar para su análisis comprimiendo el hisopo insertado. El análisis se puede realizar por cualquier método que proporcione un nivel de precisión de +/- 5% y permita la interpretación dentro de un conjunto de valores entre 30 µmol/l y 1000 µmol/l. Sin embargo para completarlo se describirá un método que utiliza un medidor múltiple comercial, el calibrador SYNCHRON CX Systems MULTI Calibrator.

La muestra es su propio reactivo y en conjunción con el calibrador SYNCHRON CX Systems MULTI Calibrator, aunque está destinado a la determinación cuantitativa de la concentración de ácido úrico (urato) en suero, plasma u orina, la saliva es perfectamente compatible con este sistema.

Se usa el reactivo de ácido úrico para medir la concentración de ácido úrico por un método de punto final cronometrado. El ácido úrico es oxidado por la uricasa para producir alantoína y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno reacciona con 4-aminoantipirina (4-AAP) y 3,5-dicloro-2-hidroxibenceno sulfonato (DCHBS) en una reacción catalizada por la peroxidasa para dar un producto coloreado.

El Synchron CX System dispensa automáticamente los volúmenes de muestra y reactivo en las proporciones adecuadas en una cubeta. La proporción utilizada es una parte de muestra por 25 partes de reactivo. El sistema controla el cambio en la absorbancia a 920 nanómetros. Este cambio en la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de ácido úrico en la muestra y es utilizado por el SYNCHRON CX System para calcular y expresar la concentración de ácido úrico.



Ejemplos

En la evaluación de la sensibilidad del urato salival en comparación con el sanguíneo (Figura 2) se compararon los resultados de 2 concentraciones de urato por hora durante 24 horas, con los datos de urato sérico de Kanabrocki et al. El urato salival se correlacionó con la variación diurna de urato sérico, aumentado por la noche. El rango de 24 horas para el urato sérico fue de 380 µmol/l a 405 µmol/l, es decir, una variación de sólo 25 µmol/l, mientras que los resultados para el urato salival se amplificaron de 125 µmol/l a 350 µmol/l, es decir, una variación de 225 µmol/l.

Cuatro mujeres no embarazadas (Figura 6) dieron muestras de urato salival para demostrar la variación diurna. Hubo un aumento en las primeras horas. Esto se debe tener en cuenta al interpretar los resultados de la prueba y también los cambios en la variación normal debidos al embarazo. El promedio de los resultados de la prueba entre las 8 am y las 6 pm (76 µmol/l) muestra un valor significativamente menor que en la preeclampsia (325 µmol/l) (Figura 4).

Se llevó a cabo un relevamiento clínico prenatal de rutina de los niveles de urato, que comprendió 149 muestras individuales tomadas al azar de 148 pacientes. La edad promedio de las pacientes fue de 27 años y el promedio de gestación fue de 31 semanas. El nivel promedio de urato salival fue de 179 $\mu\text{mol/l}$ DE 84 $\mu\text{mol/l}$. Se encontró que los niveles de urato salival aumentan con la edad gestacional. Se determinaron los niveles de urato sérico de 23 pacientes para comparar (urato salival $M \pm DE$ 180 $\pm$ 50, urato sérico 249 $\pm$ 55). Por lo tanto, los niveles de urato salival fueron aproximadamente el 70% del nivel en sangre durante el embarazo y el nivel de urato salival de 250 $\mu\text{mol/l}$ es equivalente al límite superior normal en sangre para las mujeres de 360 $\mu\text{mol/l}$. El resultado del relevamiento clínico prenatal fue sorprendente puesto que el urato salival es afectado por diversos factores fisiopatológicos aparte del embarazo. Esto se demuestra por una pequeña muestra en reposo a las 20 semanas después de una ecografía. Una paciente con gemelos a las 28 semanas presentó valores anormales antes de que se le realizaran análisis de sangre, una ecografía y el parto prematuro.

Un estudio de pacientes hospitalizadas ingresadas para observación de hipertensión o tratamiento de la preeclampsia se comparó con los controles 'normales'. Se tomaron 37 juegos de muestras de urato salival a las 8 am, 12 del mediodía, 4 pm, 8 pm, 12 de la noche y 4 am. En la preeclampsia, el aumento de urato salival se produjo durante todo el día, lo que sugiere una mayor producción materna de urato, retención renal y aumento de la concentración de urato fetal en el líquido amniótico. En un caso grave de preeclampsia, el nivel de urato salival fue mayor que el nivel en sangre.

Bibliografía

- Many A., Hubel CA., Roberts JM. (1996) Hyperuricaemia and xanthine oxidase in preeclampsia, revisited. American Journal of Obstetrics and Gynaecology 174(1), 288-291
- Chappell LC., Seed PT., Briley AL., Kelly FJ., Hunt BJ., JH., Charnock-Jones S., Mallet AL., Poston L (2002). A longitudinal study of biochemical variables in women at risk of preeclampsia. American Journal of Obstetrics and Gynaecology, 186, 127-136.
- Sorensen LB. The elimination of uric acid in man studied by means of C14-labelled uric acid (1960) Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation; supplement 54.
- Owen-Smith BD, & Whyman A. (1981). Diurnal and nocturnal variations of enteral uricolysis during fasting and refeeding. (Abstract) Annals of Rheumatic Diseases, 40, 523-524.
- Kanabrocki EL., Third J., Ryan MD., Nemchausky BA., Shirazi P., Scheving LE., Hines E Jr., McCormick JB (2000) Circadian relationships of serum uric acid and nitric oxide. Journal of the American Medical Association; 283, 2240-2241.
- Owen-Smith BD (1983). Significance of variations of uric acid elimination Annals of Rheumatic Diseases; 42, Supplement p 87.
- Owen-Smith BD., Quiney, J & Read J (1998). Salivary urate in gout, exercise and diurnal variation. Lancet; 351:1932

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método para el diagnóstico de preeclampsia que comprende medir el urato en una muestra biológica de saliva materna.
- 5 **2.** Un método como el reivindicado en la reivindicación 1, donde el urato se mide por medio de un método de punto final cronometrado.
- 10 **3.** Un método como el reivindicado en la reivindicación 1, donde el urato se mide por medio de un método de prueba en seco.
- 10 **4.** Un método como el reivindicado en la reivindicación 1, donde el urato se mide por medio de un método de tira reactiva.
- 15 **5.** El uso de los niveles de urato en la saliva materna como indicador de preeclampsia.

Figura 1

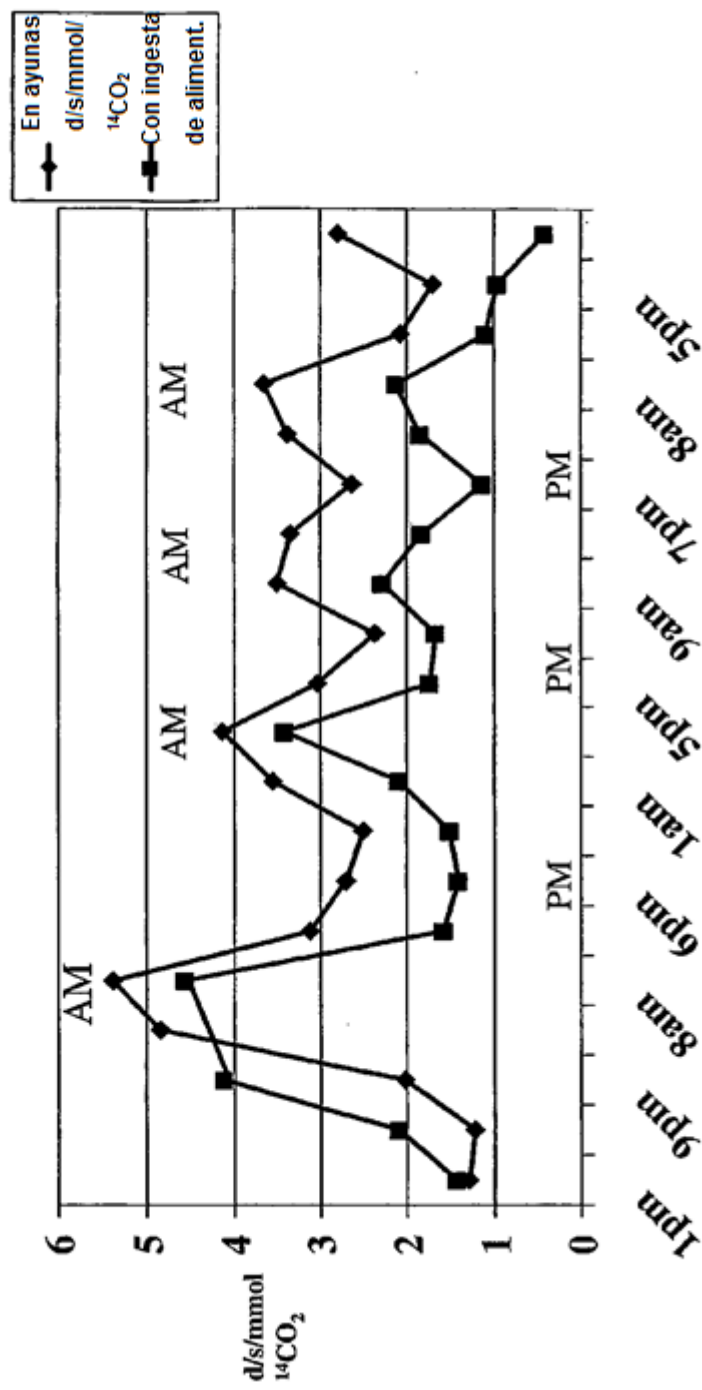


Figura 2

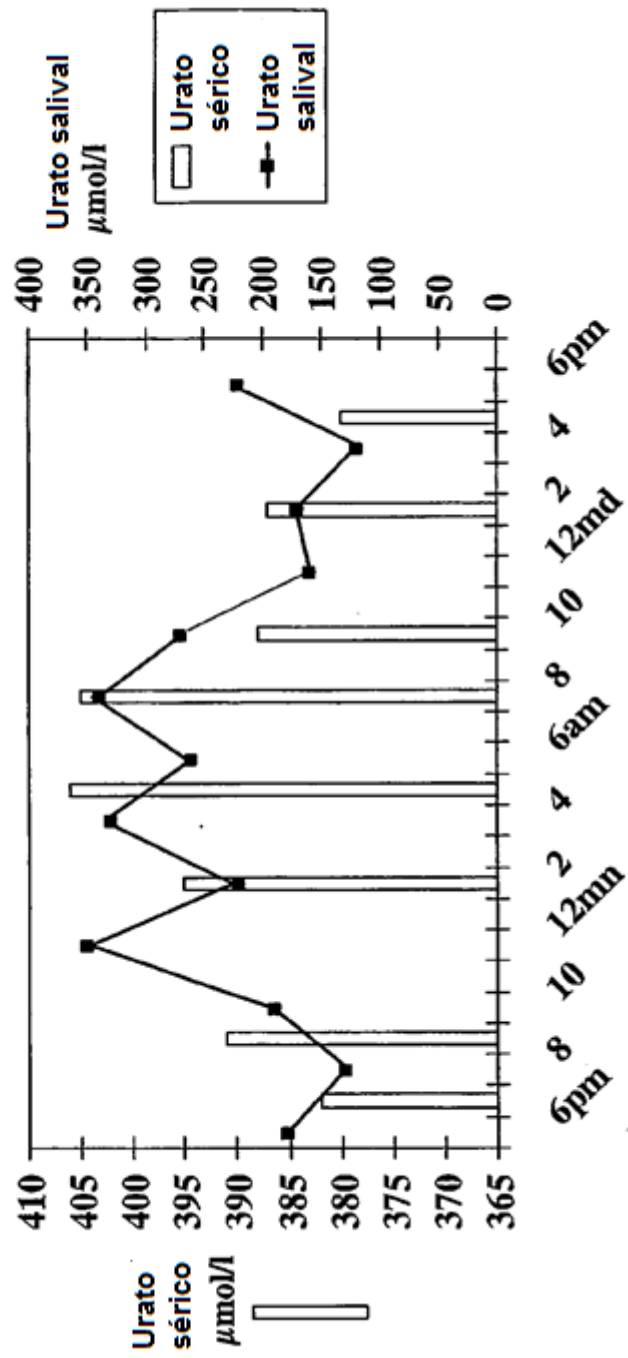


Figura 3

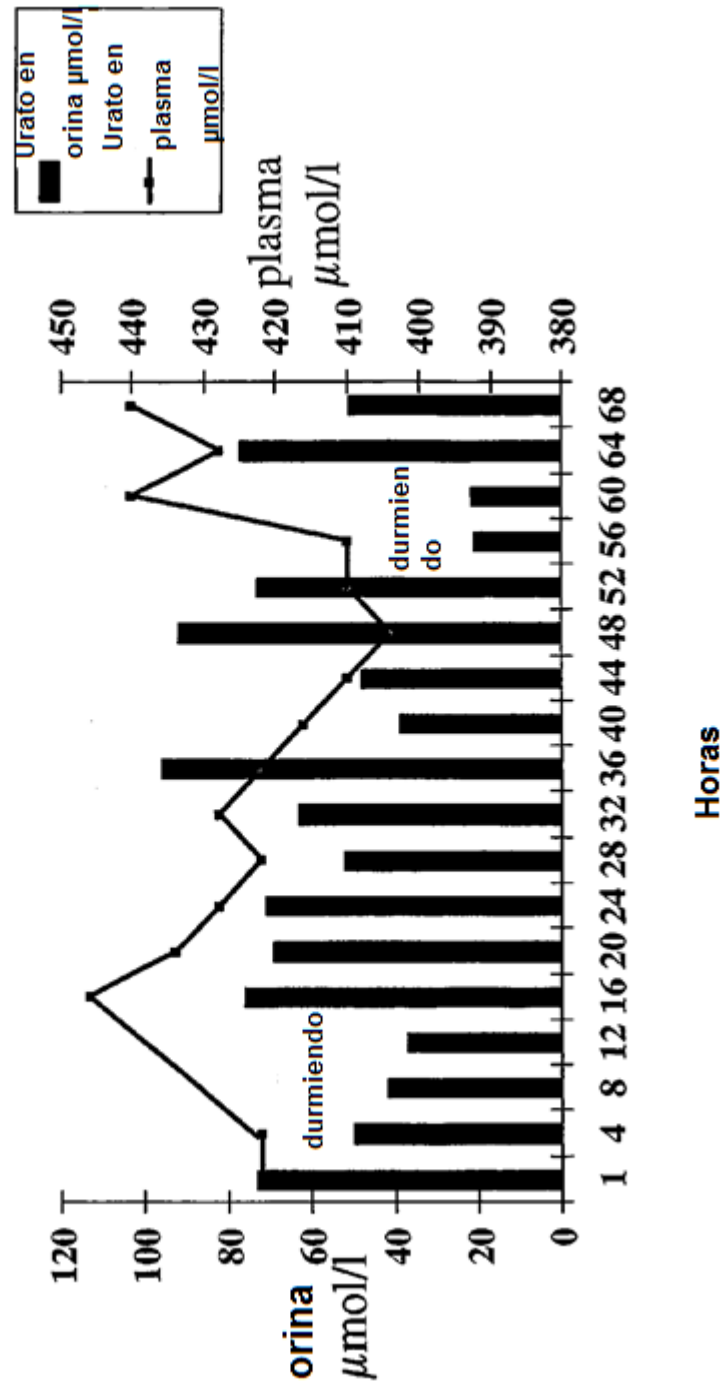


Figura 4

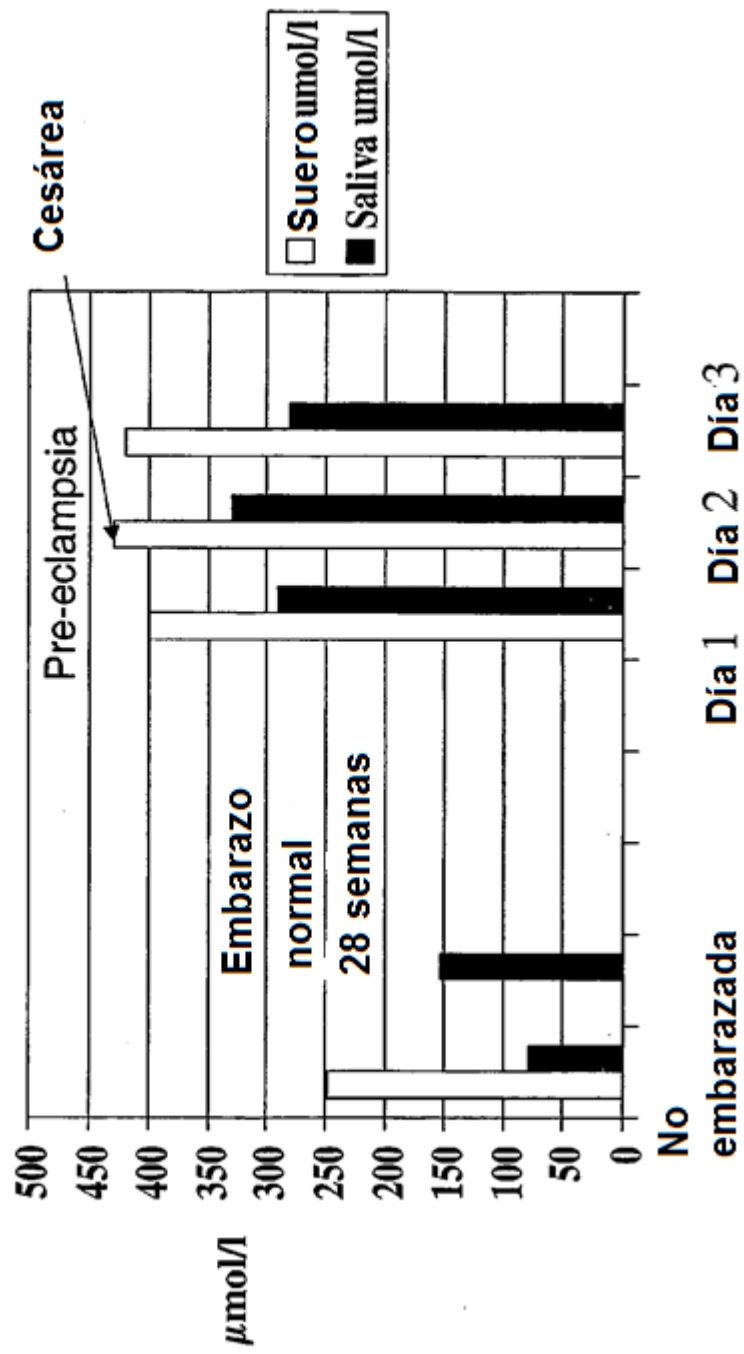


Figura 5

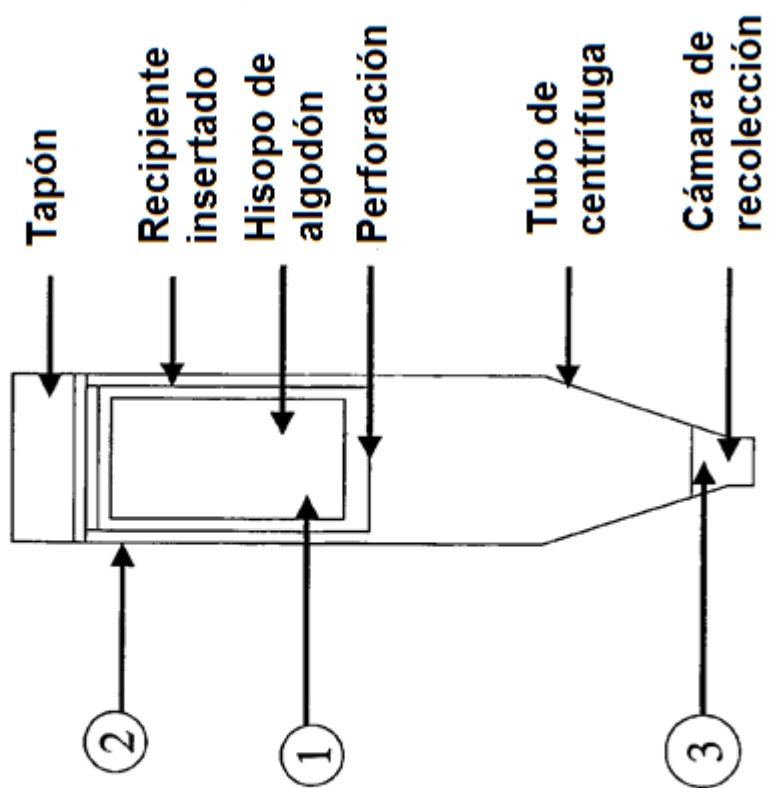


Figura 6

